

Thèse de doctorat de l'Université de Paris

École doctorale 561, HOB

Institut Cochin INSERM U1016

Équipe Biologie de la Transmission de *Plasmodium*

Étude du récepteur à la transferrine de type 2 dans l'érythropoïèse

Par Cyrielle RICHARD

Thèse de doctorat d'Hématologie,
Spécialité Hématologie

Dirigée par le Dr Frédérique VERDIER

Présentée et soutenue publiquement à l'Institut Cochin le 17 décembre 2019

Devant un jury composé de :

Dr Sophie VAULONT, DR1, Université de Paris

Présidente du jury

Dr Léon KAUTZ, CR, Université Paul Sabatier de Toulouse III

Rapporteur

Dr Betty GARDIE, MCU, École Pratique des Hautes Études

Rapporteuse

Dr Geneviève COURTOIS, DR2, Université de Paris

Examinatrice

Dr Zahra KADRI, DR2, Université Paris-Saclay

Examinatrice

Dr Frédérique VERDIER, CR, Université de Paris

Directrice de thèse

Résumé

L'érythropoïèse est le processus de production des globules rouges à partir de cellules souches présentes dans la moelle osseuse. Grâce à l'hémoglobine qu'ils contiennent, les globules rouges vont permettre l'oxygénation de l'organisme en transportant l'oxygène depuis les poumons vers les autres tissus. L'hémoglobine contenant des atomes de fer, sa synthèse va nécessiter l'import de conséquentes quantités de fer, faisant de l'érythropoïèse le processus le plus consommateur en fer de l'organisme. Cet import se fait dans les cellules se différenciant en globules rouges, appelés érythroblastes, *via* le récepteur à la transferrine de type 1 (TFR1). La biodisponibilité du fer étant réduite d'une part, et son accumulation étant toxique d'autre part, une balance constante s'opère entre l'import de fer dans l'organisme et le taux d'érythropoïèse. Le récepteur à la transferrine de type 2 (TFR2), homologue de TFR1, est exprimé par les érythroblastes, et facilite l'expression du récepteur à l'érythropoïétine (EPOR), régulateur positif majeur de l'érythropoïèse. De plus, TFR2 joue un rôle de senseur de la concentration circulante de fer, et l'érythropoïèse est grandement retardée en son absence. De ce fait, il pourrait ajuster le taux d'érythropoïèse à la concentration de fer circulante. Nos travaux ont eu pour objectif de mieux comprendre le rôle de TFR2 dans la régulation de l'érythropoïèse et de caractériser sa signalisation.

Nous avons identifié un nouveau partenaire de TFR2, la Sérine/Thréonine kinase Myotonic dystrophy-Related kinase CDC42-binding Kinase α (MRCK α), et montrons qu'elle interagit également avec le partenaire connu de TFR2, l'EPOR, dans les érythroblastes humains. MRCK α régule le cytosquelette en phosphorylant la myosine, et son expression est régulée par la concentration intracellulaire en fer. MRCK α affecte le trafic d'EPOR, de TFR2, ainsi que de TFR1. En son absence, la différenciation terminale et la synthèse d'hémoglobine sont retardées – démontrant un rôle de MRCK α dans la régulation de l'érythropoïèse.

Afin de préciser le rôle de TFR2 dans l'érythropoïèse, nous avons cherché à identifier des gènes dont il régule l'expression. Nous montrons que TFR2 régule la ferroportine (FPN), seul exportateur de fer de l'organisme. FPN, récemment identifiée dans les globules rouges, est impliquée dans la gestion du stress oxydant. Nous montrons qu'elle est exprimée par les érythroblastes, et est importante pour la gestion du stress oxydant généré par l'entrée de fer dans les érythroblastes immatures. Nos travaux suggèrent une nouvelle implication de TFR2 érythroïde comme effecteur du maintien de l'homéostasie du fer *via* la FPN.

Abstract

Erythropoiesis is the process giving rise to red blood cells from hematopoietic stem cells present in the bone marrow. Thanks to the hemoglobin protein they carry, red blood cells are able to transport oxygen from the lungs to the rest of the body. As the hemoglobin is composed of iron, its synthesis relies on the import of large amount of iron – making erythropoiesis the most iron-consuming process in the organism. The internalization of iron takes place in differentiating cells, called erythroblasts, through the transferrin receptor type 1 (TFR1). Iron availability being limited and high quantity of iron being toxic, a constant balance is maintained between iron import into the organism and erythropoiesis rate. The transferrin receptor type 2 (TFR2), homolog of TFR1, is expressed by erythroblasts and facilitate the expression of the erythropoietin receptor (EPOR), the major positive regulator of erythropoiesis. TFR2 is able to sense the extracellular concentration of iron, and the erythroid differentiation is strikingly delayed without TFR2. Therefore, TFR2 may adjust erythropoiesis rate to iron availability. Our work aimed at better understanding the role of TFR2 in erythropoiesis regulation and characterize its signalization.

We identified a new partner of TFR2, the Serine/Threonine kinase Myotonic dystrophy-Related kinase CDC42-binding Kinase α (MRCK α), and show MRCK α also interacts with EPOR, partner of TFR2. MRCK α regulates cytoskeleton through myosin phosphorylation, and its expression is regulated by intracellular iron concentration. MRCK α affects the trafficking of EPOR, TFR2, and TFR1. In absence of MRCK α , terminal differentiation and hemoglobin synthesis are delayed – highlighting a role of MRCK α in erythropoiesis regulation.

To better understand how TFR2 regulates erythropoiesis, we have endeavored to identified genes whose expression is regulated by TFR2. We show that the sole iron exporter of the organism, ferroportine (FPN), is regulated by the signalization downstream of TFR2. FPN presence has recently been found at red blood cell surface, and its implication in oxidative stress management has been suggested. We show FPN is expressed by erythroblasts, and manages the oxidative stress generated by the internalization of iron into immature erythroblasts. Our data suggest a new implication of erythroid TFR2 in iron homeostasis as an effector *via* FPN regulation.

Remerciements

Ces trois ans et demi passés à l'Institut Cochin m'auront beaucoup appris, mais auront surtout été marqués par de nombreuses rencontres. Sans elles, ces années auraient été bien fades, et ma thèse bien médiocre.

Je souhaiterais tout d'abord remercier les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Je suis très reconnaissante aux Docteurs Léon Kautz et Betty Gardie d'avoir pris le temps de lire ce manuscrit, et pour leurs suggestions. Je remercie très chaleureusement Sophie Vulont, présidente de mon jury, pour ses conseils scientifiques et sa bienveillance. À Zahra Kadri, je voudrais exprimer toute ma reconnaissance pour ses conseils tout au long de cette thèse, lors de mes comités d'évaluation. Je souhaite remercier également Geneviève Courtois d'avoir accepté de participer à ce jury.

Je remercie très chaleureusement ma directrice de thèse Frédérique Verdier pour son accompagnement au cours de ses années et son encadrement. Fred, merci pour ta patience, ta bonne humeur, et la confiance que tu as placée en moi. Merci d'avoir toujours gardé ta porte ouverte tout en me laissant l'espace de faire mes propres erreurs et mes propres choix. Cet équilibre, très peu de directeurs de thèse l'ont, et je me sais extrêmement chanceuse d'avoir pu réaliser cette thèse sous ta direction.

Je remercie tous ceux qui ont participé à ces travaux :
Carine Lefevre, aussi appelée « wonder-postdoc » et « Ms. CRISPR », merci pour ton aide précieuse, ta patience, et ta présence, surtout lors des « craquages ». Merci aussi d'avoir corrigé les fautes de grammaires dans ce manuscrit et d'avoir toujours été disponible. Ce fut un plaisir de faire des CRISPR avec toi, même si ce fut beaucoup de clones...
Merci à Maria-Lilia Brassart pour son aide à screener lesdits clones – sinon, j'y serai encore !
Merci à El Hassan Faouzi et Sophie Viret, « mes » M2, à qui je souhaite la réussite et de garder leur bonne humeur ! Merci pour votre aide précieuse à tous les deux.
Marjorie Leduc, ma « copine de thèse », merci pour tes analyses protéomiques et ta joie de vivre – et pour nos « pauses thé » à la plateforme ! Merci à tous les autres membres de 3P5 également !
Enfin, ces travaux n'auraient pu être réalisés sans les nombreux patients qui consentent à donner pour la recherche, merci à eux, ainsi qu'au Dr Nabih Azar pour ces prélèvements.

Merci à mes directeurs d'équipes : Patrick, merci pour ton aide, et ta disponibilité. J'aurais beaucoup appris de nos conversations (et merci beaucoup pour l'azide dont tu es mon fournisseur depuis mon Master !). Catherine, merci de m'avoir accueilli (recueilli ?) comme tu l'as fait dans ton équipe, et pour ton dynamisme. Merci également pour la recette de la Caïpirinha... !

Je remercie vivement tous les membres du « 7^{ème} ». Merci aux chercheurs Yaël Zermati, Frédéric Pendino (Fredino), Isabelle Dusanter et Evelyne Lauret, pour leurs conseils avisés. Yaël, Fredino : merci pour les cafés, et les conversations qui allaient avec ! Je vous dédie à vous, mais aussi à Fred mon addiction à la caféine. Merci pour votre gentillesse et bienveillance. Isabelle, merci de ta bonne humeur. Evelyne, merci pour ton humour, et l'aide que tu es toujours prête à apporter. Merci également à Lamya Haddaoui, que je n'oublie pas malgré la relocalisation à la Pitié. Merci pour ta gentillesse, et ton calme à l'épreuve de tout, même des audits ! Je tiens également à remercier Mireille Lambert, tes conseils et ton aide m'ont été précieux !

Merci à mon ancien bureau pour leur gentillesse. Carine, Alice, je ne sais pas ce que j'aurais fait sans vous pour m'écouter « râler ». Alice, que dire si ce n'est que tu m'auras appris beaucoup de ficelles de ce métier, et que ton approche « système D » me manque ? Shanti, ma voisine de bureau, la fréquence de grignotage de sucreries a bien diminuée depuis ton départ (c'est éhontément faux, les tiroirs sont toujours pleins à ras-bords de gâteaux) ! Gabriel, merci pour tes blagues qui ont égayé ce bureau ! Emilie-Fleur, merci pour ton empathie, et ta bonne humeur. Je te souhaite tout le meilleur à la plateforme ! Samia, Amandine, Camille et Sandra, merci pour votre bonne humeur et vos rires ! Bon courage pour la suite à vous toutes !

Merci au « bureau d'en face », où les shoot contests se déroulent plusieurs fois par jour ! Meriem et Justine : merci pour votre gentillesse, et votre sourire. Merci à Sabrina et à Pierre d'être toujours prêts à répondre aux questions bêtes ! Salomé et Fetta merci pour nos conversations dans le L2 dans lequel nous avons chacune passé un certain nombre d'heures... Merci aux « poulets » Rudy et Ismaël pour leurs bêtises qui ont rythmé la vie du labo ! Merci à Adrien dont l'imprévisibilité aura également animé ce bureau ! Merci à Laurie pour nos midis passés au soleil, vaine tentative de ma part de ne plus avoir la même couleur que les murs des bureaux. Je vous souhaite à tous le meilleur, ainsi qu'à Charles, Agathe, Tony, et Zubaidan.

Merci aux « gaméto-X », qui nous ont accueilli à bras ouverts il y a quelques mois ! Merci à Daniela, pour nos moments passés au labo mais aussi en dehors. Ton humeur est à l'image de l'Italie : ensoleillée ! Merci à Gaëlle pour nos rires et ta gentillesse. Et pour les communications en morse à travers le mur ! Florian, merci pour ta patience quand je viens te demander où est rangé quelque chose pour la troisième fois en ... Une semaine ! Merci à Marie-Esther, Fiona et Laurianne pour leur bonne humeur, et nos pauses glaces pendant l'été !

Enfin, je voudrais remercier tous mes proches qui m'ont accompagné lors de ces longues années d'études :

Merci aux Genetic Furious, que les kilomètres et le temps n'auront pas su séparer. Quentin, je te souhaite le meilleur pour la fin de ta thèse là-haut dans les fjords. Marianne, ma binôme, félicitations pour la tienne ! Antoine, merci d'avoir été là pendant cette fin de thèse pour m'offrir un havre de paix.

Merci également à Marina, tu es un vrai rayon de soleil, tu amènes bonne humeur et fous rires où que tu passes !

To Kusum, thank you my friend, I've never been so happy to be "stalked" by someone! Wishing you the best, but come what may, I know you'll pull through any situation.

Merci à Isa, pour nos fous rires et nos discussions qui traitent parfois de science... ! Merci pour ton soutien, et ta présence même pendant les mauvaises passes.

Merci à ma mère, qui aura pris son mal en patience pour relire ce manuscrit, même si elle avait l'impression de « lire une langue étrangère » ! Merci à mon père, qui ne manquera pas de me taquiner ! Merci à mes frangines, Christelle et Carole, dont la patience (pour l'une), et l'organisation (pour l'autre) m'auront été salvatrices à plusieurs reprises... Merci aussi à mes « petits bouts », qui sont une distraction bienvenue mais qui grandissent bien trop vite ! Enfin, je souhaiterais dédier ce manuscrit à un moment en famille. À toi, maman, lorsque que tu m'as répondu « passes ton BAC d'abord ! » quand je t'ai dit que j'allais être « docteur et faire de la recherche pour soigner les gens ». Pour ta défense, j'avais 6 ans ... ! Merci à vous tous de m'avoir toujours soutenu dans mes décisions et d'avoir toujours été présents.

Table des matières

Résumé.....	1
Abstract	2
Remerciements.....	3
Table des matières	5
Liste des figures	9
Liste des tables.....	10
Liste des annexes	11
Liste des abréviations.....	12
Introduction	18
I. L'érythropoïèse humaine.....	18
1. Généralités sur l'hématopoïèse	18
2. L'érythropoïèse.....	22
A. L'ontogénèse de l'érythropoïèse	22
B. L'érythropoïèse définitive adulte	24
a. <i>L'érythropoïèse précoce</i>	24
b. <i>L'érythropoïèse tardive</i>	26
i. <i>Caractéristiques morphologiques et immunophénotypiques</i>	26
ii. <i>La synthèse d'hémoglobine</i>	29
c. <i>Condensation du noyau et énucléation</i>	31
d. <i>Maturation des réticulocytes en globules rouges</i>	34
i. <i>Maturation structurale</i>	34
ii. <i>Globule rouge et oxydation</i>	38
3. La régulation de l'érythropoïèse	39
A. La régulation par les cytokines - Le <i>Stem Cell Factor</i> et l'Érythropoïétine	39
a. <i>Le couple SCF/C-KIT</i>	39
b. <i>Le couple EPO/EPOR</i>	39
c. <i>La signalisation STAT</i>	40
d. <i>La signalisation PI3K/AKT</i>	41
e. <i>La signalisation MAPK/ERK</i>	41
B. L'îlot érythroblastique.....	43
a. <i>La structure de l'îlot</i>	43
b. <i>La régulation de la différenciation par le macrophage</i>	44

C.	La régulation par les caspases	44
a.	<i>La régulation positive par l'induction des caspases</i>	45
b.	<i>La régulation négative par contact</i>	45
D.	Érythropoïèse de stress	46
E.	Régulation transcriptionnelle de la différenciation	46
F.	L'expression génique au cours de l'érythropoïèse	48
II.	Le métabolisme du fer	49
1.	La circulation du fer dans l'organisme	49
2.	Transfert au sein de l'îlot érythroblastique	53
3.	Les mécanismes de régulation liés au fer	54
A.	Mécanismes de régulation au niveau cellulaire	54
B.	Mécanismes de régulation au niveau systémique	57
a.	<i>La régulation de l'hepcidine par la voie du fer</i>	57
i.	<i>Induction par les BMPs</i>	57
ii.	<i>Induction par TFR2</i>	58
b.	<i>La régulation de l'hepcidine par la voie de l'inflammation</i>	60
c.	<i>La régulation de l'hepcidine par les régulateurs érythroïdes</i>	61
d.	<i>La régulation de l'hepcidine par l'hypoxie</i>	62
4.	La ferroportine – acteur majeur du métabolisme du fer	62
5.	Les déséquilibres du métabolisme du fer	63
III.	Le récepteur à la transferrine de type 2	67
1.	Structure et régulation du récepteur à la transferrine de type 2	67
2.	La signalisation de TFR2 et ses partenaires	70
A.	Les protéines s'associant à TFR2	70
B.	Voies de signalisation en aval de TFR2	71
3.	Le trafic intracellulaire de TFR2	71
4.	Le rôle tissu-spécifique de TFR2	72
A.	Le rôle hépatique de TFR2	72
B.	Le rôle extra-hépatique de TFR2	74
a.	<i>Le rôle de TFR2 dans l'os</i>	74
b.	<i>Le rôle de TFR2 dans le cœur</i>	75
c.	<i>Le rôle de TFR2 dans le cerveau</i>	75
d.	<i>Le rôle de TFR2 dans les macrophages</i>	76
C.	Le rôle érythroïde de TFR2	76

5. TFR2 & pathologies	78
A. L'hémochromatose héréditaire de type 3 - Implication différentielle des deux variants de TFR2.....	78
B. Cancer.....	79
C. β -Thalassémie.....	79
D. Alzheimer et Parkinson	81
E. Ossification hétérotopique.....	81
IV. Objectifs généraux de la thèse.....	83
V. Résultats	84
1. Modèles cellulaires	84
A. Les érythroblastes humains primaires	84
B. Les cellules MEDEP	86
2. Résultats, première partie : TFR2 forme un complexe avec la Sérine/Thréonine kinase MRCKα	87
A. Contexte	87
B. Article " <i>MRCKα is a new regulator of erythropoiesis</i> "	87
C. Conclusions & perspectives	113
3. Résultats, seconde partie : TFR2 contrôle le stress oxydatif dans les érythroblastes <i>via</i> la FPN au cours de la différenciation terminale.....	123
A. Contexte	123
B. Matériel & Méthodes	123
C. Résultats	125
D. Conclusions & perspectives	141
VI. Discussion	151
Bibliographie.....	158
ANNEXES	184
ANNEXE 1 : Résumé sélectionné à l'ESH - The Serine/Threonine kinase MRCKα, a novel partner of transferrin receptor type 2, is involved in erythropoiesis regulation.....	185
ANNEXE 2 : Résumé sélectionné à la SFH - La Sérine/Thréonine kinase MRCKα, nouveau partenaire du récepteur à la transferrine de type 2, est impliquée dans la régulation de l'érythropoïèse.	187
ANNEXE 3 : Résumé sélectionné au CGRF - La Sérine/Thréonine kinase MRCKα, nouveau partenaire du récepteur à la transferrine de type 2, est impliquée dans la régulation de l'érythropoïèse.....	189
ANNEXE 4 : Article 1 - Malaria sexual parasites develop in human erythroblasts and affect erythropoiesis.....	191

ANNEXE 5 : *Article 2* - Plasmodium falciparum gametocyte-infected erythrocytes do not adhere to human primary erythroblasts233
ANNEXE 6 : *Article 3* - Finely-tuned regulation of AMP-activated protein kinase is crucial for human adult erythropoiesis.....244

Liste des figures

- Figure 1 :** Modèle classique et hiérarchique de l'hématopoïèse humaine.
- Figure 2 :** Modèles revisités de la hiérarchie dans l'hématopoïèse humaine.
- Figure 3 :** Ontogénie de l'érythropoïèse.
- Figure 4 :** L'érythropoïèse précoce.
- Figure 5 :** L'érythropoïèse humaine : des progéniteurs aux érythrocytes.
- Figure 6 :** Isolement et caractérisation d'érythroblastes humains (d'après de Hu et al., 2013).
- Figure 7 :** La structure de l'hémoglobine.
- Figure 8 :** Le processus d'énucléation est dépendant du cytosquelette.
- Figure 9 :** Immunophénotype et morphologie des réticulocytes au cours de leur maturation (d'après Malleret et al., 2013).
- Figure 10 :** Le cytosquelette du globule rouge est ancré à la membrane par deux complexes principaux.
- Figure 11 :** La signalisation en aval du couple SCF/C-KIT et du couple EPO/EPOR.
- Figure 12 :** L'îlot érythroblastique.
- Figure 13 :** La circulation du fer dans l'organisme.
- Figure 14 :** Régulation cellulaire dépendante du fer – Le système IRE/IRP.
- Figure 15 :** La régulation par le fer – L'exemple de *SLC40A1*.
- Figure 16 :** Régulation systémique de l'homéostasie du fer – La synthèse d'hepcidine.
- Figure 17 :** Structure du gène *TFR2* et comparaison des variants TFR2- α et TFR2- β avec TFR1.
- Figure 18 :** Culture des érythroblastes humains primaires.
- Figure 19 :** Différenciation des cellules MEDEP.
- Figure 20 :** Expression de MRCK α en fonction de la concentration intracellulaire en fer.
- Figure 21 :** Hypothèse quant à la surexpression d'EPOR observée en absence de MRCK α .
- Figure 22 :** MRCK α est clivable par les caspases.
- Figure 23 :** Expression des différentes populations de *SLC40A1* au cours de la différenciation humaine.

Figure 24 : Effet du *knockdown* de *TFR2* sur *SLC40A1* dans les lignées érythroleucémiques.

Figure 25 : Effet du *knockdown* de *TFR2* sur *SLC40A1* dans les érythroblastes humains primaires.

Figure 26 : Expression de *TFR2*, *FPN*, et des ferritines au cours de la différenciation érythroïde humaine.

Figure 27 : Expression de *FTH1* et *FTL* chez les érythroblastes humains primaires.

Figure 28 : *Knockdown* de *SLC40A1* dans les érythroblastes humains primaires.

Figure 29 : Effet du *knockdown* de *SLC40A1* sur les érythroblastes humains primaires.

Figure 30 : Morphologie des érythroblastes humains primaires *knockdown SLC40A1* au cours de la différenciation.

Figure 31 : Suivi des marqueurs Bande3 et Intégrine $\alpha 4$ chez les érythroblastes humains primaires *knockdown SLC40A1*.

Figure 32 : *Knockout* de *Slc40a1* dans les cellules MEDEP.

Figure 33 : Effet du *knockout* de *Slc40a1* sur les cellules MEDEP.

Figure 34 : Morphologie des MEDEP au cours de la différenciation.

Figure 35 : Évolution des marqueurs de surface lors de la différenciation des MEDEP *Slc40a1-KO*.

Figure 36 : La *FPN* prévient le stress oxydant dans les érythroblastes basophiles.

Figure 37 : Contenu martial des érythroblastes humains au cours de la différenciation terminale.

Figure 38 : Phénotype des érythroblastes humains primaires *knocked down* pour *TFR2*.

Figure 39 : Marquage de *FPN* en cytométrie en flux dans les cellules K562 *knockdown SLC40A1*.

Figure 40 : Expression de *GDF15* et des isoformes de *TFR2* au cours de la différenciation.

Liste des tables

Table 1 : Les hémochromatoses héréditaires.

Table 2 : Séquences des amorces utilisées en PCR quantitative.

Table 3 : Principaux gènes différentiellement exprimés lors de l'analyse du transcriptome.

Liste des annexes

Annexe 1 : The serine/threonine kinase MRCK α , a novel partner of transferrin receptor type 2, is involved in erythropoiesis regulation. Abstract sélectionné à l'oral, *European School of Hematology, International Conference Erythropoiesis Control and Ineffective Erythropoiesis: from bench to bedside*, Mars 2019.

Annexe 2 : La sérine/thréonine kinase MRCK α , nouveau partenaire du récepteur à la transferrine de type 2, est impliquée dans la régulation de l'érythroïèse. Abstract sélectionné à l'oral, Société Française d'Hématologie, Mars 2019.

Annexe 3 : La sérine/thréonine kinase MRCK α , nouveau partenaire du récepteur à la transferrine de type 2, est impliquée dans la régulation de l'érythroïèse. Abstract sélectionné à l'oral, Club du Globule Rouge et du Fer, Octobre 2019.

Annexe 4 : Malaria sexual parasites develop in human erythroblasts and affect erythropoiesis, soumis.

Annexe 5 : *Plasmodium falciparum* gametocyte-infected erythrocytes do not adhere to human primary erythroblasts, Scientific report, Nov. 2018

Annexe 6 : Finely-tuned regulation of AMP-activated protein kinase is crucial for human adult erythropoiesis, *Hematologica*, 2019.

Liste des abréviations

A	
aa	Acide aminé
Acido-E	Érythroblaste acidophile
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGM	Aorto-Gonado-Mésonéphros
ALAS	5'-aminolévulinate synthase
ANK	Ankyrine
Apo-Tf	Apo-transferrine
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
B	
BAD	<i>BCL2 associated Agonist of cell Death</i>
Baso-E1	Érythroblaste basophile-1
Baso-E2	Érythroblaste basophile-2
BFU-E	<i>Burst Forming Unit – Erythroid</i>
BMP2	<i>Bone Morphogenetic Protein 2</i>
BMP4	<i>Bone Morphogenetic Protein 4</i>
BMP6	<i>Bone Morphogenetic Protein 6</i>
BMP7	<i>Bone Morphogenetic Protein 7</i>
C	
C.	Site d'interaction CDC42/Rac
C1.	Région conservée <i>Protein kinase C</i>
C-Tf	Transferrine dont le lobe C-terminal est saturé par un atome de fer
CAD	<i>Caspase-activated DNase</i>
CC., CC2, CC3	<i>Coiled-coil domain</i>
CFU-E	<i>Colony Forming Unit – Erythroid</i>
CH.	<i>Citron homology domain</i>
CLP	Progéniteur lymphoïde commun
CD34	Cluster de différenciation 34
CD36	Cluster de différenciation 36

C	
CD45	Cluster de différenciation 45
CD47	Cluster de différenciation 47
CD71	Cluster de différenciation 71
CD81	Cluster de différenciation 81
CD117	Cluster de différenciation 117
CD163	Cluster de différenciation 163
CMP	Progéniteur myéloïde commun
D	
DCYTB	<i>Duodenal Cytochrome B</i>
DFO	Déféroxamine
DMT1	<i>Divalent Metal Transporter 1</i>
E	
Ér.	Érythrocyte
Early Baso	Érythroblaste Basophile-1
EMP	<i>Erythroblast Macrophage Protein</i>
EPO	Érythropoïétine
EPOR	Récepteur à l'érythropoïétine
ERFE	Érythroferrone
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
F	
FBXL5	<i>F box and leucine-rich repeat protein 5</i>
FOG-1	<i>Friend of GATA-1</i>
FOP	<i>Fibrodysplasie Ossifiante Progressive</i>
FOXO3A	<i>Forkhead box O3</i>
FPN	<i>FERROPORTINE</i>
FTL	<i>FERRITIN light chain – chaîne légère de la Ferritine</i>
FTH1	<i>FERRITIN heavy chain – chaîne lourde de la Ferritine</i>
FLVCR	<i>Feline leukemia virus subgroup C receptor 1</i>
G	
GDF15	<i>Growth Differentiation Factor 15</i>
GMP	Progéniteur granulo-monocytaire
GPA	GLYCOPHORINE A

G	
GPC	GLYCOPHORINE C
GR	Globule Rouge
Gran.	Granulocytes
GRB2	<i>Growth factor Receptor-Bound protein 2</i>
H	
Hb	Hémoglobine
HSP70	<i>Heat Shock Protein 70</i>
HEPC	HEPCIDINE
HH3	Hémochromatose héréditaire de type 3
HIF-1α	<i>Hypoxia Inducible Factor 1α</i>
HIF-1β	<i>Hypoxia Inducible Factor 1β</i>
HIF2α	<i>Hypoxia-Inducible Factor-2α</i>
HO-1	Hème oxygénase 1
Holo-Tf	Holo-transferrine
HRE	<i>Hypoxia Response Element</i>
HSC	Cellule souche hématopoïétique
Holo-Tf	Holo-transferrine
I	
IFN-γ	Interféron γ
IL-3R	Récepteur à l'interleukine-3
IRE	<i>Iron Responsive Element</i> (Élément de réponse au fer)
IRIDA	<i>Iron Resistant Iron Deficient Anemia</i>
IRP1	<i>Iron Responsive Protein 1</i>
IRP2	<i>Iron Responsive Protein 2</i>
J	
JAK2	<i>Janus Kinase 2</i>
K	
kDa	Kilodaltons
KD	<i>Knockdown</i>
KD.	<i>Kinase Domain</i> – Domaine kinase.
KI	<i>Knock-in</i>
KLF1	<i>Kruppel-like factor 1</i>

K	
KO	<i>Knockout</i>
L	
Late Baso	Érythroblaste Basophile-2
LB	Lymphocyte B
LCR	<i>Locus Control Region</i>
LDB1	<i>LIM Domain Binding 1</i>
LMO2	<i>LIM Domain Only 2</i>
LT	Lymphocyte T
Ly.	Lymphocytes
M	
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MARE	<i>MAF responsive/Antioxidant Response Elements</i>
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i> – Intensité moyenne de fluorescence
MFN-2	Mitofusine-2
MGG	May-Grünwald-Giemsa
MEP	Progéniteur érythro-mégacaryocytaire
Mk.	Mégacaryocytes
Mono.	Monocytes
MPP	Progéniteur multipotent
MTS	<i>Mitochondrial Targetting Sequence</i> (Séquence d'adressage à la mitochondrie)
N	
N-Tf	Transferrine dont le lobe C-terminal est saturé par un atome de fer
NK	<i>Natural Killer</i>
NMIIA	Non-Muscle Myosine IIA
ns	Non significatif
NTBI	<i>Non-Transferrin Bound Iron</i> – Fer non lié à la Transferrine
O	
Ortho	<i>Orthochromatic erythroblast</i>
Osm	Oncostatine M
P	
PA motif	<i>protease-associated motif</i>
pb	Paires de base

P	
PCBP2	<i>Poly (rC) binding protein 2</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEM	Progéniteurs multipotents érythro-myéloïdes
PH.	<i>Pleckstrin homology-like domain</i>
PHD2	Prolyl Hydroxylase 2
PIP2	Phosphatidyl-inositol diphosphate
PIP3	Phosphatidyl-inositol triphosphate
PI3K	<i>Phosphatidyl Inisitol 3 Kinase</i>
Plaq.	Plaquette
PNB	Polynucléaire Basophile
PNE	Polynucléaire Éosinophile
PNN	Polynucléaire Neutrophile
Poly/Poly-E	Érythroblaste polychromatophile
Pro/Pro-E	Pro-érythroblaste
PTEN	<i>Phosphatase and TENsin homolog</i>
Pyr.	Pyrénocyte
Q	
qPCR	PCR quantitative
R	
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
Rétic.	Réticulocyte
RGD motif	Motif Arginine, Glycine, Aspartate
ROCK-1	<i>Rho associated Coiled-Coil containing protein Kinase 1</i>
ROS	Espèces réactives de l'oxygène – <i>Reactive Oxygen Species</i>
S	
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> – Erreur type
SH2	<i>Src homology 2</i>
shRNA	<i>Short Hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small Interfering RNA</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (polymorphisme d'un seul nucléotide)
SOCS-1	<i>Suppressor Of Cytokine Signalling-1</i>

S	
SOS	<i>Son Of Sevenless</i>
STAT1	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 1</i>
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
STAT5A	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5A</i>
STAT5B	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5B</i>
STEAP3	<i>Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate 3</i>
T	
Tf	TRANSFERRINE
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TFR1	Récepteur à la transferrine de type 1
TFR2	Récepteur à la transferrine de type 2
TRAIL	<i>Tumor-necrosis-factor related Apoptosis Inducing Ligand</i>
TWEAK	<i>TNF-related WEAK inducer of apoptosis</i>
TWSG1	<i>Twisted Gastrulation 1</i>
U	
UTR	<i>Untranslated region (Région non traduite)</i>
V	
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
W	
WT	<i>Wild-type</i>
Y	
YQRV motif	Motif Tyrosine, Glutamine, Arginine, Valine
YTRF motif	Motif Tyrosine, Thréonine, Arginine, Phénylalanine

Introduction

I. L'érythropoïèse humaine

L'**érythropoïèse** est le processus aboutissant à la production de **globules rouges (GR)**, aussi appelés érythrocytes ou hématies) à partir de cellules souches hématopoïétiques. C'est un processus dynamique générant $2 \cdot 10^{11}$ GRs par jour¹, dont la durée de vie est de 120 jours. Les GRs assurent le transport de l'oxygène capté au niveau des poumons jusqu'aux différents tissus de l'organisme, grâce à la protéine **hémoglobine** qu'ils contiennent en abondance. L'hémoglobine étant constituée de quatre chaînes de globine, et chacune associée à une molécule d'hème contenant un atome de **fer** pour cofacteur, l'érythropoïèse est le processus le plus consommateur en fer de l'organisme. On estime à 25mg la consommation journalière en fer du tissu érythroïde à l'âge adulte. En cas de perte importante de sang (hémorragies, don de sang), ou de diminution de la pression partielle en oxygène (altitude élevée), la production de GRs peut être multipliée par 7 ; et avec elle, la consommation en fer. Cela sous-entend l'existence d'un dialogue entre l'**homéostasie du fer** dans l'organisme et l'érythropoïèse.

Dans cette introduction, seront détaillés le processus d'érythropoïèse humaine adulte ainsi que ses régulations. À cette occasion, les liens étroits entre l'érythropoïèse et le métabolisme du fer seront explorés. Finalement, cette introduction se conclura sur le récepteur à la transferrine de type 2, protéine à la jonction entre ces deux processus.

1. Généralités sur l'hématopoïèse

L'**hématopoïèse** est le processus aboutissant à la production de toutes les cellules sanguines à partir d'une seule et même population cellulaire : les **cellules souches hématopoïétiques** (*Hematopoietic Stem Cells, HSCs*). Ces cellules sont nichées dans un tissu spongieux appelé **moelle osseuse**, trouvé au centre des os du bassin et des os plats tels que le sternum. Il est à noter que ces cellules peuvent être mobilisées (c'est-à-dire incitées à sortir de la moelle osseuse) par divers facteurs². Dans la moelle osseuse, les HSCs ne représentent que 0.05% des cellules, mais sont maintenues par leur capacité d'**autorenewement** ; le fait que cette capacité leur soit propre ou conférée par leur niche reste un débat ouvert³. Leur **multipotence** leur permet de générer les diverses populations sanguines : plaquettes, érythrocytes, monocytes, granulocytes, cellules

dendritiques, ou encore lymphocytes. Les cytokines et facteurs de croissance présents dans la niche favorisent la survie de ces cellules, mais facilitent également l'engagement vers une voie de différenciation selon les besoins de l'organisme. L'importance de la **niche hématopoïétique** dans la régulation du processus d'hématopoïèse est un élément émergent au sein de la communauté scientifique. Constituée de diverses cellules (macrophages, adipocytes, ostéoblastes, fibroblastes, ...), la niche hématopoïétique assure aux HSCs un microenvironnement favorable à leur maintien. Malgré cela, le pool de HSCs tend à s'étioler avec l'âge⁴.

Le maintien des HSCs est assuré par un pool dit « quiescent » (ou « de longue durée » (*long-term HSCs*)) qui va alimenter de façon ponctuelle un second pool « non-quiescent » (parfois appelé « à courte échéance » (*short-term HSCs*)). Ce dernier va générer des **progéniteurs multipotents** (*Multi-Potent Progenitor, MPP*) dont la capacité d'autorenouvellement s'amenuise (**figure 1**).

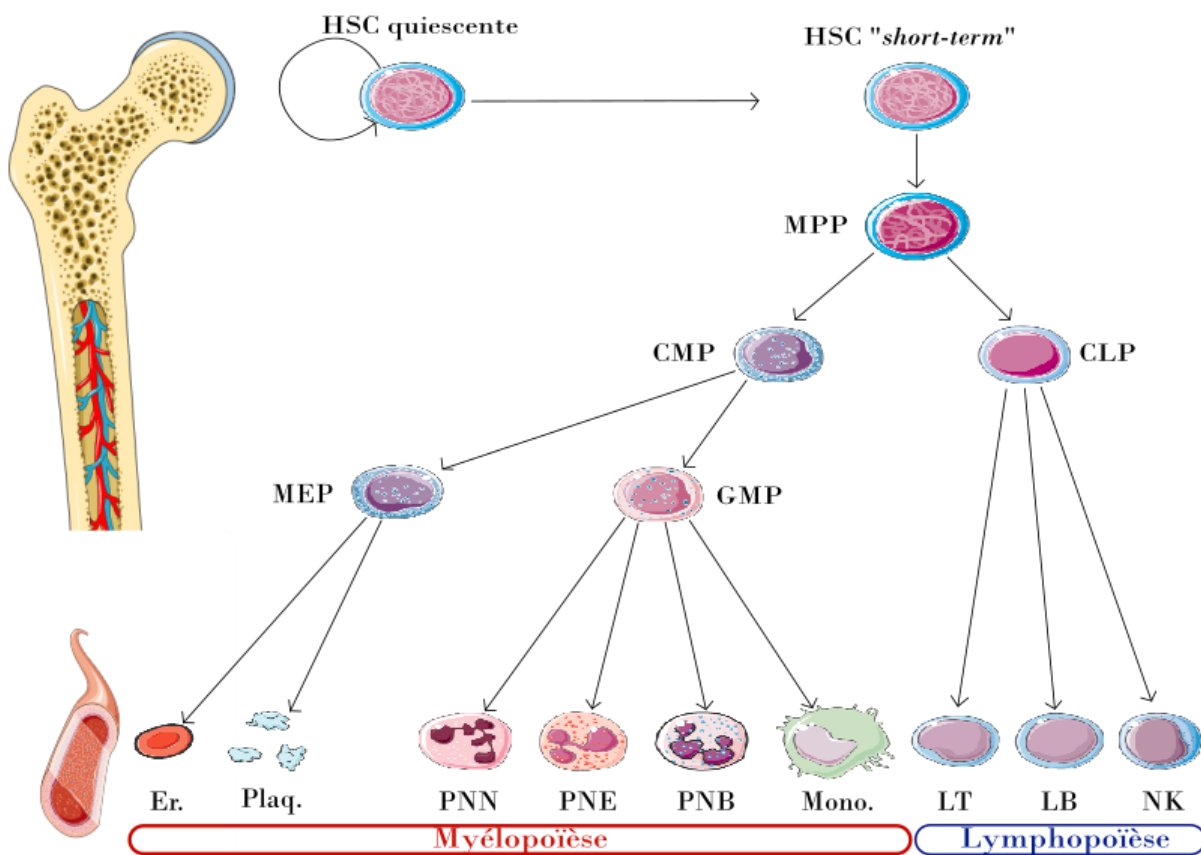


Figure 1 : Modèle classique et hiérarchique de l'hématopoïèse humaine.

Les cellules souches hématopoïétiques génèrent chez l'Homme toutes les cellules sanguines. Le pool quiescent (souvent appelé « *long-term* ») assure le maintien des cellules souches dans la moelle osseuse, tandis que les « *short-term* » s'engagent dans la différenciation. Elles se différencient de façon séquentielle et hiérarchique, selon deux

voies de différenciation majeures : la myélopoïèse (à gauche) et la lymphopoïèse (à droite). Cette différenciation se produit dans la moelle osseuse, et les cellules matures rejoignent la circulation sanguine. (**HSC**. Cellule souche hématopoïétique ; **MPP**. Progéniteur multipotent ; **CMP**. Progéniteur myéloïde commun ; **CLP**. Progéniteur lymphoïde commun ; **MEP**. Progéniteur érythro-mégacaryocytaire ; **GMP**. Progéniteur granulo-monocytaire Er. Érythrocyte ; **Plaq**. Plaquette ; **PNN**. Polynucléaire Neutrophile ; **PNE**. Polynucléaire Éosinophile ; **PNB**. Polynucléaire Basophile ; **LT**. Lymphocyte T ; **LB**. Lymphocyte B ; **NK**. Natural Killer.). [Schéma réalisé à partir de la banque d'images Servier Medical Art®.]

Un premier clivage s'effectue alors avec soit une orientation vers la **myélopoïèse** (qui génèrera les plaquettes, les érythrocytes, les monocytes, et les granulocytes), soit vers la **lymphopoïèse**. Ce clivage s'illustre par la différenciation des MPPs en **progéniteurs myéloïdes communs** (*Common Myeloid Progenitor*, **CMP**) ou en **progéniteurs lymphoïdes communs** (*Common Lymphoid Progenitor*, **CLP**) respectivement (**figure 1**). La lymphopoïèse ne sera pas traitée dans ce manuscrit.

Lors de la myélopoïèse, les CMPs se différencient soit en **progéniteurs granulo-monocytaires** (*Granulocyte Monocyte Progenitor*, **GMP**) qui génèrent les différentes populations granulocytaires, et monocytaires, soit en **progéniteurs érythro-mégacaryocytaires** (*Megakaryocyte Erythroid Progenitor*, **MEP**) à l'origine de la formation de plaquettes et d'érythrocytes. Ces différentes étapes de maturation se déroulent dans la moelle osseuse, avant sortie des cellules matures ou quasi-matures dans la circulation sanguine (**figure 1**).

Bien que d'apparence rigide dans la hiérarchie et le déroulement des différentes étapes d'« engagement » et de maturation, diverses études lors des dix dernières années tendent à montrer qu'une certaine souplesse existe dans ces processus de différenciation. Ainsi, en 2013, il a été montré que l'engagement n'était pas forcément séquentiel puisque Yamamoto et collaborateurs⁵ ont pu dériver des MEPs de souris directement à partir de HSCs. Les travaux de Notta et collaborateurs⁶ en 2016 semblent confirmer ce fait en montrant que les MEPs humaines dérivent majoritairement des HSCs, et non pas des CMPs comme le prédisait le modèle classique. La combinaison des techniques de phénotypage par cytométrie en flux et de single-cell RNAseq à partir de 3 000 HSCs humaines, issues soit de foie fœtal, soit de sang de cordon, soit de moelle osseuse adulte, leur a permis de mettre en évidence une acquisition très précoce de potentialité érythroïde et mégacaryocytaire (**figure 2**). Pellin et collaborateurs en 2019⁷, en utilisant les mêmes techniques sur les cellules mononucléées issues de moelles osseuses humaines, établissent un

modèle se rapprochant plus du modèle classique, à l'exception de l'émergence des basophiles qu'ils placent dans la branche érythro-mégacaryocytaire (**figure 2**). La hiérarchie dans l'hématopoïèse humaine est donc encore sujette à débat.

Pour des raisons de droits d'auteurs, ces figures ont été retirées. Se référer aux articles :

A: Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny, Notta et al., Science, 2016. DOI: 10.1126/science.aab2116

B: A comprehensive single cell transcriptional landscape of human hematopoietic progenitors, Pellin et al., nature communications, 2019. DOI: 10.1038/s41467-019-10291-0

Figure 2 : Modèles revisités de la hiérarchie dans l'hématopoïèse humaine.

A) D'après Notta et al., 2016⁶. En haut, le modèle classique décrivant une étape obligatoire par le stade CMP pour la différenciation en cellules myéloïdes. En bas, le modèle revisité mettant en évidence une hiérarchie différentielle selon le stade de développement (fœtale versus adulte). On notera que les MEPs dérivent majoritairement des HSCs, contrairement à ce qui est décrit dans le modèle classique. De plus, l'hématopoïèse adulte s'illustre par un pool réduit de progéniteurs multipotents comparé à l'hématopoïèse fœtale, suggérant une perte progressive de la multipotence des progéniteurs hématopoïétiques avec l'âge. (**ER.** Érythrocytes ; **Mk.** Mégacaryocytes ; **Gran.** Granulocytes, **Mono.** Monocytes ; **Ly.** Lymphocytes).

B) D'après Pellin et al., 2019⁷. SPRING plot de 4 single-cell transcriptomes de progéniteurs humains. Chaque point représente une cellule, les couleurs correspondent à l'immunophénotype des cellules lors de leur isolation. Les progéniteurs basophiliques semblent émerger des progéniteurs générant les mégacaryocytes et les cellules érythroïdes (classiquement appelés MEP). (**P.** Progéniteurs précoces ; **Meg.** Mégacaryocytes ; **E.** Cellules érythroïdes ; **BaP.** Progéniteurs de basophiles ; **N.** Neutrophiles ; **M.** Monocytes ; **DC.** Cellules dendritiques ; **Ly.** Cellules lymphoïdes T/B/NK).

Pour la suite de ce manuscrit, une seule branche de l'hématopoïèse sera considérée : l'**érythropoïèse**.

2. L'érythropoïèse

A. L'ontogénèse de l'érythropoïèse

Si à l'âge adulte, la production de GRs se fait à partir de HSCs nichées dans la moelle osseuse, *via* une différenciation en MEPs, ce n'est pas le cas au cours du développement. En effet, chez les vertébrés, l'hématopoïèse – et donc l'érythropoïèse – s'effectue en plusieurs vagues, qui émergent de différents sites anatomiques⁸. La première vague commence tout d'abord dans des tissus extra-embryonnaires, plus exactement dans les **îlots sanguins du sac vitellin** émergents du 18^{ème} au 20^{ème} jour de gestation¹. Ces îlots sont constitués de cellules exprimant des marqueurs endothéliaux, au centre desquelles se forme la lumière du futur endothélium vasculaire. Ces structures produisent des cellules érythroïdes primitives, des macrophages et des mégacaryocytes, mais ne génèrent pas de cellules lymphoïdes (**figure 3**). La sortie des cellules érythroïdes primitives se fait de façon concomitante avec le début des battements du cœur au 21^{ème} jour de gestation⁹. De la 3^{ème} à la 6^{ème} semaine de gestation, les cellules érythroïdes primitives sont les seules à circuler dans l'embryon⁸. Un clivage est défini entre cette première vague générant une érythropoïèse dite « *primitive* » et les vagues suivantes générant une érythropoïèse qui est considérée « *définitive* ».

L'érythropoïèse définitive s'effectue en deux étapes : la première consiste en une première colonisation du foie fœtal par des **progéniteurs multipotents érythro-myéloïdes (PEM)** qui émergent du sac vitellin¹⁰. Ceux-ci sont en mesure de générer des cellules érythroïdes, myéloïdes et lymphoïdes, mais ne génèrent pas de HSCs (**figure 3**). La seconde consiste en l'émergence de HSCs lors de la 5^{ème} semaine de gestation à partir de cellules endothéliales au niveau de la région Aorto-Gonado-Mésonéphros (**AGM**), et dans d'autres sites artériels¹⁰. Elles ont la capacité de générer toutes les cellules du sang, dont les GRs, et de s'auto-renouveler. À leur tour, ces HSCs vont coloniser le **foie fœtal** vers la fin du premier trimestre de grossesse, et s'expandre. À partir du second trimestre de grossesse, elles migreront et s'implanteront dans la moelle osseuse (**figure 3**), qui est le siège de l'hématopoïèse définitive adulte comme discuté précédemment (Partie [I.1. Généralité sur l'hématopoïèse](#)). Bien que l'érythropoïèse primitive se fasse à partir de progéniteurs unipotents par stades de maturation progressifs et successifs comme pour l'érythropoïèse adulte, la dépendance cytokinique⁸, et les facteurs de transcription impliqués¹ diffèrent. Il est à noter que les globules rouges « primitifs » conservent leur noyau en sortant dans la circulation sanguine, et finissent par énucléer seulement au bout de plusieurs semaines, tandis que les globules rouges

« définitifs » émergent dans la circulation sanguine déjà énucléés. Une autre différence majeure consiste en les chaînes de globines exprimées par ces cellules érythroïdes ; le changement d'expression de chaîne de globine est séquentiel dans le temps, avec l'hémoglobine embryonnaire constituée des chaînes (ζ , ϵ) lors de l'érythropoïèse primitive, l'hémoglobine fœtale constituée de (α , γ) lorsque le siège de l'érythropoïèse est le foie fœtal⁹, puis finalement l'hémoglobine adulte (α , β) dans la moelle osseuse, dont l'affinité pour l'oxygène est réduite par rapport à l'hémoglobine fœtale. La synthèse d'hémoglobine sera traitée ci-après ([I.1.B.b.ii. La synthèse d'hémoglobine](#)).

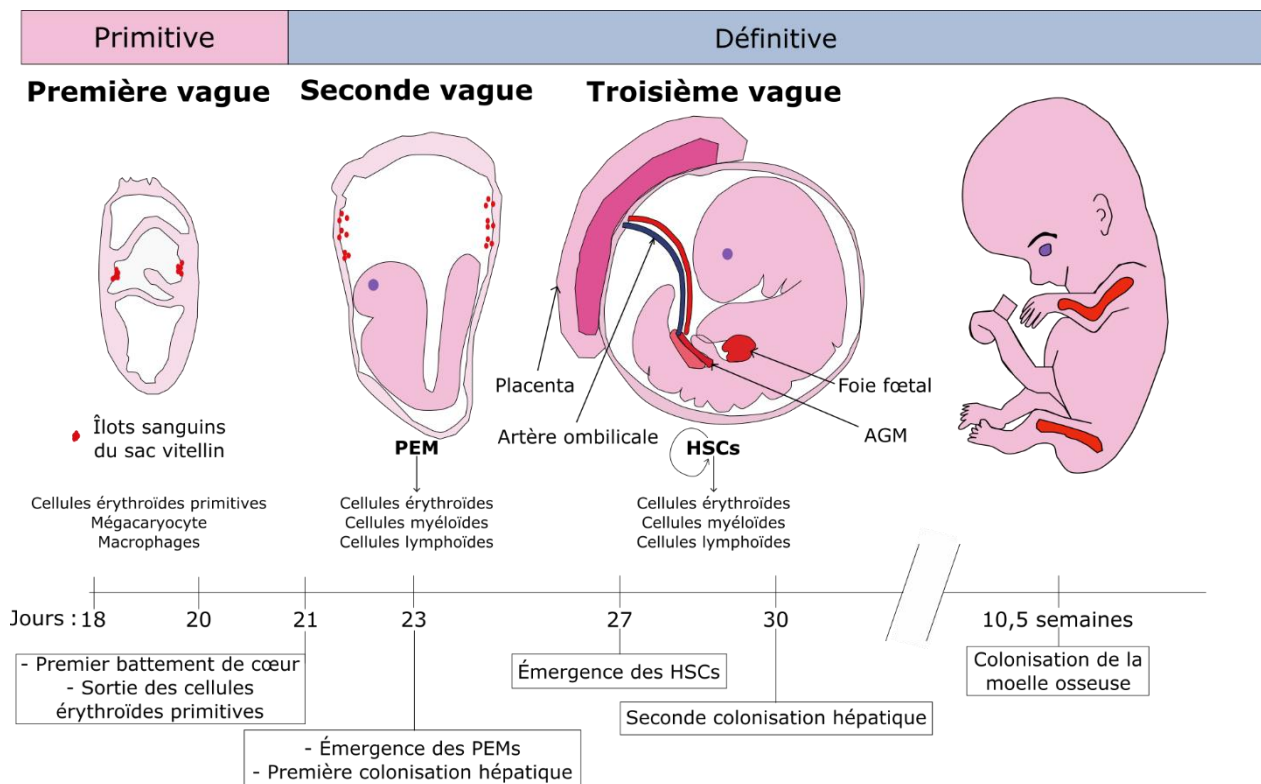


Figure 3 : Ontogénie de l'érythropoïèse.

Au cours du développement des mammifères, il est possible de distinguer 3 vagues d'érythropoïèse. La première consiste à l'émergence de cellules érythroïdes primitives à partir des îlots sanguins. Celles-ci commencent à circuler avec le premier battement de cœur et sont nucléées. Lors de la seconde, des progéniteurs multipotents érythro-myéloïdes (**PEMs**) émergent de ces mêmes îlots, vont coloniser le foie fœtal et générer des globules rouges de type « définitif » puisqu'elles sont énucléées. Lors de la troisième et dernière vague, des cellules souches hématopoïétiques (**HSCs**) émergent de l'endothélium hémogénique dans la région aorto-gonado-mésonephros (**AGM**), du placenta, et de l'artère ombilicale. Elles ont la capacité de s'autorenouveler. Elles vont tout d'abord migrer vers le foie fœtal avant de coloniser la moelle osseuse qui est le siège de l'érythropoïèse définitive adulte. Schéma inspiré de Nandakumar *et al.* 2016¹¹, et Tavian and Péault, 2005⁹.

B. L'érythropoïèse définitive adulte

Comme expliqué dans la partie I.1. Généralité sur l'hématopoïèse, le siège de l'érythropoïèse définitive adulte se trouve au sein de la moelle osseuse. Elle se fait plus exactement au sein d'**îlots érythroblastiques**, une structure constituée d'un macrophage central cerné de cellules érythroïdes qui sera discutée dans la partie I.3.B. L'îlot érythroblastique. L'érythropoïèse peut être subdivisée en deux phases : une première phase de prolifération des progéniteurs érythroïdes appelée « **érythropoïèse précoce** », et une seconde phase au cours de laquelle des changements morphologiques accompagnent la différenciation des précurseurs érythroïdes, appelée « **érythropoïèse tardive** » ou « **différenciation terminale** ». Le passage d'une phase à l'autre est finement régulé et s'accompagne d'une diminution des capacités de prolifération des cellules érythroïdes, et d'une maturation progressive et séquentielle. Cette maturation se termine dans la circulation sanguine après énucléation des précurseurs matures.

a. L'érythropoïèse précoce

L'érythropoïèse précoce marque l'engagement définitif des MEPs vers le lignage érythroïde, qui vont alors se différencier en *Burst Forming Unit – Erythroid* (**BFU-E**). Le stade BFU-E correspond au premier progéniteur dont la capacité de différenciation est totalement restreinte au lignage érythroïde. Les BFU-Es vont ensuite se différencier en *Colony Forming Unit – Erythroid* (**CFU-E**), dont la capacité de prolifération est réduite par rapport aux BFU-Es.

Ces deux stades de différenciation érythroïde ont d'abord été caractérisés de façon rétrospective par leur mise en culture *in vitro* en milieu semi-solide (méthyl-cellulose). Au bout de 14 jours de culture, les BFU-Es forment des colonies érythroïdes contenant plusieurs centaines d'érythroblastes hémoglobinisés (des « *bursts* »). Les CFU-Es forment de petites colonies contenant de 8 cellules à une centaine de cellules hémoglobinisées après 7 jours de culture. Cela met en évidence des capacités de prolifération différentes ; les BFU-Es étant à l'origine de bien plus de cellules. Le temps nécessaire à l'obtention des deux types de colonies suggère une différenciation séquentielle du stade BFU-E vers le stade CFU-E.

Plusieurs facteurs de croissance sont nécessaires à la survie, la prolifération et la différenciation des progéniteurs érythroïdes, tel que le *Stem Cell Factor* (**SCF**), ou l'érythropoïétine (**EPO**). Si les BFU-Es ne sont pas dépendantes d'EPO, elles commencent à exprimer le récepteur à

l'érythropoïétine (**EPOR**). La survie des CFU-Es et des précurseurs érythroïdes immatures est cependant strictement dépendante de la présence d'EPO (**figure 4**). Le niveau d'EPO circulante étant modulé par l'hypoxie (*cf.* [I.3.A.b. Le couple EPO/EPOR](#)), cette dépendance des CFU-Es à l'EPO constitue un mécanisme de régulation du taux d'érythropoïèse (*i.e.* : du nombre de GRs produits).

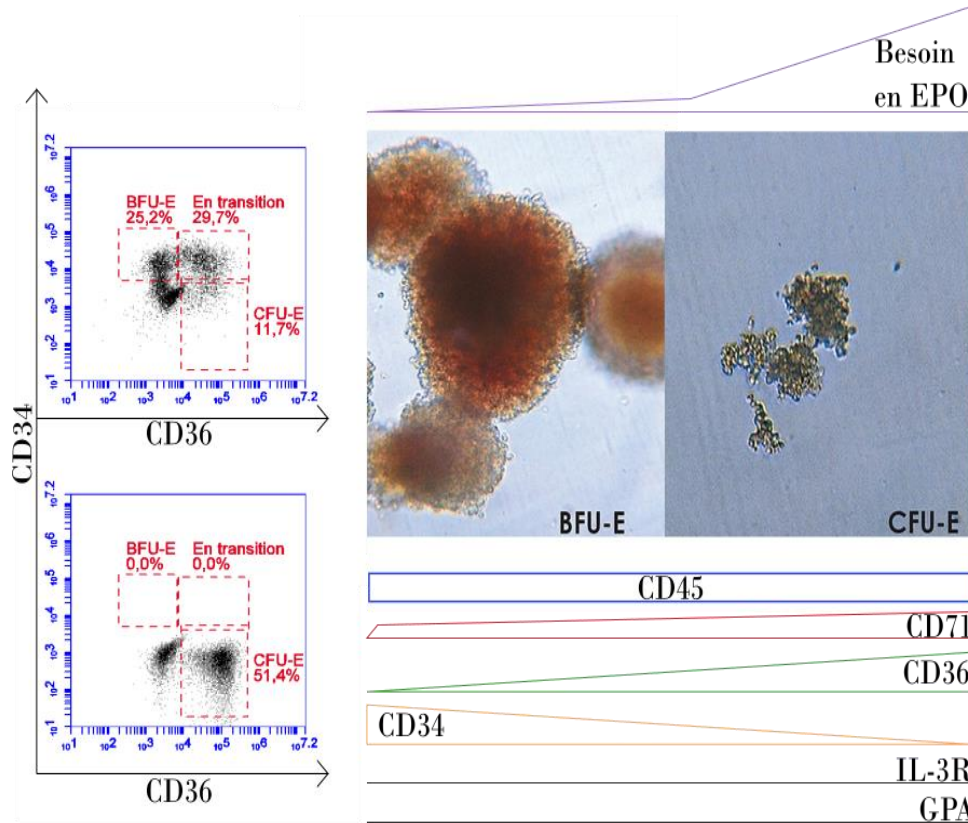


Figure 4 : L'érythropoïèse précoce.

Les BFU-Es et CFU-Es ne sont pas distinguables morphologiquement. Elles se distinguent cependant par leur sensibilité aux facteurs de croissance – en particulier à l'érythropoïétine (EPO), et par leurs marqueurs de surface. Le CD45 est exprimé par les BFU-Es et les CFU-Es, et le CD71 augmente avec la maturation en CFU-E. Les BFU-E expriment encore le CD34 qui est perdu lors de la transition en CFU-E, tandis que ces dernières acquièrent le CD36. L'expression de l'IL-3R est perdue dès le stade BFU-E, tandis que l'acquisition de la glycophorine A (GPA) se fait plus tardivement.

Outre leur clonogénicité, les BFU-Es et CFU-Es ne sont pas distinguables morphologiquement (**figure 4**). Afin de les isoler, le groupe de Mohandas Narla a établi en 2014 leur immunophénotype¹². Ni les BFU-Es, ni les CFU-Es n'expriment le récepteur à l'interleukine-3 (**IL-3R**), qui est exprimé par les cellules granulo-monocytaires. Elles n'expriment pas non plus la Glycophorine A (**GPA**, aussi appelée cluster de différenciation 235a, CD235a), qui est pourtant un « marqueur érythroïde », mais qui est acquise un peu plus tard dans la différenciation. Toutes deux expriment le cluster de différenciation 45 (**CD45**), pourtant marqueur des leucocytes. Une augmentation d'expression progressive du cluster de différenciation 71 (**CD71**, qui correspond au récepteur à la transferrine de type 1, **TFR1**) est observée du stade BFU-E au stade CFU-E. Cependant, la distinction entre ces stades se fait surtout sur l'expression du cluster de

différenciation 34 (**CD34**), exprimé par les HSC jusqu'au stade BFU-E, mais pas par les CFU-E ; ainsi que sur celle du cluster de différenciation 36 (**CD36**) exprimé par les CFU-E et non par les BFU-E. Ainsi, l'isolation des cellules [CD45⁺, GPA⁻, IL-3R⁻, CD34⁺, CD36⁻, CD71^{low}] et [CD45⁺, GPA⁻, IL-3R⁻, CD34⁻, CD36⁺, CD71^{high}] permet l'obtention de populations à ~90% pures de BFU-E et CFU-E respectivement. Il est à noter cependant que même la taille des colonies est très hétérogène au sein de ces populations, ce qui sous-entend que ces populations sont hétérogènes.

En se basant sur la technique de *single-cell RNAseq*, le groupe de Mohandas Narla a pu montrer qu'il serait possible de distinguer cinq populations depuis le stade BFU-E jusqu'au stade CFU-E en utilisant d'autres marqueurs de surface [*Meet-the-expert session, congrès de l'European School of Hematology 2019, Erythropoiesis control and ineffective erythropoiesis*]. De plus, en utilisant la sonde *CellTrace Violet* permettant de suivre le nombre de divisions cellulaires, ce groupe observe une division de « BFU-E » environ toutes les 8h, tandis que lors de l'érythropoïèse terminale (cf. paragraphe suivant), une division est effectuée toutes les 24h environ. Les « CFU-Es », elles, auraient un temps de division intermédiaire. [*Séance plénière du 39^{ème} congrès de la Société Française d'Hématologie, Mohandas Narla*].

b. L'érythropoïèse tardive

i. Caractéristiques morphologiques et immunophénotypiques

Lors de l'érythropoïèse tardive, la capacité des érythroblastes à proliférer est réduite par rapport à la phase précédente. Les CFU-Es se différencient en proérythroblastes (**Pro-E**), premier précurseur érythroïde immature marquant le début de la différenciation terminale.

Les Pro-Es se différencient en érythroblastes basophiles-1 (**Baso-E1**, aussi appelé précoce), qui vont eux même générer des érythroblastes basophiles-2 (**Baso-E2**, tardif). Les Baso-E2 vont se différencier en érythroblastes polychromatophiles (**Poly-E**), qui vont se différencier à leur tour en érythroblastes acidophiles (**Acido-E**). Les Poly-Es et Acido-Es sont considérés comme des précurseurs matures ([figure 5](#)).

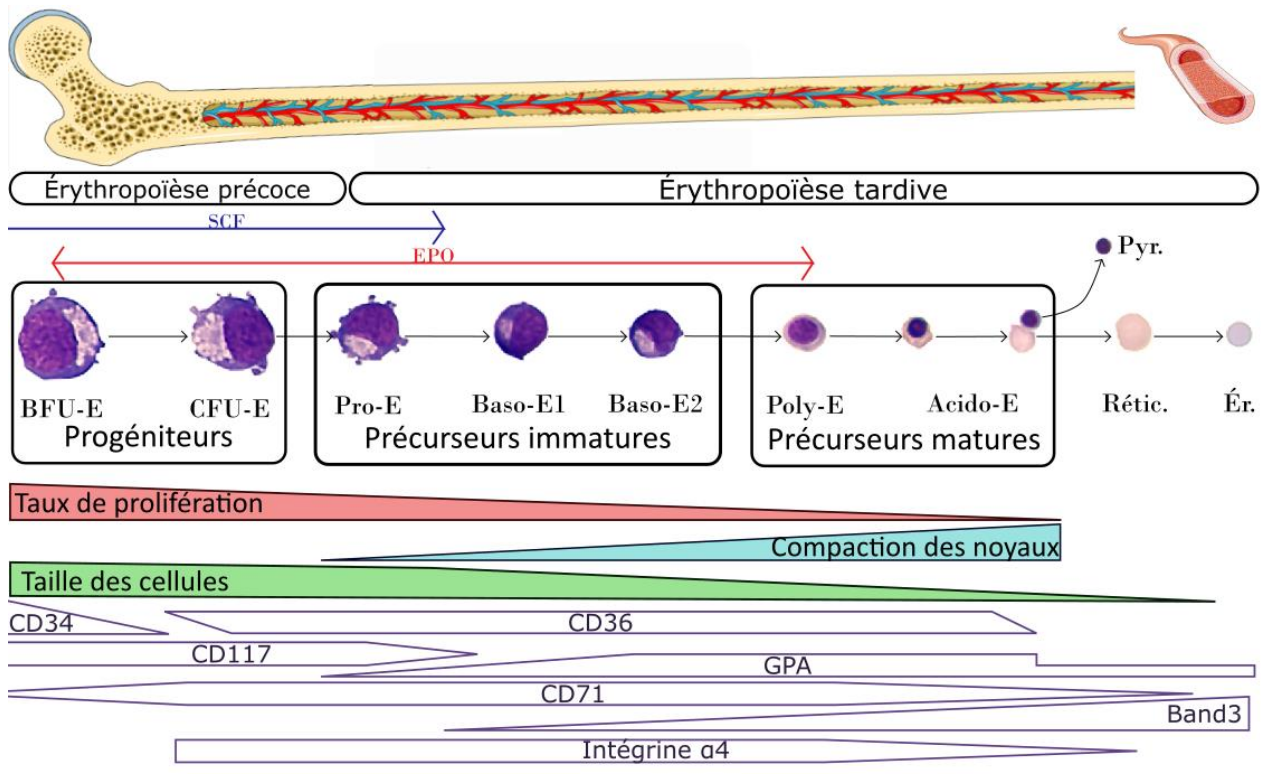


Figure 5 : L'érythropoïèse humaine : des progéniteurs aux érythrocytes.

L'érythropoïèse humaine est un processus dynamique et continu qui se subdivise en deux phases : l'érythropoïèse dite « précoce » puis l'érythropoïèse dite « terminale ». L'érythropoïèse est assurée par la présence de deux facteurs majeurs : le *Stem Cell Factor* (SCF) et l'érythropoïétine (EPO). Ils favorisent la survie et la prolifération des érythroblastes, dont la capacité à se diviser diminue du stade BFU-E au stade érythroblaste acidophile. Lors de l'érythropoïèse tardive, la taille des cellules diminue, et la chromatine se compacte. Jusqu'au stade acidophile, le processus de différenciation se fait dans la moelle osseuse, puis les réticulocytes sortent dans la circulation sanguine où ils finiront de maturer. Les marqueurs de surface glycophorine A (GPA), Band3 et Intégrine $\alpha 4$ permettent d'identifier les différents stades de différenciation de la phase tardive ; tandis que le CD34 et le CD36 permettent d'identifier les BFU-E et CFU-E respectivement. **BFU-E.** *Burst Forming Unit – Erythroid* ; **CFU-E.** *Colony Forming Unit – Erythroid* ; **Pro-E** Proérythroblaste ; **Baso-E1** Érythroblaste Basophile 1 ; **Baso-E2.** Érythroblaste Basophile 2 ; **Poly-E** Érythroblaste polychromatophile ; **Acido-E** Érythroblaste acidophile ; **Rétic.** Réticulocyte ; **Pyr.** Pyrénocyte ; **Ér.** Érythrocyte.

Les différentes étapes de différenciation de l'érythropoïèse tardive se faisant par **division symétrique**, un Pro-E va générer 16 érythroblastes acidophiles. Un Acido-E n'est plus en mesure de proliférer, et en extrudant son noyau va générer un réticulocyte (*cf. I.1.B.c. Condensation du noyau et énucléation*). Comme pour les CFU-Es, la survie et la prolifération des érythroblastes lors

de la différenciation terminale repose sur la présence d'EPO, principal régulateur de l'érythropoïèse.

L'érythropoïèse terminale se caractérise par des changements morphologiques spécifiques à chaque stade de différenciation. La taille des érythroblastes diminue avec leur maturation (de 20-30µm pour un Pro-E, à 10µm pour un Acido-E), et une condensation progressive de la chromatine est observée ; facilitant *in fine* l'extrusion du noyau ([figure 5](#)). La coloration de May-Grünwald-Giemsa (**MGG**) permet d'identifier les différents stades grâce au colorant éosine qui va se fixer sur les résidus basophiles tels que les acides nucléiques, et aux colorants bleu de méthylène et azur de méthylène qui vont se fixer sur les résidus acidophiles, comme l'hémoglobine. Cette seconde coloration est de plus en plus prépondérante puisque le contenu en hémoglobine augmente fortement avec la différenciation, tandis que le contenu en ARN du cytoplasme (et donc sa basophilie) diminue ([figure 5](#)).

Outre ces changements morphologiques, il est possible d'identifier les différents stades de différenciation par cytométrie en flux. En effet, le marqueur CD36 continue d'être exprimé jusqu'au stade acidophile, tandis que CD45 et le cluster de différenciation 117 (**CD117**, récepteur du SCF, aussi appelé C-KIT) ne sont plus exprimés après le stade Pro-E. Ainsi, la survie des érythroblastes lors de la différenciation terminale n'est plus dépendante du SCF. Le « marqueur érythroïde » GPA commence à être exprimé au stade Pro-E, atteint son maximum d'expression au stade basophile-2 et continuera d'être exprimé par les stades de différenciation suivants et par les globules rouges matures – ainsi plus qu'un marqueur érythroïde, il est un marqueur de différenciation terminale. Cependant, l'expression de la GPA n'est informative qu'entre les stades proérythroblaste et érythroblaste basophile-2, et non au-delà. Le CD71 sera exprimé jusqu'au stade Poly-E où il commencera à diminuer. Son expression dans les globules rouges est nulle, et il est également utilisé comme marqueur pour évaluer l'état de maturation des réticulocytes¹³ (voir partie [I.2.B.d. Maturation des réticulocytes en globules rouges](#)). L'expression de TFR1, elle, ne varie pas grandement en amplitude lors de l'érythropoïèse terminale. De ce fait, il est ardu d'être résolutif avec ces marqueurs. Hu et collaborateurs en 2013¹⁴ ont pu mettre en évidence que le transporteur membranaire échangeur d'anions Band3 était acquis progressivement depuis le stade basophile tandis que l'expression de l'intégrine $\alpha 4$ (aussi appelée CD49d) s'amenuise à partir du stade Poly-E ([figure 6](#)).

Pour des raisons de droits d'auteurs, cette figure a été retirée. Se référer à l'article :

Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo, Hu et al, Blood, 2013. DOI: 10.1182/blood-2013-01-476390

Figure 6 : Isolement et caractérisation d'érythroblastes humains (d'après de Hu et al., 2013¹⁴).

(A) Les érythroblastes ont été marqués contre la GPA, l'intégrine $\alpha 4$, et Band3 après 7 jours et 14 jours de culture *in vitro*. L'expression de l'intégrine $\alpha 4$ et de Band3 a alors été évaluée sur les cellules GPA⁺. Les érythroblastes ont été triés selon les gates I, II, III, IV et V comme représenté.

(B) Cytospin des érythroblastes triés dans le panel précédent, et colorés avec la coloration MGG. La Gate I correspond aux proérythroblastes (**Pro**), la II aux érythroblastes basophiles-1 (**Early Baso**) et la III aux basophiles-2 (**Late Baso**). La gate IV correspond aux érythroblastes polychromatophiles (**Poly**) et la V aux érythroblastes acidophiles (*orthochromatic erythroblasts* – **Ortho**).

ii. La synthèse d'hémoglobine

La synthèse d'hémoglobine est cruciale pour le transport d'oxygène et de dioxyde de carbone. L'hémoglobine se compose de 4 chaînes de globines (2 chaînes α et 2 chaînes β à l'âge adulte) et d'un cofacteur hème par chaîne de globine. La production de chacun des composants est finement régulée pour conserver un ratio 2:2:4 (**figure 7**). Ce cofacteur va permettre la fixation d'une molécule de dioxygène par chaîne de globine.

Hémoglobine adulte :

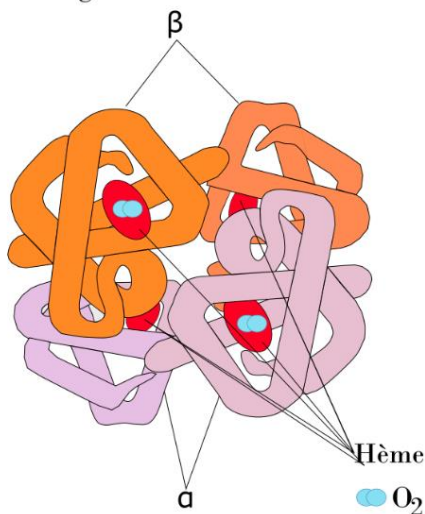


Figure 7 : La structure de l'hémoglobine.

Dans chaque molécule d'hémoglobine se trouvent deux exemplaires de deux types de chaîne de globine (chez l'adulte, deux chaînes α (teintes de rose) et deux chaînes β (teintes d'orange)). Chacune est complexée avec un hème (indiqué en rouge), structure contenant un atome de fer permettant la fixation de l'oxygène (en bleu).

Le facteur limitant de la synthèse d'hémoglobine (**Hb**) est la production d'hème, qui se compose d'un atome de fer, élément dont la biodisponibilité est relativement faible. Environ 25mg de fer sont consommés quotidiennement par la moelle osseuse, ce qui correspond à la quantité de fer recyclée par érythrophagocytose des érythrocytes sénescents (cf. la partie [II.1. La circulation du fer dans l'organisme](#)). Une étude ferrocinétiq ue utilisant de la transferrine marquée au Fe⁵⁹ dans des individus sains a permis de montrer qu'en quelques minutes, environ 85% du fer injecté est absorbé par la moelle osseuse pour la production d'hème¹⁵. Si 80% de l'hème est produit par les cellules érythroïdes pour la production d'Hb, l'hème est également nécessaire au fonctionnement des cytochromes, et d'enzymes telles que la catalase, ou les peroxydases.

Chez les vertébrés, la synthèse d'hème commence dans la mitochondrie où l'enzyme 5'-aminolévulinate synthase (**ALAS**) produit l'acide 5-aminolévulique (**ALA**) à partir de glycine et de succinyl-CoA. Il existe deux gènes encodant ALAS : *ALAS1* est exprimé ubiquitairement tandis qu'*ALAS2* est exprimé spécifiquement dans le tissu érythroïde, reflétant le besoin en hème de ce tissu. Huit molécules de glycines et un atome de fer sont nécessaires à la synthèse d'hème. L'invalidation du transporteur de glycine GlyT1 chez la souris provoque la mort des souriceaux lors du premier jour post-natal, et ces souriceaux ont une anémie hypochrome microcytaire (*i.e.* : les globules rouges sont plus petits et appauvris en Hb)¹⁶.

Les molécules d'ALA sont exportées dans le cytoplasme où elles subissent 5 réactions enzymatiques aboutissant au coproporphyrinogène III qui sera oxydé en protoporphyrinogène IX dans la mitochondrie. Le protoporphyrinogène IX est lui-même oxydé en protoporphyrine IX dans laquelle l'enzyme ferrochélatase insère un ion ferreux (Fe²⁺). L'hème ainsi produit est un régulateur négatif d'*ALAS1*, tandis que la régulation d'*ALAS2* n'est dépendante que des niveaux intracellulaires de fer comme nous le verrons dans la partie [II.3.A. Mécanismes de régulation cellulaire](#). L'hème est exporté dans le cytoplasme depuis la mitochondrie par *Feline leukemia virus subgroup C receptor 1B* (**FLVCR1B**)¹⁷, où il est intégré dans les hémoprotéines telles que l'Hb. L'accumulation d'hème dans la cellule étant hautement toxique, les hèmes non utilisés sont exportés par *Feline leukemia virus subgroup C receptor 1A* (**FLVCR1A**), assurant la survie cellulaire. La concentration en hème au sein de la cellule érythroïde régule la prolifération et la différenciation terminale comme le démontre l'invalidation de chacun de ces exportateurs d'hème, ou de l'hème oxygénase-1 (**HO-1**) responsable du catabolisme de l'hème en cas d'accumulation excessive¹⁷⁻²⁰.

L'excès de fer dans la cellule pouvant mener à la réaction de Fenton ($\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+}_{(\text{aq})} + \text{OH}^-_{(\text{aq})} + \text{HO}^\bullet$) et donc à la production d'espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, **ROS**), il peut entraîner de graves dommages à la cellule. L'entrée de fer dans la cellule, son stockage et son utilisation dans la synthèse d'hème sont extrêmement régulés, par des systèmes qui seront plus explorés dans la partie [II.3. Les mécanismes de régulation liés au fer](#).

Si la quantité d'Hb par globule rouge est comprise dans un intervalle relativement restreint, le taux d'hémoglobine varie avec l'âge, ainsi qu'avec le sexe de l'individu²¹. De ce fait, le seuil de l'anémie est fixé à 12g/dL pour une femme et à 13g/dL pour un homme. Malgré la caractérisation des taux d'hémoglobine selon l'âge et le sexe, la quantité de fer total au sein des érythroblastes reste inconnue en raison de la difficulté technique de mesurer le pool cellulaire de fer.

c. Condensation du noyau et énucléation

Chez les mammifères, les globules rouges circulants sont anucléés. D'un point de vue évolutif, cela leur confère un avantage pour leur flexibilité (facilitant leur passage dans les capillaires terminaux) et libère de l'espace ce qui permet d'augmenter leur contenu en hémoglobine. Les érythroblastes acidophiles ont un noyau extrêmement compacté, qui sera extrudé – donnant ainsi un réticulocyte anucléé et un pyrénocyte (*i.e.* le noyau compacté cerné d'une fine couche de cytoplasme entouré d'une membrane plasmique).

Afin d'extruder leur noyau au stade acidophile, une condensation de la chromatine s'effectue lors de l'érythropoïèse tardive. La condensation de la chromatine s'accompagne d'une répression globale de l'expression génique, à l'exception des gènes spécifiques du globule rouge²². Cette condensation semble médiée par la déacétylation des histones, puisque l'inhibition des histones déacétylases (**HDACs**) par un inhibiteur ou par un *short hairpin RNA* (**shRNA**)^{23,24} ou l'up-régulation de l'histone acétyltransférase GCN5 bloque la condensation du noyau et l'enucléation²⁵.

Lors du processus de mort cellulaire programmée par apoptose, une condensation de la chromatine et du noyau est également observée ; or l'apoptose est connue pour jouer un rôle important dans l'érythropoïèse terminale (cf. [I.3.C.a. La régulation positive par l'induction des caspases](#)). En effet, le *knockdown* (**KD**, c'est-à-dire l'inhibition de l'expression) de la caspase-3 provoque un blocage de différenciation du stade Pro-E au stade Baso-E1²⁶. Zhao et collaborateurs ont montré en 2016 que des ouvertures transitoires de l'enveloppe nucléaire se créaient au début de la différenciation

terminale chez la souris. La lamine B est une protéine plateforme (« *scaffold* ») de la lamine nucléaire, faisant le lien entre l'enveloppe nucléaire et la chromatine²⁷. La formation de ces ouvertures semble médiée par le clivage de la lamine B par la caspase-3, qui avait également été suggéré par Zermati et collaborateurs en 2001²⁶. Cela est en contradiction avec les travaux de Krauss *et al.*, qui ont montré en 2005 qu'il n'y avait pas de clivage des protéines nucléaires substructurales, et en particulier de la lamine B qui reste intacte²⁸. Zhao et collaborateurs observent de plus « une fuite » sélective des histones H2A, H2AX et H1 dans le cytoplasme où elles seraient dégradées par le protéasome, tandis que le variant H2AZ resterait dans le noyau²⁹.

La diminution du contenu nucléaire en histones reste cependant controversée. En effet, lors d'une étude précédente de Popova et collaborateurs, et avec les données générées par notre équipe, la diminution de la quantité d'histones au cours de la différenciation n'est pas observée^{23,30}. De plus, l'analyse par spectrométrie de masse des érythroblastes humains et murins en cours de différenciation est en faveur de la conservation des histones au sein du noyau [Emilie-Fleur Gautier & Marjorie LEDUC, *et al.*, soumis]. Le processus de condensation du noyau et le rôle qu'y jouent les histones lors de l'érythropoïèse reste donc à clarifier.

Suite à la condensation du noyau, celui-ci est acheminé latéralement à proximité de la membrane plasmique puis extrudé. L'inhibition de l'E3 ubiquitine ligase TRIM58 (*Tripartite Motif Containing 58*), qui favorise la dégradation du moteur moléculaire DYNÉINE par le protéasome, déstabilise l'organisation des microtubules ce qui affecte la position du noyau, et donc l'énucléation³¹. L'implication du cytosquelette ne s'arrête pas là, puisque l'utilisation de l'inhibiteur de la polymérisation de l'actine Cytochalasine D inhibe également l'énucléation³². Les Rac GTPases, connues pour leur implication dans la régulation des différentes protéines du cytosquelette sont également impliquées dans le processus d'énucléation puisque l'utilisation de leur inhibiteur chimique NSC23766 inhibe l'énucléation de façon dose-dépendante³³. Finalement, l'énucléation en tant que telle est médiée par la formation d'un anneau contractile d'actine (*Contractile Actin Ring*, **CAR**) entre le noyau pycnotique et le futur réticulocyte³⁴. L'énucléation ressemble à un processus de cytokinèse asymétrique, impliquant entre autre la myosine IIB (*Non-Muscle Myosin IIB*, **NMIIB**)³⁵, connue pour son interaction avec l'actine³⁶. Finalement, le trafic de vésicules d'endocytoses et la formation de vacuoles entre le noyau et le réticulocyte sont également impliqués puisque l'inhibition du trafic de vésicules clathrine-dépendantes bloque

l'énucleation des érythroblastes murins issus de foie fœtal, sans toutefois affecter le processus de différenciation, tandis que l'induction de la vacuolin-1, qui favorise la formation de vésicules, augmente le pourcentage d'énucleation³⁷. De ce fait, l'énucleation est un processus complexe se faisant en plusieurs étapes : tout d'abord, une polarité nucléaire est établie *via* les microtubules. Puis, un anneau contractile d'actine-myosine se forme entre le futur pyrénocyte et le futur réticulocyte. Finalement, la formation de vésicules et la fusion de rafts lipidiques entre eux finissent de les dissocier (**figure 8**). Le réticulocyte conserve la majorité du cytoplasme (environ 200 fL, pour une surface de 175 μm^2), tandis que le pyrénocyte n'en retient qu'une faible portion (50 fL, pour une surface de 110 μm^2)³⁰ et serait rapidement phagocyté par le macrophage central de l'îlot érythroblastique (voir partie [II.2. Transfert au sein de l'îlot érythroblastique](#)). La phagocytose des pyrénocytes est facilitée grâce à l'exposition de phosphatidylsérine (« *eat me* » signal, exposé par les cellules apoptotiques) sur le feuillet externe de leur membrane³⁸. Le réticulocyte, quant à lui, migre dans la circulation sanguine où il finira sa maturation. Il contient toute l'hémoglobine, est riche en ARN et a encore quelques organites telles que les mitochondries. Une ségrégation préférentielle des protéines du cytosquelette (ankyrine, spectrine, protéine 4.1, ...) s'effectue avec le réticulocyte plutôt qu'avec le pyrénocyte³⁰. Des protéines qui sont ancrées au cytosquelette telles que la glycophorine A, ou la bande 3 sont majoritairement retenues dans le réticulocyte.

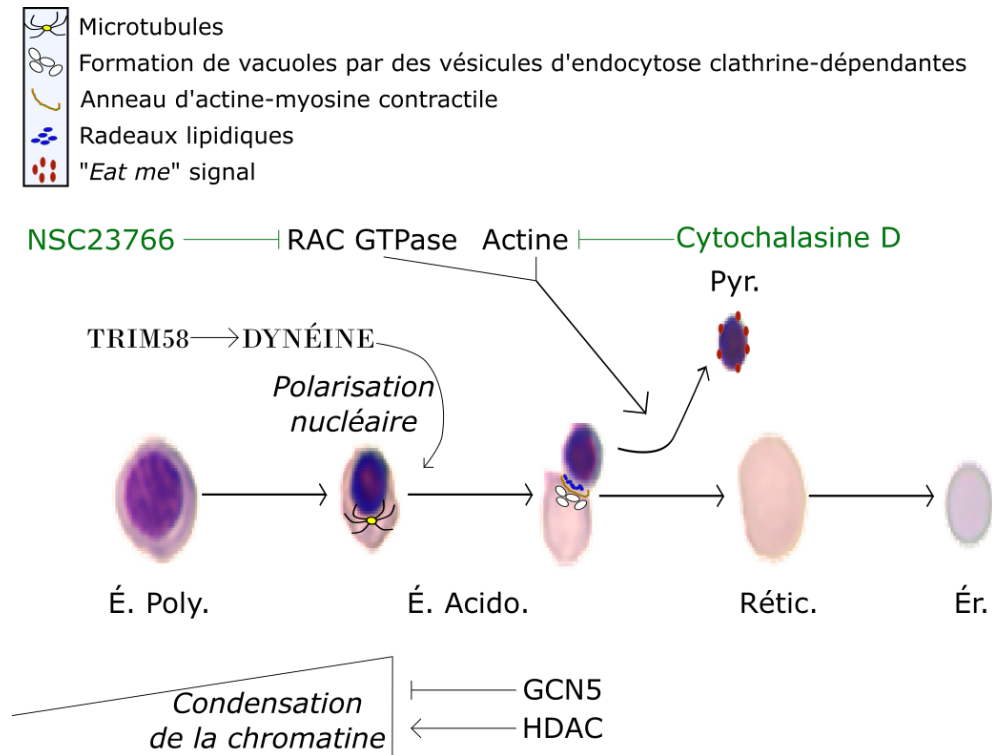


Figure 8 : Le processus d'énucléation est dépendant du cytosquelette.

Au cours de l'érythropoïèse terminale, la compaction de la chromatine est favorisée par la déacétylation des histones (médiée par les HDACs, tandis que GCN5 est une histone acétylase). Une fois terminée, une polarisation nucléaire est mise en place grâce aux microtubules et au moteur moléculaire DYNÉINE dont la dégradation est favorisée par TRIM58. Un goulot d'étranglement se forme alors entre le futur réticulocyte et le futur pyrénocyte. Celui-ci est formé d'un anneau d'actine-myosine, rappelant un processus de cytokinèse. L'inhibition par inhibiteur chimique (indiqué en vert) de l'actine par la cytochalasine D ou des RAC GTPases par le NSC23766 empêche la mise en place de cette structure. La formation de vacuoles par la fusion de vésicules d'endocytose clathrine-dépendante médie la fission. De plus, la fusion de radeaux lipidiques favorise également la dissociation. Le pyrénocyte, une fois séparé du réticulocyte, exprime à sa surface de la phosphatidylsérine, un signal qui favorisera son engouffrement par les macrophages de l'îlot érythroblastique. **É. Baso.** Érythroblaste Basophile; **É. Poly.** Érythroblaste polychromatophile ; **É. Acido.** Érythroblaste acidophile ; **Rétic.** Réticulocyte ; **Pyr.** Pyrénocyte ; **ÉR.** Érythrocyte. **ADN** : Acide désoxyribonucléique. **H2A** : histone variant 2A. Schéma inspiré de Ji, 2015³⁴.

d. Maturation des réticulocytes en globules rouges

i. Maturation structurale

Le terme réticulocyte désignant l'érythroblaste depuis le moment où il a énucléé jusqu'à l'acquisition de la forme biconcave caractéristique du GR, il s'agit en réalité d'une population très hétérogène. Dès sa sortie de la moelle osseuse, le réticulocyte est d'ores et déjà capable de transporter l'oxygène, mais sa membrane doit encore être remodelée pour acquérir la forme

biconcave. Le néo-réticulocyte finit sa maturation dans la circulation sanguine en trois jours³⁹ : les organites encore présents dans le cytoplasme sont éliminés par autophagie⁴⁰, et les ARNm sont dégradés. La maturité des réticulocytes peut être estimée en utilisant le thiazole orange, qui se fixe à l'ARNm et donc diminue avec la maturation, et le CD71 dont l'expression est progressivement perdue (**figure 9**)¹³. La maturation des réticulocytes va résulter en une perte d'environ 20% de la surface de leur membrane plasmique⁴¹, ainsi qu'une diminution de leur volume médiée entre autre par la Non-Muscle Myosine IIA (**NMIIA**)⁴². Le réticulocyte immature est d'abord rigide et replié sur lui-même ; en effet, ses réseaux de cytosquelette ne sont pas encore organisés malgré qu'il contienne déjà toutes les protéines nécessaires à leur mise en place^{30,43}.

Deux types de complexes d'ancrage du cytosquelette peuvent être définis dans le globule rouge : un complexe ankyrine (**ANK**), et un complexe jonctionnel basé surtout sur les protéines 4.1 et actine. Ces deux types de complexes sont reliés par les spectrines, et tous deux sont ancrés à la membrane plasmique par bande 3 (**figure 10**). Le domaine cytoplasmique de bande 3 se lie à l'ANK, aux protéines 4.1 et 4.2, et à l'adducine⁴⁴. Bande 3 s'associe également à la GPA, et à RhAG. Bande 3 s'oligomérisse pour donner des dimères (~60%), des tétramères (~40%), ainsi que des agrégats de Bande 3⁴⁴. L'association de 4.2 et d'ANK à Bande 3 facilite son association avec le cytosquelette de spectrines⁴⁴. Une partie des dimères de Bande 3 est associée à la glycophorine C (**GPC**) et à 4.1 – ancrant le complexe jonctionnel. La phosphorylation de la protéine 4.1 diminue avec la maturation du réticulocyte⁴⁵, et a été montrée comme un facteur déstabilisant l'association de 4.1 avec p55 et la spectrine, et entraînant la dissociation de la GPC du reste du cytosquelette⁴⁶. La phosphorylation de bande 3 induit également la déstabilisation de son interaction avec le cytosquelette en réduisant son affinité pour l'ANK. Les protéines p55 et Rh sont également associées à ce complexe, et 4.2 a été proposée comme un autre partenaire potentiel⁴⁷. Des complexes formés de dimères de bande 3, et de GPA non associés au cytosquelette existent également⁴⁴. Il est à noter que les complexes jonctionnels sont, de plus, reliés entre eux par la non-muscle myosine II (**NMMII**), qui en assurant la contraction entre ces complexes membranaires contrôle la courbure de la membrane du globule rouge, ainsi que sa déformabilité⁴⁸. À l'exception de bande 3 dont l'expression est diminuée dans le GR, l'expression de la plupart des protéines majeures impliquées dans ces réseaux ne varie pas entre le réticulocyte et le GR⁴⁹.

Pour des raisons de droits d'auteurs, cette figure a été retirée. Se référer à l'article :

Significant Biochemical, Biophysical and Metabolic Diversity in Circulating Human Cord Blood Reticulocytes, Malleret et al, Plos ONE, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0076062

Figure 9 : Immunophénotype et morphologie des réticulocytes au cours de leur maturation (d'après Malleret et al., 2013¹³).

Au cours de leur maturation, le contenu en organites et en ARNm du cytoplasme des réticulocytes diminue progressivement, jusqu'à devenir nul au stade globule rouge. Le Thiazole orange marque les ARNm, permettant de suivre cette diminution. Parallèlement à cela, l'expression de surface de CD71 diminue, jusqu'à devenir nulle chez les réticulocytes les plus matures. Un double marquage Thiazole orange-CD71 permet donc de suivre la maturation des réticulocytes jusqu'au stade globule rouge (gauche). Lors de cette maturation, la taille des réticulocytes diminue et les propriétés de leur membrane plasmique évoluent, reflétant une réorganisation du cytosquelette. De ce fait, leur déformabilité augmente, comme en témoigne la longueur croissante pouvant être aspirée par les micropipettes (droite). La réorganisation de la membrane se traduit également par la perte de protéines d'ancrage, ce qui se traduit par une perte progressive de cytoadhérence.

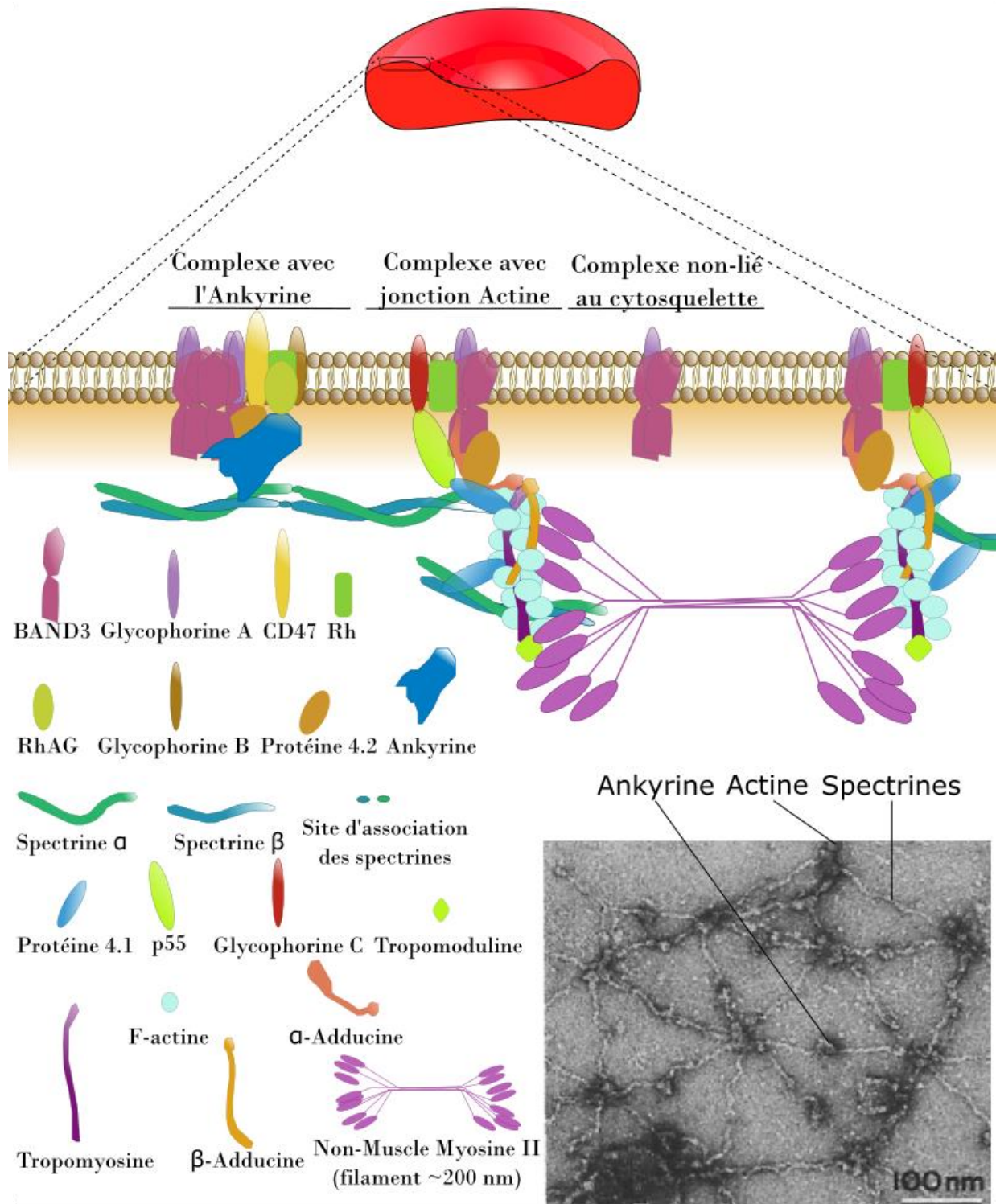


Figure 10 : Le cytosquelette du globule rouge est ancré à la membrane par deux complexes principaux. L'arrangement particulier du cytosquelette du globule rouge lui confère ses capacités de déformation et d'élasticité. Il se réorganise pendant la maturation du réticulocyte, qui s'accompagne d'une déformabilité augmentée. Des « mailles » de spectrines sont reliées à la membrane grâce au complexe avec l'ankyrine, composé également de BAND3, GPA, CD47, Rh, RhAG et de la glycophorine B. La queue des spectrines α et β est également reliée aux

filaments d'actine des complexes jonctionnels (composés de GPC, Rh, BAND3, GPA, p55, la protéine 4.2, et de l'adducine α et β) *via* 4.1. Les filaments d'actine sont complexés à la tropomyosine et à la tropomoduline, et sont reliés entre eux par la myosine (Non-Muscle Myosine II), qui régule la courbure de la membrane du globule rouge et sa déformabilité. L'association des spectrines, de l'actine et de la myosine confère des propriétés de déformation aux globules rouges qui leur permet de circuler dans les capillaires. Ce maillage est observable en microscopie électronique (encart en bas, à droite). Des complexes de BANDE3 dimérisée et de GPA circulent également librement dans la membrane plasmique. L'image de microscopie électronique du cytosquelette membranaire de globule rouge est tirée de Liu et al., 1987⁵⁰.

La réorganisation de ces réseaux de spectrines, myosines et actines permet l'acquisition progressive de la forme biconcave ; les réticulocytes matures CD71^{neg} Thiazole Orange⁺ ayant une forme « en coupe », et l'acquisition de la forme biconcave marquant le stade de GR. Avec cette réorganisation, s'acquiert également l'élasticité de la membrane comme l'ont montré Malleret et collaborateurs en 2013 en utilisant la technique d'aspiration par micropipette¹³ (**figure 9**). Cette élasticité est nécessaire pour absorber de façon réversible les forces de cisaillement s'appliquant lors de la circulation dans les capillaires.

Une perte de cytoadhérence est également observée avec la maturation¹³, prévenant l'apparition de thromboses. Il est à noter que les domaines extracellulaires des glycophorines limitent l'adhérence aux parois des capillaires ou aux autres globules rouges grâce à leurs acides sialiques, chargés négativement. Les globules rouges fonctionneront pendant environ 120 jours dans la circulation sanguine, en passant *via* de nombreux micro-capillaires, avant d'être éliminés par la rate. Ils constituent 80% des cellules du corps humain⁵¹, et vont permettre le transport de l'oxygène depuis les poumons vers tous les tissus de l'organisme, grâce à leur contenu en hémoglobine.

ii. Globule rouge et oxydation

L'hémoglobine représente 98% du contenu protéique des globules rouges, et engendre la production d'espèces réactives de l'oxygène (**ROS**). En effet, l'hémoglobine est oxydée au cours du temps du fait de la réduction du dioxygène, et la présence d'ions ferreux tels qu'ils peuvent être trouvés dans l'hémoglobine facilite la réaction de Haber-Weiss qui génère des radicaux hydroxyles. La déoxyhémoglobine (*i.e.* : hémoglobine non-liée à l'oxygène) peut se lier à la membrane plasmique par le biais du domaine cytoplasmique de BANDE3⁵². La formation de complexe de spectrine-déoxyhémoglobine est associée au vieillissement des GR⁵³, et participe à l'augmentation de la rigidité de la membrane des GRs sénescents⁵⁴ – signal qui, couplé à une augmentation

d'agrégats de BANDE3 facilitée par l'association d'hémoglobine oxydée à la membrane, favorise l'élimination du GR par la rate. La fixation à la membrane et la dénaturation de la déoxyhémoglobine facilite l'accès aux ions ferreux. L'hémoglobine attire également les ROS déjà produits, et est oxydée en méthémoglobine. Cependant, la méthémoglobine relargue son ion Fe^{3+} , favorisant l'apparition de nouvelles ROS.

Pour pallier leur apparition, le globule rouge possède une machinerie enzymatique de détoxification des ROS très efficace. On trouve dans cette machinerie, entre autres, la superoxyde dismutase (SOD1), la catalase, et des peroxydases⁴⁹.

3. La régulation de l'érythropoïèse

A. La régulation par les cytokines - Le *Stem Cell Factor* et l'Érythropoïétine

Le SCF soutiens la survie des progéniteurs érythroïdes et des proérythroblastes. L'érythropoïétine, elle, favorise la survie et la prolifération des érythroblastes du stade CFU-E jusqu'au stade érythroblaste polychromatophile.

a. Le couple SCF/C-KIT

Les progéniteurs érythroïdes expriment à leur surface le C-KIT (ou CD117), récepteur au SCF⁵⁵. Le SCF est exprimé à la surface des cellules stromales de la moelle osseuse, et est également secrété sous forme soluble⁵⁶ – bien que la forme membranaire soit plus efficace dans l'induction d'un signal en aval. C-KIT a une activité tyrosine kinase lui permettant d'induire en aval des signaux favorisant la survie et la prolifération. La liaison du SCF sur c-KIT induit sa dimérisation et son autophosphorylation sur certaines tyrosines. La phosphorylation de ces tyrosines va permettre leur reconnaissance par des protéines à domaine de liaison *Src Homology 2 (SH2)*, induisant l'activation de voies de signalisation dont les principales sont *Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K) /AKT* et *Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)/Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK)*.

b. Le couple EPO/EPOR

Comme mentionné précédemment, la transition de BFU-E à CFU-E s'accompagne d'une dépendance cytokinique à l'érythropoïétine – en son absence, les CFU-Es ne sont pas en mesure

de se développer. Cette dépendance reste présente jusqu'au stade érythroblaste acidophile où le récepteur EPOR n'est plus exprimé. Le maximum d'expression d'EPOR se trouve aux stades CFU-E et Pro-E, puis son expression diminue progressivement avec la différenciation terminale. L'inactivation du gène *Epo* ou du gène *Epor* est létale au stade embryonnaire du fait d'une érythropoïèse terminale bloquée, soulignant l'aspect phase-spécifique de cette régulation⁵⁷. En effet, dans les modèles murins *Epo*^{-/-} ou *Epor*^{-/-}, les CFU-E sont produites mais meurent rapidement par apoptose⁵⁷. L'EPO est sécrétée par les cellules interstitielles péri-tubulaires du rein⁵⁸, et la transcription du gène *EPO* présent sur le bras long du chromosome 7 est régulée par la présence d'un *Hypoxia Response Element* (**HRE**, élément de réponse à l'hypoxie) environ 10 kilobases en amont du gène en 5'. En condition hypoxique, *Hypoxia Inducible Factor 2α* (**HIF2α**) peut transloquer au noyau, s'associer à sa sous-unité β, et se fixer sur le HRE – induisant ainsi la transcription d'*EPO*⁵⁹. La production d'EPO permet d'augmenter la production de GRs, et *in fine* permet de pallier l'hypoxie.

c. La signalisation STAT

Comme tous les récepteurs de cytokines, l'EPOR ne possède pas d'activité kinase intrinsèque. En effet, ces récepteurs interagissent de façon constitutive *via* leur domaine intracellulaire avec une tyrosine kinase de la famille des Janus kinases qui permettra la transduction du signal. Pour l'EPOR, il s'agit de la *Janus Kinase 2* (**JAK2**)⁶⁰. La fixation de l'EPO sur EPOR va entraîner la trans-phosphorylation des deux JAK2 associées, qui vont phosphoryler à leur tour certaines tyrosines du domaine cytoplasmique d'EPOR, permettant la fixation de protéines à domaine SH2 telles que les *Signal Transducer and Activator of Transcription 1, 3, 5A and 5B* (**STAT1**, **STAT3**, **STAT5A** et **STAT5B** respectivement)⁶¹. Les STAT sont à leur tour phosphorylés par JAK2, entraînant leur homodimérisation et translocation dans le noyau.

L'activation de la cascade de signalisation par l'EPO mène à la transcription de plusieurs gènes dont *BCL-X*. Ce dernier encode **BCL-XL**, protéine anti-apoptotique, cible directe de STAT5A/B⁶². La signalisation EPO est activée pour un temps très court, notamment grâce aux protéines SOCS, dont la transcription est médiée par STAT5 en réponse à l'EPO⁶¹. **SOCS-1** (*Suppressor Of Cytokine Signalling-1*), par exemple, médie la dégradation de JAK2 en se fixant à sa boucle d'activation ce qui permet le recrutement de la machinerie d'ubiquitylation. Suite à la dégradation de JAK2, la transduction du signal ne se fait plus puisque qu'EPOR n'a pas de domaine

kinase. Les souris *Socs1*^{-/-} ont une différenciation ralentie, et leurs CFU-Es sont bien plus sensibles à l'EPO – indiquant une stimulation prolongée⁶³.

d. La signalisation PI3K/AKT

La voie de signalisation PI3K/AKT est activée à la fois par le SCF et par l'EPO. La phosphorylation des tyrosines du domaine cytoplasmique d'EPOR et de C-KIT permet la fixation de p85, sous-unité régulatrice de PI3K, *via* ses domaines SH2. La sous-unité catalytique p110 est alors activée, permettant la phosphorylation du phosphatidyl-inositol bisphosphate (**PIP2**) en phosphatidyl-inositol trisphosphate (**PIP3**), situé à la membrane plasmique. Cela permet le recrutement et l'activation de la Sérine/Thréonine kinase AKT. AKT inhibe l'action de facteurs pro-apoptotiques tels que **FOXO3A** (*Forkhead box O3*) ou **BAD** (*BCL2 associated Agonist of cell Death*). La signalisation est écourtée avec l'intervention de la phosphatase **PTEN** (*Phosphatase and TENsin homolog*) qui déphosphoryle le PIP3, et termine ainsi le signal. L'activation de PI3K est nécessaire au rôle anti-apoptotique d'EPO, mais ne suffit pas à assurer la survie cellulaire⁶¹.

e. La signalisation MAPK/ERK

La voie MAPK/ERK est également activée en aval des deux récepteurs EPOR et C-KIT *via* des protéines à domaines SH2. Par exemple, **GRB2** (*Growth factor Receptor-Bound protein 2*) se fixe à leur domaine intracellulaire *via* une tyrosine phosphorylée⁶¹, puis interagit avec *Son Of Sevenless* (**SOS**), qui active **RAS** (*Rat sarcoma*) en assurant sa liaison au Guanosine TriPhosphate. Plusieurs kinases sont activées de façon successive aboutissant à l'activation d'ERK1 et d'ERK2, qui favorisent la prolifération et inhibent la différenciation des progéniteurs érythroïdes immatures.

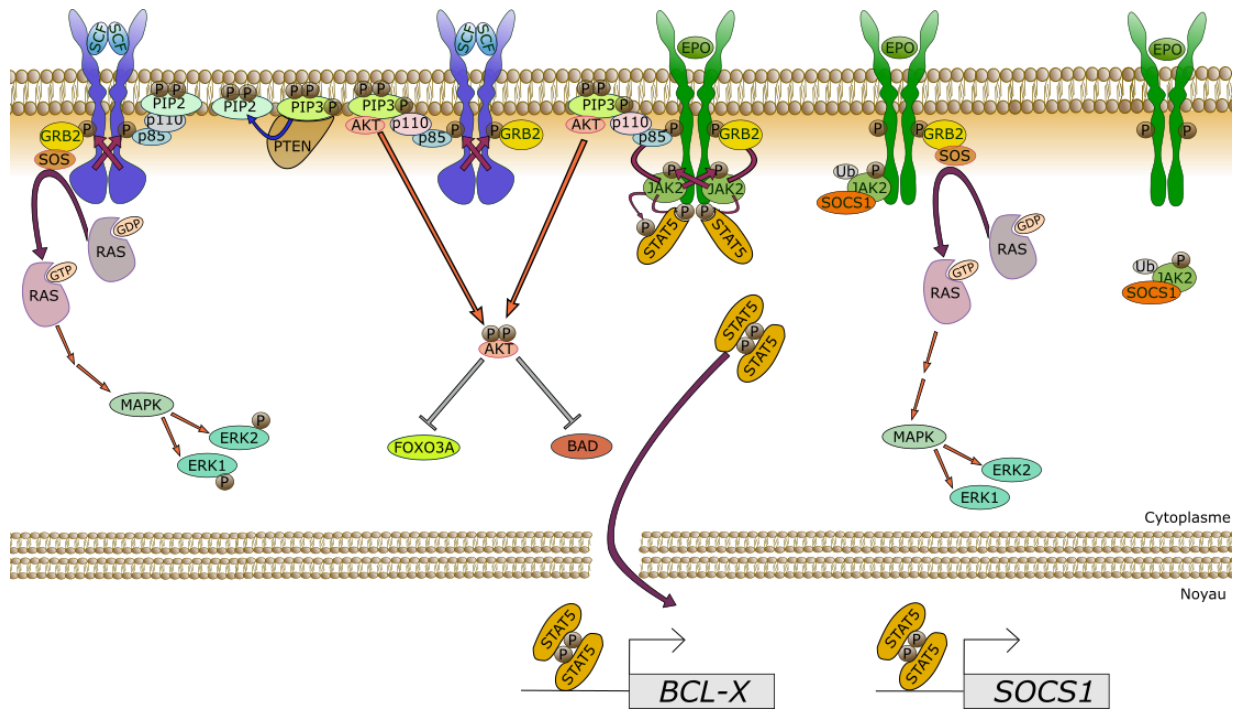


Figure 11 : La signalisation en aval du couple SCF/C-KIT et du couple EPO/EPOR.

Le dimère de SCF soluble ou membranaire se lie à son récepteur C-KIT (bleu foncé), qui se dimérise et s'auto-phosphoryle. La fixation de l'EPO sur son récepteur EPOR (vert foncé) va permettre aux kinases JAK2 qui lui sont associées de se phosphoryler l'une l'autre du fait de leur proximité suite à un changement de conformation. Une fois activées, les JAK2 vont phosphoryler l'EPOR. Les résidus phosphorylés (« P », marron foncé) sur EPOR et sur C-KIT vont permettre le docking de GRB2 (jaune), qui va recruter SOS (orange). SOS va assurer l'activation de RAS en permettant le relargage de la Guanosine DiPhosphate (GDP), et permettre la liaison de RAS au Guanosine TriPhosphate (GTP). Plusieurs kinases sont phosphorylées en aval de RAS-GDP (MAPK, vert), aboutissant à la phosphorylation de ERK1/2 qui favorisent la prolifération. La phosphorylation des résidus sur C-KIT et EPOR permet également le docking de la sous-unité régulatrice de la PI3K (p85, bleu), qui va alors activer la sous-unité catalytique p110. Cette dernière phosphoryle PIP2 en PIP3, ce qui permet le recrutement d'AKT et sa phosphorylation par ses kinases régulatrices. L'AKT phosphorylée va inhiber FOXO3A et BAD, et joue donc un rôle anti-apoptotique. La phosphatase PTEN (marron) déphosphoryle PIP3 en PIP2, terminant la signalisation. Finalement, la phosphorylation de certains résidus d'EPOR permet son association aux STAT (sur ce schéma, STAT5, en orangé). Ils sont alors phosphorylés par JAK2, s'homodimérisent, et transloquent au noyau pour réguler leurs gènes cibles. Les dimères de STAT5 ont été suggérés comme activateurs transcriptionnels de BCL-X, encodant BCL-XL. Ils up-régulent également SOCS1, encodant le régulateur négatif de JAK2 : en se fixant à la boucle activatrice de JAK2, SOCS1 (orange) favorise son ubiquitinylation (« Ub », en gris), et donc la dégradation de JAK2. Sans cette kinase, les EPOR ne peuvent plus transduire de signal.

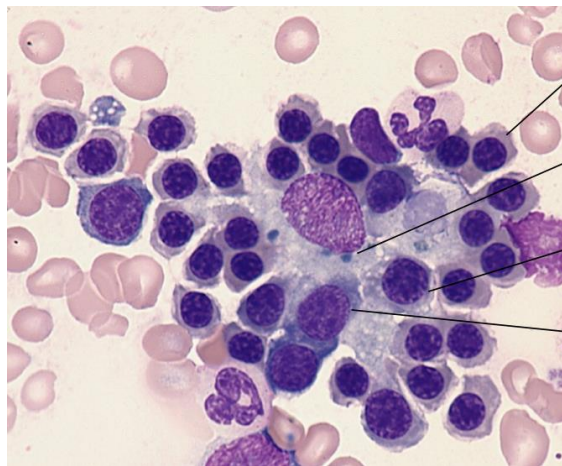
B. L'îlot érythroblastique

a. La structure de l'îlot

Comme mentionné précédemment, la différenciation terminale des érythroblastes se fait au sein de structures présentes dans la moelle osseuse appelées « **îlot érythroblastique** », (**figure 12**). Il s'agit d'un macrophage central cerné de 30 à 50 érythroblastes dont le stade de différenciation varie de CFU-E à réticulocyte⁶⁴. Il a été proposé en observant des coupes de moelle osseuse de rat que cette structure migre vers les capillaires sinusoides de la moelle osseuse de façon concomitante avec la maturation des érythroblastes qu'elle contient – ce qui faciliterait le départ des néo-réticulocytes dans la circulation sanguine⁶⁵.

Figure 12 : L'îlot érythroblastique.

Dans la moelle osseuse, les érythroblastes en différenciation entourent le macrophage central. Frottis médullaire coloré par coloration MGG. Image provenant de la banque d'images de *The American Society of Hematology (ASH)*©. "Erythroblastic island", Peter Maslak, 10/01/2008 ; Numéro de l'image :



Érythroblaste acidophile
Macrophage centrale
Érythroblaste polychromatophile
Érythroblaste basophile

#00003725. [<https://imagebank.hematology.org/imageset/708/erythroblastic-island>].

De nombreuses molécules d'adhésion permettent le contact entre les érythroblastes et leur macrophage central :

- l'*Erythroblast Macrophage Protein (EMP)* exprimée aussi bien par le macrophage que par les érythroblastes⁶⁶, et qui par le contact établi, défavorise l'apoptose de ces derniers^{67,68}.

- Le macrophage central exprime la *Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1)*, récepteur de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ ⁶⁹ exprimée très fortement par les érythroblastes lors de la différenciation terminale, et dont l'expression diminue entre les stades érythroblastes polychromatophiles et réticulocytes (comme expliqué précédemment dans la partie I.2.B.b.i. Caractéristiques

morphologiques et immunophénotypiques). Cela favorise le départ des réticulocytes immatures vers la circulation.

- Le Cluster de Différenciation 163 (**CD163**), exprimé par le macrophage, a été impliqué dans l'adhésion des érythroblastes au macrophage central⁷⁰ et est un récepteur au complexe hémoglobine-haptoglobine⁷¹. L'haptoglobine est une chaperonne prenant en charge l'hémoglobine « libre » dans la circulation, évitant ainsi des dommages dus à l'oxydation.

Les molécules d'adhésion exprimées par les érythroblastes seront majoritairement retrouvées dans le pyrénocyte après énucléation³⁰, qui sera phagocyté par le macrophage central⁷².

b. La régulation de la différenciation par le macrophage

Le macrophage central assurerait un soutien aux érythroblastes en différenciation en facilitant leur prolifération en agissant sur leur cycle cellulaire⁷³ et leur survie^{67,68}, exerçant donc une régulation positive du processus de différenciation.

Il peut cependant réguler négativement ce processus : il secrète des cytokines pro-inflammatoires, telles que le *Tumor Necrosis Factor α* (**TNF- α**) et l'interféron γ (**IFN- γ**). Tous deux sont des régulateurs négatifs de la prolifération des érythroblastes puisqu'ils sont pro-apoptotiques⁷⁴. L'IFN- γ favorise l'expression des récepteurs au TNF- α , (*Tumor-necrosis-factor related Apoptosis Inducing Ligand* (**TRAIL**), *TNF-related WEAK inducer of apoptosis* (**TWEAK**)), exprimés à la surface des érythroblastes immatures (proérythroblastes, érythroblastes basophiles). La liaison de TNF- α à ses récepteurs induit le clivage par les caspases de GATA-1⁷⁵, facteur de transcription majeur de l'érythropoïèse (qui sera plus discuté ci-après, dans la partie I.3.E. Régulation transcriptionnelle de la différenciation) – menant soit à la mort cellulaire, soit à une inhibition réversible de l'érythropoïèse selon le niveau d'EPO disponible.

C. La régulation par les caspases

La condensation de la chromatine observée lors de la pré-énucléation ne va pas sans rappeler le processus d'**apoptose** – mort cellulaire programmée pouvant être induite de façon **intrinsèque** à la cellule suite à des dommages, ou de façon **extrinsèque** suite à des signaux de mort. Ce processus de mort programmée repose sur des protéases appelées **caspases**, qui une fois

activées vont cliver divers constituants cellulaires. Lors de l'érythropoïèse, une activation physiologique et transitoire des caspases est observée.

a. La régulation positive par l'induction des caspases

Au cours de la transition du stade Baso-E vers le stade Poly-E, une réduction du potentiel transmembranaire mitochondrial s'opère due à un signal interne à la cellule – ce qui constitue l'initiation usuelle du programme d'apoptose par voie intrinsèque. Une activation de la caspase-9 est observée, celle-ci va alors activer la caspase-3 en la clivant. Zermati et collaborateurs ont décrit que cette caspase cliverait la lamine B et la protéine acinus, entraînant la condensation de la chromatine et du noyau, sans mort cellulaire²⁶. Le clivage de la lamine B reste cependant discuté dans la littérature²⁸. L'absence de mort cellulaire peut s'expliquer par le fait que l'endonucléase *Caspase-activated DNase (CAD)* n'est pas activée en présence de la forme non-clivée son inhibiteur **ICAD** ; l'ADN n'est donc pas dégradé, et la cellule ne meurt pas. Lors de cette activation spécifique de la caspase-3, celle-ci n'est pas en mesure de cliver GATA-1 ([I.3.E. Régulation transcriptionnelle de la différenciation](#)), qui, en présence d'EPO, est protégée par la protéine chaperonne *Heat Shock Protein 70 (HSP70)*⁷⁶. Au contraire, l'activation de la caspase-3 est nécessaire au processus d'érythropoïèse, puisque son knockdown par siRNA⁷⁷ ou par inhibiteur⁷⁸ affecte la prolifération et la différenciation des érythroblastes. La caspase 3 activée permet de plus l'activation de ROCK-1 (*Rho associated Coiled-Coil containing protein Kinase 1*), qui est nécessaire à la différenciation terminale⁷⁹.

b. La régulation négative par contact

Outre l'activation physiologique des caspases nécessaire à la différenciation, le programme d'apoptose sert également de régulateur à la production de globules rouges. La maturation des érythroblastes s'accompagne d'un changement concernant leur tendance à mourir par apoptose ; les érythroblastes passent d'un profil pro-apoptotique lorsqu'ils sont immatures à un profil anti-apoptotique lorsqu'ils sont matures⁸⁰. En effet, les érythroblastes immatures (CFU-E, Pro-E, Baso-E) expriment à leur surface des récepteurs de mort tels que la protéine **FAS**. En entrant en contact avec son ligand, le récepteur de mort induit la voie dite extrinsèque de l'apoptose, qui met en œuvre l'activation de la caspase-8. Les érythroblastes plus matures (Poly-E, Acido-E) expriment à leur surface le ligand de FAS, le **FASL**, et induisent donc la mort par apoptose des érythroblastes

immatures s'ils entrent en contact avec eux. Le déclenchement du programme d'apoptose va avoir pour conséquence le clivage du facteur de transcription érythroïde majeur GATA-1 (voir la partie [I.3.E. Régulation transcriptionnelle de la différenciation](#)), inhibant ainsi l'érythropoïèse⁷⁵. Cette apoptose est inhibée par la présence d'EPO, qui est produite en condition d'hypoxie⁸¹. De ce fait, cette élimination des érythroblastes immatures ne se fait que si l'organisme est bien oxygéné (condition normoxique à hyperoxique), et que la production d'érythroblastes est inutile – il s'agit donc d'une boucle de rétrocontrôle.

D. Érythropoïèse de stress

L'érythropoïèse de stress est un processus palliatif déclenché lorsque la pression partielle en oxygène diminue fortement. C'est notamment le cas après une hémorragie ou un changement d'altitude suffisamment important pour induire une hypoxie tissulaire. Pour rétablir une pression partielle en oxygène suffisante, les cellules interstitielles péri-tubulaires du rein⁵⁸ produisent une quantité importante d'EPO, permettant une production accrue de GRs, et donc l'oxygénation des tissus. Cette production accrue de GRs est surtout due à l'absence d'apoptose des cellules érythroïdes immatures grâce à la présence d'EPO qui va 1) favoriser la production de facteurs anti-apoptotiques, 2) inhiber la mort FAS/FASL-dépendante (pour rappel : [I.3.A. La régulation par les cytokines](#) & [I.3.C.b. La régulation négative par les caspases](#)). Il a été montré récemment que le macrophage central de l'îlot érythroblastique est important pour l'érythropoïèse de stress : Chow et collaborateurs ont pu montrer que les souris dont les macrophages d'îlots érythroblastiques ont été déplétés avec des liposomes de clodronate ne présentaient pas d'érythropoïèse défectueuse en conditions normales comparées à des souris non-déplétées⁸². Cependant, lorsque ces souris étaient soumises à des phlébotomies ou à des anémies induites à la phényl-hydrazine, leur période de récupération était plus longue que celle des souris non-déplétées ; démontrant un rôle du macrophage dans la production de GRs lors de l'érythropoïèse de stress.

E. Régulation transcriptionnelle de la différenciation

L'engagement des progéniteurs multipotents en progéniteurs érythroïdes monopotents et leur différenciation dépendent de facteurs de transcription majeurs (*master transcription factors*). Ceux-ci vont tout d'abord inhiber la différenciation érythroïde permettant l'amplification des progéniteurs érythroïdes, puis vont réguler positivement les gènes érythroïdes-spécifiques.

C'est notamment le cas des facteurs de transcription **PU.1** et **GATA-2**. PU.1 inhibe l'expression d'*EPOR* qui est nécessaire à la survie des cellules érythroïdes, et l'expression de *KLF1*⁸³. Ce dernier encode le facteur de transcription *Kruppel-like factor 1* (**KLF1**), qui favorise l'expression des gènes érythroïdes spécifiques comme nous allons le voir. Au contraire, PU.1 favorise sa propre expression ainsi que celle de facteurs de transcription tels que **C-MYB**, qui répriment également les gènes érythroïde-spécifiques. PU.1 régule également de nombreux gènes codant des protéines des voies de signalisation PI3K/AKT, MAPK/ERK et STAT, impliquées dans l'érythropoïèse comme nous l'avons vu précédemment⁸³.

GATA-2 est nécessaire à la prolifération et à la survie des progéniteurs multipotents, tandis qu'une expression trop importante de GATA-2 inhibera l'engagement dans la différenciation érythroïde, en faveur de la différenciation mégacaryocytaire⁸⁴. Lors de la différenciation érythroïde, l'expression de GATA-2 diminue rapidement tandis que celle de **GATA-1** augmente ; GATA-2 favorise l'expression de *GATA1*, tandis que GATA-1 réprime l'expression de *GATA2*, notamment en promouvant l'expression de son répresseur **FOG-1** (*Friend of GATA-1*). GATA-1 devient majoritairement exprimée par rapport à GATA-2 dès le stade BFU-E⁸⁵. GATA-1 va également permettre l'expression de KLF1, et inhiber PU.1 en interagissant avec lui⁸⁶. Alors que GATA-2 permet une expression basale des gènes encodant les globines, le remplacement de GATA-2 par GATA-1 mène à une très forte expression de ces gènes⁸⁴.

GATA-1 et KLF1 font partie du réseau central de facteurs de transcription (*core erythroid network*), composé également de **TAL-1**, **LDB1** (*LIM Domain Binding 1*) et **LMO2** (*LIM Domain Only 2*)^{11,87}. Ces deux derniers ne peuvent s'associer à l'ADN directement, l'interaction avec l'ADN se fait *via* leurs partenaires. Les modèles murins invalidés pour ces gènes ont une érythropoïèse compromise, tandis que les mutations de *GATA1* et *KLF1* provoquent chez l'Homme des phénotypes anémiques¹¹. Tous ces facteurs de transcription régulent positivement les gènes spécifiquement exprimés dans les cellules érythroïdes. La mutation d'un des facteurs de ce réseau entraîne la déstabilisation des autres facteurs sur leurs éléments communs d'association – soulignant leur action coordonnée. Parmi les gènes cibles de GATA-1, on retrouve de nombreux gènes exprimés spécifiquement dans les cellules érythroïdes tels que *HBB* (encodant la globine β), *HBA1* (encodant la globine α), plusieurs gènes encodant des enzymes impliquées dans la synthèse d'hèmes, et *EPOR*. Il a également été suggéré que GATA-1 contrôlerait l'expression de *BCL-X* qui

encode BCL-XL en présence d'EPO⁸⁵. Il est à noter que l'augmentation d'expression du gène *Hbb* nécessite la présence de GATA-1 mais également celle de KLF1 et de TAL-1⁸⁸.

F. L'expression génique au cours de l'érythropoïèse

La différenciation érythroïde se caractérise par de nombreux changements morphologiques, mais également par des variations dans l'expression génique. An et collaborateurs ont réalisé en 2014 l'analyse transcriptomique de l'érythropoïèse humaine et murine⁸⁹ après tri des populations sur les marqueurs détaillés plus tôt ([I.2.B.b.i. Caractéristiques morphologiques et immunophénotypiques](#)). L'analyse en composante principale des séquences obtenues par RNAseq indique une forte corrélation par stade plutôt que par réplicats biologiques – en accord avec une expression génique dépendante du stade de maturation plutôt que des conditions de culture. L'étude de l'évolution des transcrits sur la période de la différenciation révèle différentes tendances d'expression, que les auteurs classent en 6 groupes – des gènes dont l'expression augmente avec la différenciation (groupe 1 & 2), des gènes dont l'expression tend à diminuer (groupe 3 & 4), et des gènes dont l'expression est, soit au plus haut, soit au plus bas, au stade érythroblaste polychromatophile. C'est lors des transitions érythroblaste basophile/érythroblaste polychromatophile et érythroblaste polychromatophile/érythroblaste acidophile que se font les changements d'expression les plus notables.

Notre équipe a réalisé en 2016 une analyse protéomique par spectrométrie de masse sur les différents stades de la différenciation érythroïde humaine³⁰. La quantification absolue des protéines à ces différents stades montre que beaucoup de variations notables au niveau ARNm sont atténuées au niveau protéique. Inversement, alors qu'au niveau transcriptionnel, l'expression génique tend même à augmenter dans deux groupes sur six, on peut observer au niveau protéique une diminution globale de l'expression ; seules quelques protéines bien spécifiques augmentent avec la différenciation (BANDE3, hémoglobine, ...). La corrélation ARNm/protéine est faible, et diminue avec la transition érythroblaste basophile précoce/érythroblaste basophile tardif. Lors de cette transition, l'expression de la GPA et de BANDE3 augmente tandis que la signalisation en aval de C-KIT est perdue. C'est également à ce stade que l'activation transitoire des caspases se fait. La différence observée entre les profils d'expression protéique et transcriptomique implique qu'il y ait d'autres régulations de la traduction/stabilité des ARNm.

II. Le métabolisme du fer

Le fer est indispensable à l'organisme, pour la synthèse d'hémoglobine comme nous l'avons vu précédemment, mais aussi pour la respiration mitochondriale et comme cofacteur de nombreuses enzymes. Bien qu'utilisé dans de très nombreux processus, il est l'élément le moins disponible dans l'alimentation, et la carence en fer (dite **carence martiale**) est la plus courante dans le monde. Elle se traduit généralement par des **anémies**, puisque le tissu érythroïde est le plus gros consommateur en fer l'organisme.

À l'inverse, un excès de fer est extrêmement toxique pour la cellule. Le fer non-complexé dans la cellule génère des espèces réactives de l'oxygène, et peut entraîner *in fine* la mort cellulaire⁹⁰. L'excès de fer favorise, de plus, l'émergence et/ou la prolifération des cellules tumorales⁹¹. Les **surcharges martiales** sont également courantes dans la population, et sont qualifiées d'**hémochromatoses**. Si la plupart des hémochromatoses sont d'origine génétique et héréditaires, certaines hémochromatoses sont acquises à la suite d'autres pathologies (thalassémie, myélodysplasie, ...).

En situation non pathologique, environ 4g de fer sont contenus dans l'organisme, dont 65% environ contenus dans les cellules érythroïdes⁹². Outre le fer utilisé dans des complexes hétéroprotéiniques (tels que l'hémoglobine) ou stocké comme réserve, une fraction peut être trouvée dans le plasma et est dite « circulante ». Ce sont sur les variations de quantité de cette fraction circulante que les mécanismes de régulation systémique vont s'appuyer. Au niveau cellulaire, la quantité de fer est également régulée à plusieurs niveaux, conservant ainsi un équilibre physiologique. Dans cette partie, les différents types cellulaires impliqués dans l'acquisition, le stockage et la mobilisation du fer seront mentionnés, et les différents mécanismes de régulation seront expliqués.

1. La circulation du fer dans l'organisme

L'import du fer dans l'organisme se fait à partir de l'alimentation, à hauteur de 1-2mg/jour⁹². Il peut y être trouvé sous deux formes : ferreux (Fe^{2+}) ou ferrique (Fe^{3+}). Le fer est capté par **DMT1** (*Divalent Metal Transporter 1*), transporteur d'ions ferreux présent à la surface apicale des entérocytes duodénaux (**figure 13**). Les ions ferriques ne peuvent pas être captés tels quels par DMT1, ils sont d'abord réduits en ions ferreux par **DCYTB** (*Duodenal Cytochrome B*)⁹³.

Une fois importés, ils sont pris en charge par la chaperonne **PCBP2** (*Poly (rC) binding protein 2*)⁹⁴.

Selon les besoins de l'organisme, le fer est soit immédiatement redistribué dans la circulation *via* la FERROPORTINE (**FPN**), seul exportateur de fer de l'organisme, soit stocké au sein des FERRITINES sous forme ferrique et inerte. Il existe deux types de chaînes de ferritines : une chaîne légère **FTL** (*Ferritin light chain*), et une chaîne lourde **FTH1** (*Ferritin heavy chain 1*). La chaîne lourde FTH1 possède un site catalytique permettant l'oxydation du fer. Le ratio chaîne légère/chaîne lourde est tissu-spécifique⁹⁵, mais dans tous les cas, 24 unités de ferritines vont former des cages pouvant lier jusqu'à 4 500 atomes de fer⁹⁶.

Le fer ferreux exporté de la surface baso-latérale des entérocytes par la FPN est oxydé en fer ferrique par l'**HÉPHAESTINE**, ce qui lui permet d'être pris en charge par le transporteur **TRANSFERRINE (Tf)**, glycoprotéine de 80kDa produite par les hépatocytes. En effet, le fer sous forme libre est extrêmement réactif et entraîne de nombreux dommages en oxydant des constituants cellulaires comme les lipides ou les acides nucléiques⁹⁰. La présence de fer non lié à la transferrine (*Non-Transferrin Bound Iron*, **NTBI**) est particulièrement toxique pour les tissus hépatiques et cardiaques. La Tf est appelée **Holo-Tf** lorsqu'elle est chargée en fer, c'est-à-dire lorsqu'elle lie deux atomes de Fe³⁺ (par opposition à **Apo-Tf** lorsqu'elle n'est pas chargée).

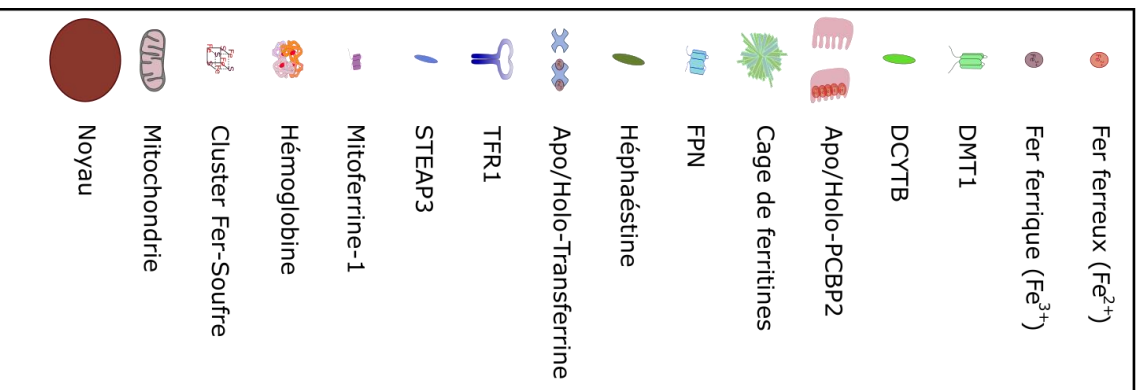
L'Holo-Tf est captée par le récepteur à la transferrine de type 1 (**TFR1**), qui une fois lié à son ligand, est internalisé de façon clathrine-dépendante⁹⁷. La vésicule endosomale formée s'acidifie, ce qui permet le relargage des atomes de fer de la Tf, dont l'affinité pour le fer en pH acide est faible^{98,99}. Une fois réduits en fer ferreux par la ferroxidase **STEAP3** (*Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate 3*)¹⁰⁰, les atomes de fer sont importés dans le cytoplasme par DMT1⁹⁴. Ils sont alors importés dans la matrice mitochondriale pour la production de **clusters Fer-Soufre** ou d'**hèmes** (voir partie [I.2.B.b.ii. La synthèse d'hémoglobine](#)) par la **mitoferrine-2**, exprimée de façon ubiquitaire, et par la **mitoferrine-1** exprimée majoritairement dans les cellules érythroïdes¹⁰¹. Le couple Tf-TFR1 est, quant à lui, recyclé, et se dissocie une fois en surface à pH neutre. L'apo-Tf est alors libérée dans la circulation sanguine.

Du fait de la production d'hème nécessaire à la synthèse d'hémoglobine des érythroblastes, et de la production de 2*10¹¹ globules rouges par jour, l'érythropoïèse est le principal consommateur de fer de l'organisme, et consomme 20 à 25mg par jour. L'absorption de fer à partir de l'alimentation

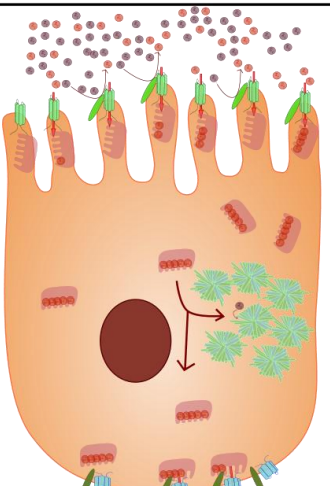
n'étant que de 1 à 2 mg/jour, elle est insuffisante pour couvrir les besoins en fer de l'érythropoïèse ; le reste est assuré par le recyclage des globules rouges sénescents. Après 120 jours dans la circulation, les globules rouges sont phagocytés par les **macrophages du système réticulo-endothélial**, majoritairement présents dans la rate. Les GRs sénescents sont reconnus par les agrégats de BANDE3¹⁰² présents à leur surface, ainsi que par le **CD47** (cluster de différenciation 47). Ce dernier est usuellement un « *don't eat me signal* » mais il subit avec le temps un changement de conformation, permettant son association avec la **thrombospondine-1**. Il est alors converti en un « *eat me signal* », favorisant la phagocytose¹⁰³.

Dans ces macrophages, l'hème de l'hémoglobine est soit directement exporté par FLVCR1A, soit le fer contenu dans l'hème est récupéré et redistribué à l'organisme *via* la FPN sous forme d'ions ferreux. Dans certaines conditions pathologiques nécessitant un recyclage accru des GRs sénescents, les monocytes peuvent se différencier en une population transitoire de macrophages dans le foie, capable également de s'acquitter de cette tâche¹⁰⁴.

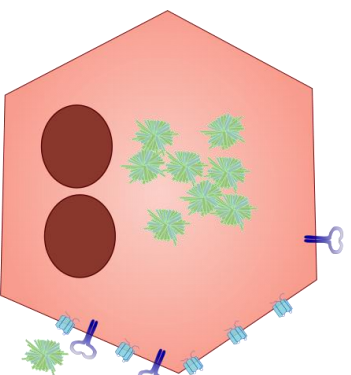
Finalement, il a été montré que la ferritine chargée en fer ferrique peut être sécrétée¹⁰⁵ par les hépatocytes¹⁰⁶ et les macrophages¹⁰⁷, et pourrait servir de protéine donneuse de fer aux hépatocytes (responsables du stockage) et aux érythroblastes (principaux consommateurs de fer). L'import dans la cellule de cette ferritine circulante pourrait potentiellement se faire *via* le TFR1¹⁰⁸.



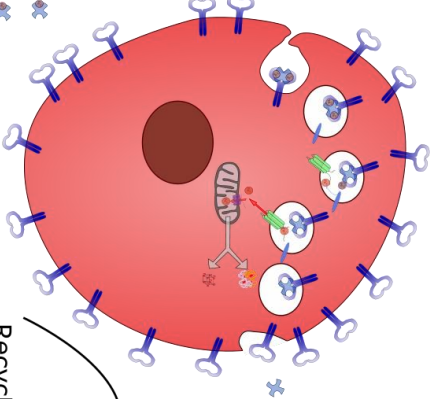
Entérocyte du duodénum Absorption



Hépatocyte Stockage



Érythroblaste Consommation



Recyclage par
érythrophagocytose

Macrophage Recyclage et stockage

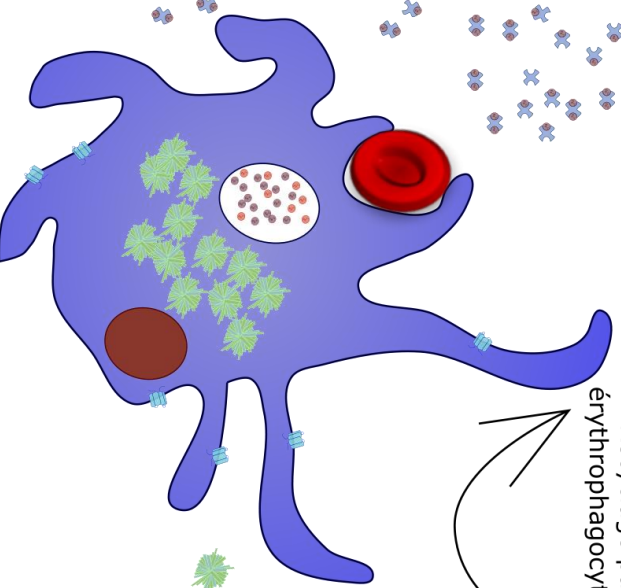


Figure 13 : La circulation du fer dans l'organisme.

Le fer trouvé dans l'alimentation (Fe^{2+} en rouge, Fe^{3+} en taupe) est internalisé dans l'entérocyte *via* DMT1 directement ou après réduction par DCYTB selon sa forme. Il est alors pris en charge par la chaperonne PCBP2 qui l'achemine à la FPN pour export, ou il est stocké dans des cages de ferritines. Ces cages sont composées de 24 sous-unités de chaînes légères/chaînes lourdes de ferritine (FTL/FTH1) chacune dans des ratios tissu-spécifiques. Le fer exporté par la FPN est pris en charge par l'apo-transferrine après oxydation par l'héphaéistine. L'holo-transferrine est captée par le TFR1 exprimé de façon ubiquitaire, mais dont 80% de l'expression totale est attribuée aux érythroblastes. L'internalisation du complexe Holo-Transferrine-TFR1 se fait de façon clathrine-dépendante, et une acidification progressive de la vésicule d'endocytose permet le détachement des atomes de fer de la transferrine. Ceux-ci sont réduits par STEAP3 et exportés de la vésicule d'endocytose vers le cytoplasme *via* DMT1. Le fer ferreux entre alors dans la mitochondrie par la mitoferrine-1 dans les érythroblastes, par la mitoferrine-2 dans tous les autres types cellulaires. Une fois le fer internalisé, la mitochondrie va synthétiser à partir de ce fer soit des clusters fer-soufre, soit de l'hème. Dans l'érythroblaste, l'hème est majoritairement utilisé pour la production d'hémoglobine. Finalement, le fer contenu dans les érythrocytes est recyclé par les macrophages du système réticulo-endothélial par phagocytose des globules rouges sénescents. Il est alors soit redistribué, soit stocké. En cas de saturation élevée en transferrine, le principal organe de stockage est le foie, et les hépatocytes sont responsables du maintien de l'homéostasie du fer.

2. Transfert au sein de l'îlot érythroblastique

Comme nous l'avons vu plus tôt, le macrophage central de l'îlot érythroblastique joue un rôle important dans la maturation des érythroblastes. Il va également intervenir dans la régulation du métabolisme du fer. En sécrétant l'interleukine 6 (IL-6), cytokine pro-inflammatoire, il va réduire la quantité de fer circulant disponible (voir la partie [III.3.B.b. La régulation de l'hepcidine par la voie de l'inflammation](#) pour le mécanisme moléculaire de cette régulation). De même, la sécrétion d'IFN- γ serait en mesure d'augmenter l'expression de DMT1 chez le macrophage et donc d'augmenter son absorption de fer¹⁰⁹. Dans les deux cas, en contexte inflammatoire, le macrophage est en mesure de réguler négativement la différenciation des érythroblastes en s'appropriant le fer et donc en limitant la synthèse de l'hémoglobine. Cependant, il est également capable de favoriser cette synthèse : il a été proposé qu'il soit en mesure de transférer directement du fer aux érythroblastes en cours de différenciation sous forme de ferritine¹¹⁰⁻¹¹², ce qui faciliterait l'accès des érythroblastes au fer même en cas de faible saturation de transferrine.

3. Les mécanismes de régulation liés au fer

A. Mécanismes de régulation au niveau cellulaire

L'excès de fer étant extrêmement toxique pour la cellule, les protéines majeures impliquées dans l'import, le traitement, le stockage et l'export de fer sont soumises à des mécanismes de régulation dépendant du niveau intracellulaire d'hème et de fer.

La concentration intracellulaire de fer va exercer un contrôle post-transcriptionnel de l'expression de certaines protéines. Dans les régions non traduites de leur ARN messager (**ARNm**) se trouve un *Iron Responsive Element* (**IRE**, élément de réponse au fer). Les IRE forment une structure tige-boucle, et peuvent se trouver aussi bien en 3' UTR qu'en 5'UTR (*Untranslated region* – région non traduite)¹¹³. Quand la concentration intracellulaire en fer est faible, les protéines *Iron Responsive Protein 1* et *Iron Responsive Protein 2* (**IRP1**, **IRP2**) sont capables de se fixer sur les IRE. La fixation d'IRP1/2 sur les IRE en 5' vont empêcher la traduction de l'ARNm en limitant leur accès aux ribosomes (**figure 14**). Au contraire, leur fixation sur les IRE en 3' vont stabiliser les ARNm et augmenter leur demi-vie en les protégeant des endonucléases (**figure 14**). En cas d'excès de fer, un cluster fer-souffre peut s'associer à IRP1, lui permettant d'exercer une activité aconitase, mais l'empêchant de se fixer sur les IRE. IRP2, quant à elle, est dégradée par le protéasome suite à son ubiquitinylation par **FBXL5** (*F box and leucine-rich repeat protein 5*)^{114,115}.

En condition de carence en fer, la FPN est moins traduite du fait de la présence d'un IRE dans la partie 5'UTR de son transcrite canonique¹¹⁶. Il est néanmoins à noter que Ciannetti et collaborateurs ont identifié en 2005 l'existence de transcrits alternatifs de la FPN dénoués d'IRE dans les érythroblastes humains en cours de différenciation¹¹⁷. Le récepteur à la transferrine TFR1 possède, lui, 5 éléments en 3'UTR, ce qui permet une traduction bien plus efficace, et donc une augmentation d'expression participant à rétablir une concentration en fer normale. Il est particulièrement régulé, puisqu'à l'inverse la Sérine/Thréonine kinase MRCK α (*Myotonic dystrophy kinase-Related CDC42-binding kinase*) est encodée par *CDC42BPA* qui ne possède qu'un unique IRE dans sa 3' UTR¹¹⁸.

Concentration cellulaire en fer :

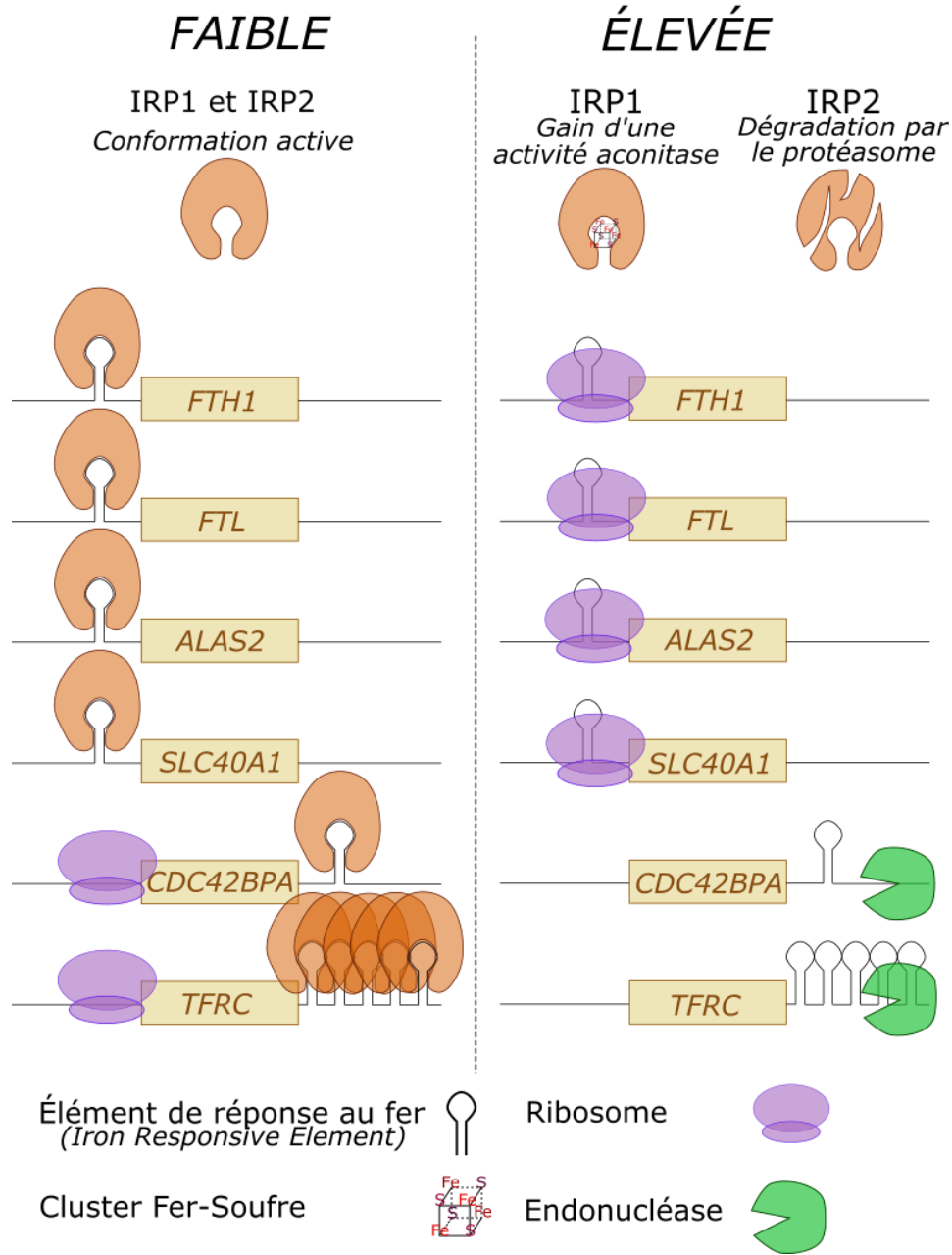


Figure 14 : Régulation cellulaire dépendante du fer – Le système IRE/IRP.

La présence des éléments de réponse au fer (*Iron Responsive Element – IRE*) sur l'ARNm encodant certaines protéines permet à celles-ci d'être régulées de façon post-transcriptionnelle par la concentration intracellulaire en fer. En situation de carence, les protéines de réponse au fer (*Iron Responsive Protein 1 & 2*) peuvent se fixer sur les IRE ; si ces derniers se situent dans la 5'UTR, la fixation d'IRP1/2 va limiter la traduction des ARNm qui les contiennent en empêchant le ribosome d'y accéder. Au contraire, s'ils se situent en 3'UTR, la dégradation par les RNAses est limitée ; l'ARNm est donc stabilisé et peut potentiellement être traduit plus de fois. En situation d'excès de fer, IRP2 est ubiquitinylée et dégradée par le protéasome, tandis qu'IRP1 gagne un cluster Fer-Soufre lui conférant une activité

aconitase – ni l’une, ni l’autre n’est donc en mesure de se fixer sur les IRE. L’intégralité des ARNm contenant un IRE n’est pas représentée sur ce schéma, ni citée dans ce manuscrit. Schéma inspiré de Muckenthaler et al., 2008¹¹⁹.

Outre le contrôle exercé par le fer intracellulaire, la concentration d’hème va également entrer en compte. Au niveau transcriptionnel, certains gènes sont régulés par des *MAF responsive/Antioxidant Response Elements (MARE)*. Ce type de contrôle repose sur la famille de protéines **MAF** qui, selon leur partenaire, vont permettre soit l’activation, soit le maintien dans un état « prêt à être activé » (*poised*). Le répresseur transcriptionnel **BACH1** s’associe aux MAFs. Les hèmes non associés à des protéines (hémoglobine, cytochrome P450, ...) peuvent se fixer sur BACH1, ce qui inhibe sa capacité à se fixer sur l’ADN et entraîne son expulsion du noyau¹²⁰. Le déplacement de BACH1 permet à l’activateur transcriptionnel **NRF2** de prendre sa place en s’associant à son tour aux MAFs. Les éléments MARE sont retrouvés en amont de *BACH1*, dont l’expression est ainsi induite par NRF2, et réprimée par lui-même¹²¹. Ils sont également présents en amont de *HMOX1* qui encode l’hème oxygénase responsable de la dégradation de l’hème, ce qui peut être considéré comme une seconde boucle de rétrocontrôle. Finalement, des MAREs sont présents dans le *locus control region (LCR)* de la globine β ¹²⁰, les promoteurs de *Ftl* et *Fth1* (encodant la Ferritine L et la Ferritine H respectivement)¹²², et dans le promoteur de *SLC40A1*¹²³ qui encode la FPN (**figure 15**).

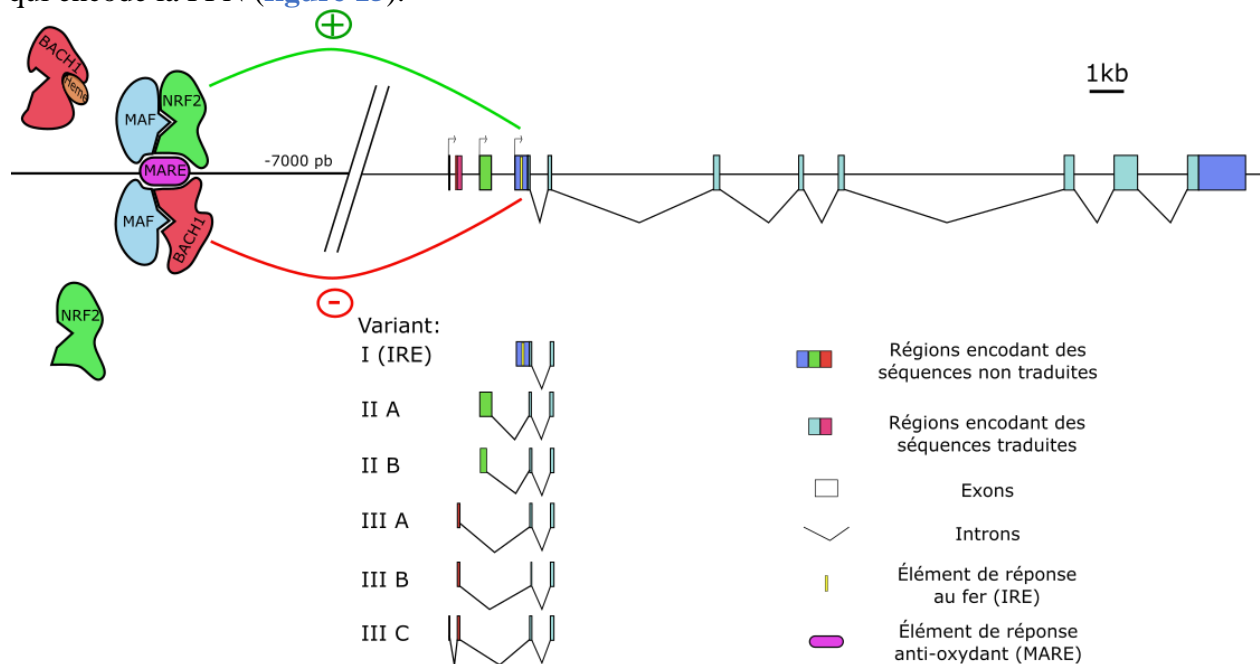


Figure 15 : La régulation par le fer – L’exemple de *SLC40A1*.

La présence d’un élément de réponse anti-oxydant (MARE, en rose) en amont du promoteur de *SLC40A1* (encodant la FPN) permet sa régulation transcriptionnelle en fonction de la présence d’hème libre. Quand un hème se fixe sur

BACH1 (en rouge), NRF2 (en vert) est en mesure de s'associer à MAF (en bleu), et va favoriser la transcription du gène (en haut). Au contraire, lorsqu'il n'y a pas d'hème libre, BACH1 occupe le MARE et les MAFs, empêchant NRF2 de jouer son rôle d'activateur transcriptionnel (en bas). À ce contrôle s'ajoute un second niveau de régulation, dépendant du niveau intracellulaire de fer, et post-transcriptionnel. Il repose sur la présence d'éléments de réponse au fer (IRE, en jaune) dans les ARNm. Dans le cas de *SLC40A1*, le transcrit canonique et majoritaire contient un IRE (variant I), ce qui va empêcher sa traduction en condition d'appauvrissement en fer. Le gène encode cependant différents transcrits moins exprimés, qui eux ne possèdent pas d'IRE (variant II et III), et échappent donc à cette régulation.

B. Mécanismes de régulation au niveau systémique

La régulation de l'homéostasie du fer dans l'organisme se fait principalement grâce à l'hormone HEPCIDINE (**HEPC**), produite par les hépatocytes. Décrite tout d'abord comme peptide antibactérien, l'HEPC module l'import de fer dans l'organisme *via* les entérocytes ainsi que la mobilisation des stocks présents dans les hépatocytes et les macrophages. La fixation de HEPC sur l'exportateur de fer FPN inhibe son activité¹²⁴, d'une part en induisant un changement de conformation empêchant l'export de fer¹²⁵, et d'autre part en médiant son ubiquitinylation et *in fine* dégradation¹²⁶. La régulation de la production hépatique de HEPC est complexe, et dépend de plusieurs éléments¹²⁷ dont le sexe de l'individu ; en effet, la testostérone diminue la production d'HEPC¹²⁸.

a. La régulation de l'hepcidine par la voie du fer

i. Induction par les BMPs

En condition d'excès de fer, le *Bone Morphogenetic Protein 6* (**BMP6**) et le *Bone Morphogenetic Protein 2* (**BMP2**), facteurs de croissance membres de la famille des TGF- β , sont produits par les cellules endothéliales sinusoidales du foie^{102,130}. L'expression de BMP6 est induite suite à l'augmentation du niveau intracellulaire de fer – et donc de stress oxydant – dans les cellules endothéliales *via* NRF2 (voir la partie [II.3.A. Mécanismes de régulation au niveau cellulaire](#))¹³¹. BMP6¹³² et BMP2¹³³ se fixent sur les récepteurs aux BMPs de type 1¹³⁴ et type 2¹³⁵ (ALK2/ALK3 et ACTR2A (*Activin receptor type 2A*)/BMPR2 respectivement) et leur corécepteur HÉMOJUVÉLINE (**HJV**)^{132,133} exprimés par les hépatocytes (**figure 16**). La transduction du signal se fait *via* la phosphorylation de SMAD1/5/8, et la translocation de SMAD4¹³⁶ au noyau qui se fixe

sur les éléments de réponse aux SMAD présents en amont du promoteur de *HAMP*, encodant l'HEPC. Le *Bone Morphogenetic Protein 4* (**BMP4**) peut également induire l'expression d'HEPC en se fixant sur le complexe HJV-NÉOGÉNINE¹³⁷¹³⁸. BMP6 reste cependant le principal inducteur de la synthèse d'hepcidine¹³⁹.

HJV peut être clivée par la protéase FURINE¹⁴⁰ et inhiber la production d'HEPC¹⁴⁰ en interférant avec le signal des BMP – sûrement en entrant en compétition avec les partenaires de HJV non clivé, ce qui déstabilise le complexe. Les récepteurs aux BMPs peuvent être clivés par la MATRIPTASE-2 (aussi appelée TMPRSS6), ce qui inhibe la production d'HEPC¹⁴¹. TMPRSS6 a également été suggérée comme la protéase responsable du clivage de HJV¹⁴²⁻¹⁴⁴, mais cela reste discuté dans la littérature¹⁴¹.

ii. Induction par TFR2

La saturation de la transferrine est sensée par les hépatocytes *via* le récepteur à la transferrine de type 2 (**TFR2**) qu'ils expriment à leur surface. Elle se situe entre 20 et 30% chez les individus sains. L'Holo-Tf est principalement captée par l'homologue de TFR2, le TFR1, qui est exprimé de façon ubiquitaire et importe le fer dans la cellule (comme expliqué dans la partie [II.1. La circulation du fer dans l'organisme](#)). La fixation de l'Holo-Tf sur TFR1 médie son internalisation. TFR1 ayant une affinité pour l'Holo-Tf 27 fois supérieure à celle de TFR2¹⁴⁵, et étant bien plus exprimé, l'Holo-Tf ne se fixe à TFR2 que si tous les TFR1 sont déjà liés à l'Holo-Tf. Contrairement à TFR1, TFR2 est stabilisé à la surface par la liaison de son ligand Holo-Tf¹⁴⁶, ce qui est en faveur d'un rôle de senseur de fer, et non d'import. Suite à la fixation d'Holo-Tf sur TFR2, ce dernier transduit un signal inconnu qui aboutit à la transcription de *HAMP*. Pour plus d'informations sur TFR2, se référer à la partie [III.1. Structure et régulation du récepteur à la transferrine de type 2](#).

La protéine **HFE** (*High Fe*) a été décrite comme capable de se lier au TFR1 de façon compétitive avec l'Holo-TF¹⁴⁷, mais également avec le TFR2¹⁴⁸. Le site de fixation de HFE et celui de l'Holo-Tf se recouvrant, la fixation de l'Holo-Tf sur TFR1 pourrait déloger HFE, ce qui lui permettrait d'interagir avec TFR2^{149,150}. Son association avec TFR2 n'étant pas enrayée par la fixation de l'Holo-Tf, cela pourrait potentialiser la signalisation en aval – bien que pour l'instant son mécanisme d'action, tout comme la signalisation médiée par TFR2, demeure inconnue. De plus,

l'association entre TFR2 et HFE reste discutée¹⁵¹. HFE est capable d'induire la production d'hepcidine en absence de TFR2¹⁵², et réciproquement¹⁵³. Les modèles murins *Tfr2*^{-/-}, *Hfe*^{-/-}, et *Tfr2*^{-/-}*Hfe*^{-/-} semblent présenter un niveau basal diminué de pErk1/2¹⁵⁴ et pSmad1/5/8^{155,153}, suggérant que ces intermédiaires de signalisation sont impliqués. TFR2 et HFE semblent, de plus, contrôler l'expression de furine¹⁵⁵, impliquée dans le clivage de HJV¹⁴⁰. Finalement, HFE, TFR2 et HJV semblent former un complexe protéique¹⁵⁶, et l'induction d'HEPC par HFE semble reposer sur la présence d'HJV¹⁵⁷. Pour plus de détails sur ces potentielles signalisations, se référer à la partie [III.5.A. Le rôle hépatique de TFR2](#).

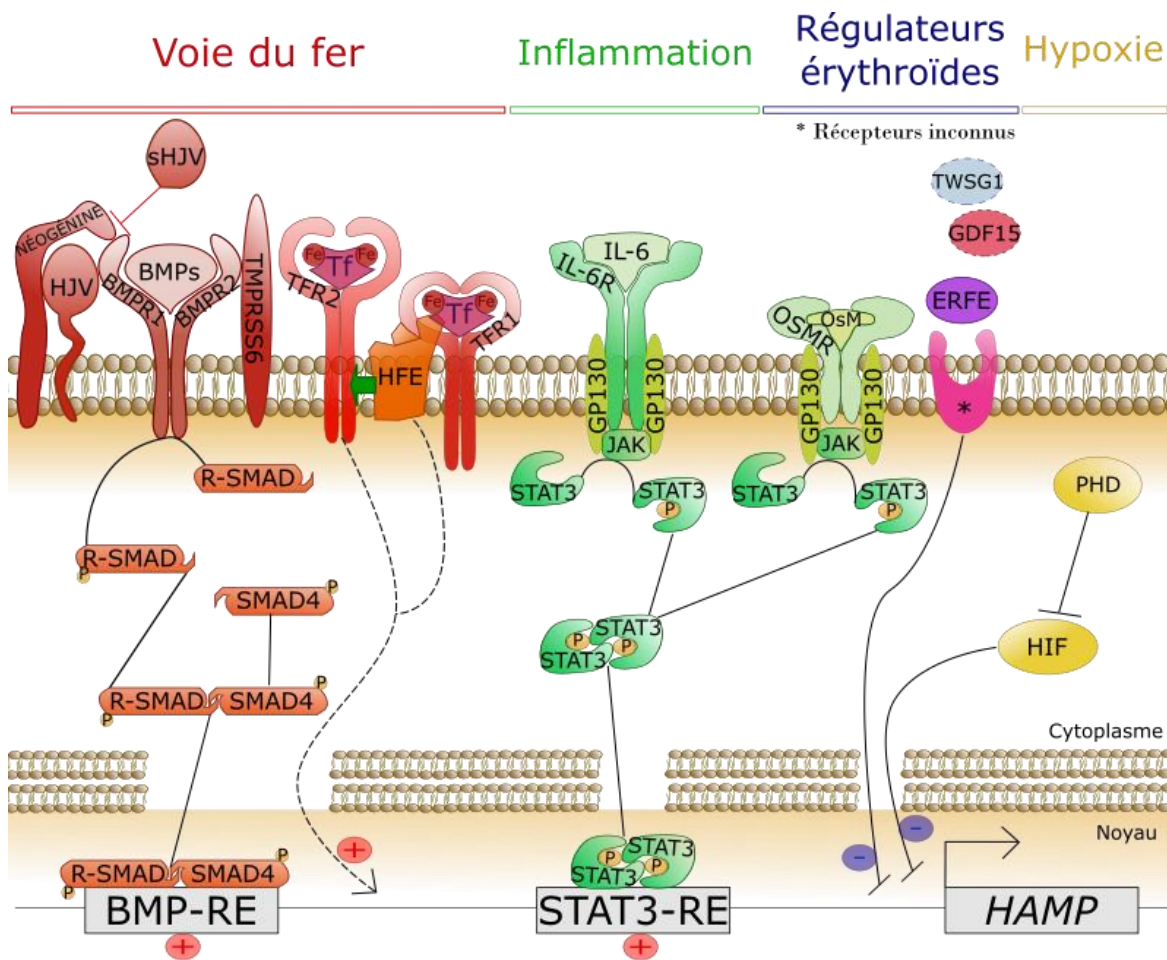


Figure 16 : Régulation systémique de l'homéostasie du fer – La synthèse d'hepcidine.

L'hepcidine est l'hormone hyposidémiante assurant le maintien de l'homéostasie du fer en inhibant l'import de fer dans l'organisme et la mobilisation de ses stocks. Encodée par le gène *HAMP* et produite par les hépatocytes, sa transcription est soumise à de nombreuses régulations. Tout d'abord, le niveau de fer contenu dans les cellules – *via* la production paracrine de BMPs par les cellules endothéliales avoisinantes lorsque celles-ci commencent à accumuler un pool de fer labile – et de fer circulant – *via* la saturation de la transferrine et sa fixation au récepteur à

la transferrine de type 2 – permettent l'induction de la transcription de *HAMP*. Les BMPs se fixent à leurs récepteurs (de type 1 BMPR1 et de type 2 BMPR2), fixation facilitée par les corécepteurs HÉMOJUVÉLINE (HJV) et NÉOGÉNINE. L'activation en aval se fait *via* la phosphorylation des SMADs (R-SMAD –SMAD régulatrices, ici SMAD1/5/8) et la translocation de SMAD4 au noyau, qui va favoriser la transcription de *HAMP* en se fixant sur les éléments de réponse aux BMP (BMP-RE). Le clivage furine-dépendant et la sécrétion paracrine de HJV soluble (sHJV) inhibe la transduction du signal de cette voie. La protéase TMPRSS6 (aussi appelée matriptase-2), inhibe la production d'hepcidine en clivant les BMPR, ainsi que le récepteur à la transferrine de type 2 (TFR2) en moindre mesure. La fixation de l'holo-transferrine (Tf) sur le récepteur à la transferrine de type 1 (TFR1), importateur de fer, va déplacer l'association de HFE-TFR1 en faveur de l'association HFE-TFR2. La signalisation en aval de TFR2-HFE n'est pour l'instant pas correctement établie. L'inflammation suite à une infection va également favoriser la transcription de *HAMP* *via* la voie IL-6/IL-6R/STAT3 et la présence d'éléments de réponse à STAT3 (STAT3-RE) en amont de *HAMP*. La transcription de *HAMP* va également être favorisée par l'Oncostatine M (OsM) qui est produite par les érythroblastes et dont le récepteur GP130-OSMR est exprimé à la surface des hépatocytes. Au contraire, un besoin augmenté de fer généré par une érythropoïèse accrue va réprimer l'expression de *HAMP* *via* de potentiels régulateurs érythroïdes du métabolisme du fer tels que l'Érythroferrone (ERFE), le *Growth Differentiation Factor 15* (GDF15), ou *Twisted-Gastrulation 1* (TWSG1) ; bien que leurs potentiels récepteurs demeurent également inconnus. Finalement, l'hypoxie est également un régulateur négatif de la synthèse d'hepcidine, puisqu'en condition hypoxique, la prolyl-hydroxylase PHD n'est plus en mesure d'inhiber le facteur de transcription *Hypoxia Inducible Factor* (HIF), qui va réprimer la synthèse de *HAMP*.

b. La régulation de l'hepcidine par la voie de l'inflammation

Comme tous les organismes vivants, les bactéries ont besoin de fer pour leur métabolisme. En cas d'infection, celui-ci est donc très vite capté. L'infection et l'inflammation vont limiter la quantité de fer circulant en induisant l'expression de *HAMP*. La cytokine pro-inflammatoire IL-6, en se liant à son récepteur IL-6R exprimé à la surface des hépatocytes, va induire la phosphorylation de STAT3, sa dimérisation, et translocation au noyau (**figure 16**) ; ce qui permettra *in fine* sa fixation sur les éléments de réponse à STAT3 présents en amont de *HAMP*^{158,159}. Il est à noter que la présence d'ALK3 (BMP récepteur de type 1) a été impliquée dans cette signalisation également, ce qui sous-entend que la voie de l'inflammation (IL-3/STAT3) et du fer (BMP/SMAD) peuvent interagir¹⁶⁰.

c. La régulation de l'hepcidine par les régulateurs érythroïdes

Comme nous l'avons vu précédemment, le tissu érythroïde est le plus gros consommateur en fer de l'organisme, et peut s'adapter aux réserves en fer disponibles. Cependant, la production de globules rouges pouvant augmenter jusqu'à 7 fois en cas d'hémorragie, il est logique que la production de globules rouges puisse, à son tour, réguler l'import de fer dans l'organisme. Plusieurs « régulateurs érythroïdes de l'homéostasie du fer » ont été proposés.

Les précédents travaux de notre équipe, en collaboration avec l'équipe de Sophie Vaultont, ont montré que l'Oncostatine M (**OsM**), cytokine de la même famille que l'IL-6, est en mesure d'induire la production d'hepcidine dans les cellules hépatiques HUH7¹⁶¹. Celles-ci expriment la sous-unité OSMR (Oncostatine M Receptor) qui, en s'associant au GP130, permet la transduction d'un signal en aval. L'OsM est produite par les cellules érythroïdes, et activerait les voies STAT et MAPK/ERK ; bien que cette dernière ne semble pas impliquée dans l'up-régulation de l'HEPC. En effet, la transcription de *HAMP* en aval de l'OsM se fait *via* les éléments de réponse aux STAT, comme pour l'IL-6¹⁶¹. Il s'agit du seul régulateur érythroïde positif qui a été décrit, et son rôle n'est pas encore clair. En effet, sa production est dépendante d'EPO¹⁶¹ ; elle se ferait donc en situation d'expansion des cellules érythroïdes, nécessitant l'import de fer dans l'organisme – et non son inhibition. De plus, alors que la production d'OsM est usuellement à effet paracrine, les cellules de la moelle ne répondent pas à l'OsM, et son acheminement jusqu'aux hépatocytes *in vivo* n'est pas démontré. Son rôle reste donc à éclaircir.

À l'inverse, plusieurs régulateurs négatifs ont été trouvés ; parmi eux, l'érythroferrone (**ERFE**) est synthétisée par les érythroblastes lors d'une érythropoïèse de stress due par exemple à une phlébotomie¹⁶². La production d'ERFE est stimulée par l'EPO *via* la voie de signalisation JAK2/STAT5, et ERFE exerce son action directement sur les hépatocytes – bien que son récepteur demeure inconnu¹⁶². ERFE inhibe la production d'HEPC en interagissant avec BMP5, BMP6 et BMP7, interférant ainsi avec la transduction du signal *via* les SMAD¹⁶³. TMPRSS6 est responsable du clivage des BMPRs, et donc régulateur négatif de la voie BMP/SMAD. Lorsque celle-ci est invalidée, la voie des SMADs est hyperactivée. Arezes et collaborateurs observent que la suppression de *HAMP* par ERFE se fait même après knockdown de TMPRSS6 dans les HUH7 (lignée hépatique humaine)¹⁶³, et Aschemeyer et collaborateurs observent la même chose dans les hépatocytes murins primaires¹⁶⁴ ; suggérant que le mécanisme d'action d'ERFE est indépendant de

TMPRSS6. Cependant, Nai et collaborateurs observent qu'Erfe ne suffit pas à inhiber la production d'hepcidine dans un contexte *Tmprss6*^{-/-} 165, et donc que *Tmprss6* est nécessaire à la suppression de *Hamp* par Erfe. La contribution de TMPRSS6 dans cette régulation reste donc ambiguë.

Parmi les régulateurs négatifs qui ont été suggérés se trouve le *Growth Differentiation Factor 15 (GDF15)*, qui a été identifié dans les β -thalassémies par Tanno et collaborateurs comme un facteur produit par les érythroblastes et inhibant la transcription de *HAMP*¹⁶⁶. La production de GDF15 par les érythroblastes est dépendante de la présence de TFR2¹⁶⁷. Cependant, les doses de GDF15 présentes chez les patients β -Thalassémiques qui permettent la suppression de l'HEPC sont bien supérieures à celles retrouvées chez des patients sains¹⁶⁸. De ce fait, dans un contexte non-pathologique, GDF15 n'intervient sûrement pas dans la régulation de l'hepcidine, car les doses physiologiques n'induiraient que d'infimes variations d'HEPC. Il en est de même pour le dernier facteur *Twisted Gastrulation 1 (TWSG1)*, également identifié par Tanno et collaborateurs¹⁶⁹. TWSG1 est également produit par les érythroblastes de patients atteints de β -Thalassémie, et est en mesure de contrer la régulation positive exercée par BMP2 et de BMP4 sur l'expression de *HAMP*, en inhibant la phosphorylation des SMAD¹⁶⁹.

d. La régulation de l'hepcidine par l'hypoxie

Tout comme l'érythropoïèse, l'hypoxie est un régulateur négatif de la transcription de *HAMP*. Les prolyl-hydroxylases utilisent l'oxygène comme réactif. En condition normoxique, la prolyl-hydroxylase 2 (**PHD2**) hydroxyle le *Hypoxia Inducible Factor 1 α (HIF-1 α)*. HIF-1 α est alors dégradé par le protéasome. En situation d'hypoxie, PHD2 ne peut hydroxyle HIF-1 α ¹⁷⁰, qui peut alors s'associer avec le *Hypoxia Inducible Factor 1 β (HIF-1 β)*. L'hétéro-dimère peut alors se fixer sur les promoteurs de ses gènes cibles, et réprimer notamment la transcription de *HAMP* – cependant, il n'est toujours pas clair si l'action de HIF sur *HAMP* se fait directement ou indirectement¹⁷¹. Il est à noter cependant que des éléments de réponse à HIF sont présents en amont de *TMPRSS6*¹⁷², et assure son up-régulation, participant d'autant plus à la répression de *HAMP*.

4. La ferroportine – acteur majeur du métabolisme du fer

Comme expliqué précédemment, l'hepcidine agit directement en inhibant l'export de fer en induisant un changement de conformation de FPN¹²⁵, ou en médiant son ubiquitinylation et *in fine* sa dégradation^{126,173}.

Exprimée surtout par les entérocytes, les macrophages et les hépatocytes, la FPN est responsable de l'import de fer dans l'organisme mais aussi de la mobilisation des stocks de fer. Cependant, la FPN semble également exprimée par les cellules érythroïdes^{30,49,117,174}. Alors que la synthèse d'hémoglobine demande l'accumulation de quantité non négligeable de fer, l'expression de FPN par les érythroblastes semble contre intuitive. Pourtant, lors de la différenciation érythroïde murine, il s'agit même de transcrits non soumis au contrôle IRE/IRP (se référer à la partie [II.2.A. Mécanismes de régulation au niveau cellulaire](#)) qui sont majoritairement exprimés^{117,175} (**figure 15**). L'existence de tels transcrits chez l'Homme a été identifiée dans les érythroblastes¹¹⁷ et dans les entérocytes¹¹⁶. En cas de carence martiale, la possibilité que les érythroblastes puissent redistribuer leur fer pourrait expliquer l'expression de FPN lors de l'érythropoïèse¹⁷⁶. La FPN est, de plus, fortement exprimée par les globules rouges^{177,178}. Zhang et collaborateurs ont récemment montré que l'HEPC n'entraînait pas la dégradation de la FPN présente à la surface des GRs, mais seulement son changement de conformation, permettant ainsi d'inhiber l'export de fer¹⁷⁸. En effet, l'accumulation de fer au sein de la cellule favorise la production de ROS et donc les processus d'apoptose et de ferroptose⁹⁰ ; la présence de la FPN à la surface des GRs est donc nécessaire à la prévention de la mort cellulaire.

5. Les déséquilibres du métabolisme du fer

La régulation de l'homéostasie du fer est, comme nous venons de le voir, particulièrement complexe. La majorité des éléments de compréhension que nous avons à ce jour sur les mécanismes impliqués repose sur les pathologies d'origine génétique qui mènent à une dérégulation de *HAMP*.

Les mutations des gènes codant les protéines régulatrices de la production d'HEPC peuvent entraîner des surcharges en fer, appelées **hémochromatoses héréditaires**. Il en existe quatre types (**table 1**), et elles touchent environ un individu sur 400 en Europe¹⁷⁹. Les hémochromatoses héréditaires de type 1, 2 et 3 vont entraîner une production amoindrie d'HEPC, et donc un apport constant de fer dans l'organisme provenant de l'alimentation. De même, une mutation gain de fonction de FPN va empêcher l'action inhibitrice d'HEPC et entraîne également une hémochromatose héréditaire – en l'occurrence de type 4 (**table 1**). Du fait d'une production amoindrie d'HEPC ou d'une insensibilité à son action, les stocks de fer présents dans les tissus de réserve (hépatocytes, macrophages, ...) sont mobilisés, alors que la saturation de la transferrine est déjà élevée (supérieure à 45%). Un niveau accru de ferritine dans le sang est observé chez ces

patients : supérieur à 200µg/L chez la femme, supérieur à 300µg/L chez l'homme. Une accumulation de fer est également présente dans les parenchymes, en particulier hépatique. Les capacités de stockage cellulaire (ferritines) et de complexation pour la circulation dans le sérum (transferrine) étant dépassées, le fer non lié à la transferrine (**NTBI**, *Non Transferrin Bound Iron*) s'accumule. Le NTBI est particulièrement toxique, entraînant la production d'espèces réactives de l'oxygène¹⁸⁰ et des lésions tissulaires¹⁸¹. En absence de traitement, des défaillances secondaires peuvent apparaître¹⁸⁰ :

- Des cirrhoses hépatiques, le foie étant le premier organe affecté par la surcharge. Celles-ci sont propices à l'apparition/la progression d'hépto-carcinomes¹⁸² et l'accumulation de fer favorise la carcinogénèse et les métastases⁹⁰.
- Des défaillances cardiaques (cardiomyopathies), le cœur étant un organe particulièrement sensible aux surcharges martiales (voir [III.5.B.b. Le rôle de TFR2 dans le cœur](#) où ce sujet est plus exploré).
- Des dérèglements endocriniens et hypogonadisme pouvant mener à la stérilité si la surcharge martiale se met en place très tôt ; ce qui est le cas dans l'hémochromatose juvénile.
- De l'arthrite et de l'ostéoporose.
- Du diabète.

Ces mêmes symptômes sont observés dans les hémochromatoses acquises secondairement à une autre pathologie (**hémochromatose secondaire**). Le principal traitement des hémochromatoses, qu'elles soient héréditaires ou acquises, consiste en des **phlébotomies** (*id est* des saignées) régulières. En effet, la perte de globules rouges qui s'opère permet de diminuer la quantité totale de fer dans l'organisme – et de réallouer le fer surnuméraire à la production de globules rouges désormais manquants. Comme il n'existe pas de processus physiologique d'élimination du fer de l'organisme, c'est là la seule solution pour diminuer le bilan martial de ces patients. Dans certains rares cas, les phlébotomies peuvent être associées à l'utilisation de chélateurs de fer tels que le *Déférasirox* inoculé par voie orale ou la *Déféroxamine* inoculée par injection sous-cutanée. Cette dernière est un chélateur plus efficace, mais est moins bien tolérée à long terme par les patients¹⁸³.

Les hémochromatoses secondaires peuvent être liées à des transfusions répétées ainsi qu'à diverses pathologies, telles que les β -thalassémies. Les β -thalassémies touchent 1 personne sur 100 000¹⁸⁴, et sont dues à des mutations dans le gène encodant la globine β (cf. [I.2.B.b.ii. La synthèse de](#)

l'hémoglobine). Le nombre insuffisant de chaînes β comparé au nombre de chaînes α va provoquer une agrégation de ces dernières dès le stade érythroblaste polychromatophile¹⁸⁵. Ces agrégats sont toxiques et produisent une hémolyse précoce des globules rouges, ainsi qu'un arrêt de différenciation au stade érythroblaste polychromatophile suivi de la mort cellulaire. L'érythropoïèse est alors caractérisée d'« inefficace » puisque malgré la présence de précurseurs érythroïdes, ceux-ci n'aboutissent pas à la production de globules rouges. Du fait du faible nombre d'érythroblastes arrivant à se différencier, et du temps de survie réduit des globules rouges en circulation, les patients atteints de β -thalassémie sont anémiques. En conséquence, les cellules du rein perçoivent une situation d'hypoxie, et la production d'EPO augmente. L'EPO va à son tour favoriser la survie des précurseurs immatures érythroïdes, sans que ceux-ci ne puissent se différencier, aggravant le phénotype d'érythropoïèse inefficace. De plus, les doses pathologiques d'EPO induisent la production exacerbée d'ERFE^{162,186}, régulateur négatif de l'hepcidine (cf. II.3.B.c. La régulation de l'hepcidine par les régulateurs érythroïdes), induisant un import accru de fer au niveau intestinal. De plus, selon la sévérité de la pathologie qui dépend du déséquilibre plus ou moins prononcé entre la production des chaînes α et β , les patients peuvent nécessiter des transfusions répétées¹⁸⁷, ce qui participe à l'installation de la surcharge martiale.

Certaines mutations entraînent au contraire une production exacerbée d'hepcidine, ce qui mène à une absorption intestinale réduite et à une absence de mobilisation des stocks de fer présents dans les tissus de stockage. On observe alors la mise en place de carences martiales et d'anémies. C'est notamment le cas des patients atteints d'IRIDA (*Iron Refractory Iron Deficiency Anemia*) qui portent des mutations dans le gène *TMPRSS6*¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. L'anémie peut également être due à des carences alimentaires, et est le principal défaut du métabolisme du fer, touchant environ 25% de la population mondiale¹⁹¹.

Table 1 : Les hémochromatoses héréditaires.

Type :	1 ¹⁹²	2a ¹⁹³	2b ¹⁹²	3 ^{192,195,196}	4 ¹⁹⁷
Gène muté	<i>HFE</i>	<i>HJV</i>	<i>HAMP</i>	<i>TFR2</i>	<i>SLC40A1</i>
Chromosome	6p	1q	19q	7q	2q
Transmission	Autosomique récessive	Autosomique récessive	Autosomique récessive	Autosomique récessive	Autosomique dominante
Protéine	HFE	HJV	HEPCIDINE	TFR2	FPN
Rôle physiologique	Protéine régulatrice d'HEPC	Protéine régulatrice d'HEPC	Hormone hyposidéremiante	Protéine régulatrice d'HEPC	Exportateur de fer
Âge des premiers symptômes	40-60 ans chez l'homme / Post-ménopause chez la femme.	Avant 20 ans, forme juvénile.	Avant 20 ans, forme juvénile.	Avant 30 ans en général, mais l'accumulation dans le foie peut se faire entre la 1 ^{ère} et 2 ^{ème} décennie dans certains cas ¹⁹⁴ .	40-60 ans chez l'homme / Post-ménopause chez la femme. Forme résistante à l'hepcidine.
Niveau d'HEPC circulante	Normale à réduite.	Quasi absente.	Quasi absente.	Basse.	Normale.

III. Le récepteur à la transferrine de type 2

Comme nous venons de le voir dans la partie précédente, le métabolisme du fer et l'érythropoïèse se régulent l'un et l'autre, afin d'équilibrer au mieux le besoin de l'organisme en globules rouges et la gestion du fer qui est toxique. Comme mentionné précédemment, TFR2 joue un rôle de senseur de la concentration circulante en fer dans les hépatocytes, et médie l'augmentation d'expression de l'hepcidine lorsque cette concentration augmente. La transduction du signal en aval de TFR2 se fait par une signalisation qui demeure totalement inconnue. TFR2 est de plus, comme nous allons le voir, impliqué dans l'érythropoïèse. Dans cette partie, je récapitulerai ce qui est connu à ce jour sur TFR2.

1. Structure et régulation du récepteur à la transferrine de type 2

Le récepteur à la transferrine de type 2 – **TFR2** – est une glycoprotéine transmembranaire de type II, membre de la famille des récepteurs à la transferrine. TFR2 présente une forte homologie avec le récepteur à la transferrine de type 1 (aussi appelé CD71)^{198,199}. Il est encodé par le gène *TFR2* sur le bras long du chromosome 7 chez l'Homme (7q22.1), à proximité du gène encodant l'érythropoïétine²⁰⁰. L'hypothèse que le gène *TFR2* est issu d'une duplication du gène *TFRC* (qui encode TFR1) est privilégiée. *TFR2* est long de 2 471 paires de base (**pb**), et se compose de 19 exons. Il existe deux promoteurs, générant les formes TFR2 α (la forme canonique qui nous intéressera par la suite) qui est issue de la transcription de tous les exons, et TFR2 β pour qui le promoteur se situe dans l'exon 5 (**figure 17**). Ce promoteur étant en phase avec celui de TFR2 α , les deux variants sont identiques entre les exons 5 et 19 ; il est à noter cependant que TFR2 β a 142 pb additionnelles non traduites dans son 5' UTR, pouvant influencer sa régulation post-transcriptionnelle¹⁹⁸.

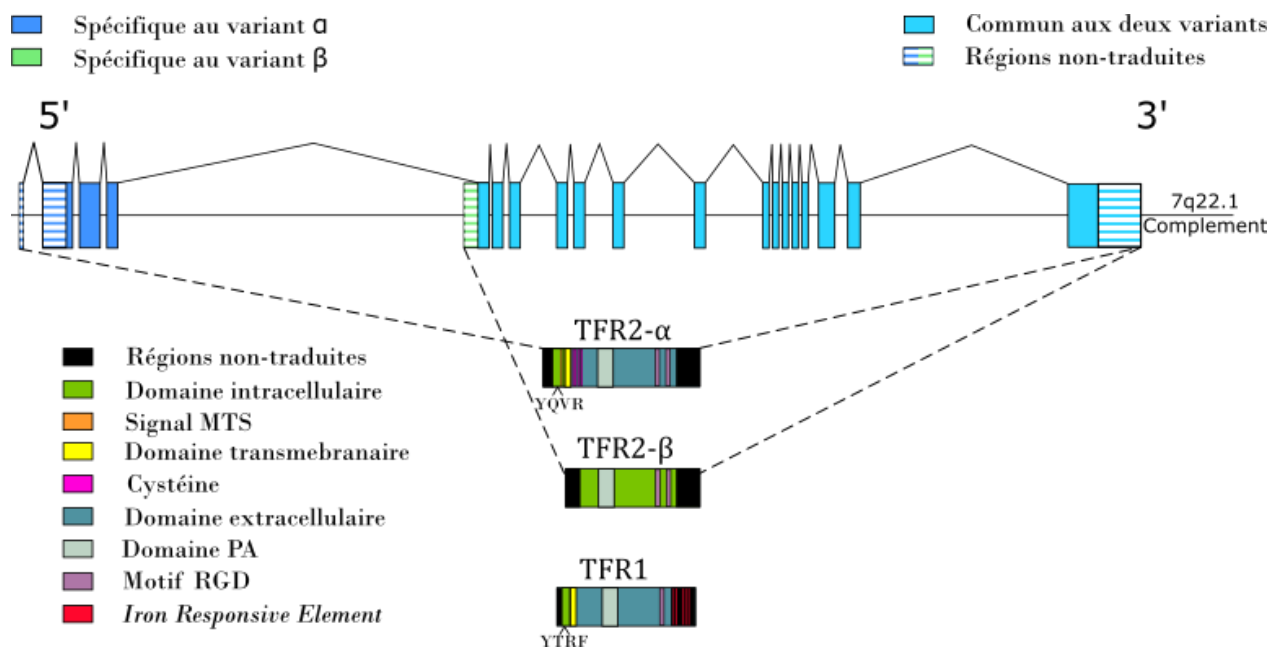


Figure 17 : Structure du gène *TFR2* et comparaison des variants *TFR2-α* et *TFR2-β* avec *TFR1*.

Le gène *TFR2* se compose de 19 exons, et se situe chez l'Homme sur le chromosome 7 (région 7q22.1), sur le brin complémentaire. Le gène génère deux variants : α et β . La transcription de ce dernier commence avec l'exon 5, avec 142bp spécifiques de β en amont de la séquence commune à α et β . Ces 142pb ne seront pas traduites, et le début de la séquence traduite de β correspond au domaine extracellulaire de α . Sur la forme α , le domaine intracellulaire se compose de 83 acides aminés (a.a), le domaine transmembranaire de 21 a.a. (84-105), et le domaine extracellulaire de 697 a.a. (105-801). Des cystéines, au nombre de 4 (a.a. 89, 98, 108 et 111), permettent à *TFR2-α* de se dimériser. Aucune région « transmembranaire » n'étant détectée chez β , cette forme est supposée cytoplasmique mais jusqu'alors, il n'y a pas eu de détection de cette forme au niveau protéique. Les deux variants de *TFR2* possèdent des **motifs RGD** (Arginine-Glycine-Acide aspartique) permettant la fixation de la transferrine, et un *protease-associated domain* (**domaine PA**), tout comme *TFR1*. On trouve dans le domaine intracellulaire de *TFR2-α* un motif d'internalisation YQVR qui rappelle celui présent dans *TFR1* (YTRF). Cependant, alors que *TFR1* est régulé de façon post-transcriptionnelle par la concentration intracellulaire en fer grâce à des éléments de réponse au fer (***Iron Responsive Element***), *TFR2* n'est pas soumis à ce type de régulation. De plus, un **signal MTS** (*Mitochondrial Targeting Sequence*) a récemment été mis en évidence en N-terminal dans le domaine intracellulaire de *TFR2-α*, qui n'est pas retrouvé dans *TFR1*. La structure du gène *TFR2* peut être visualisée sur NCBI (Gene ID : 7036, mise-à-jour du 12 mai 2019), et la structure des différents transcrits est annotée sur e!Ensemble (ENST00000462107.1). La représentation des transcrits de *TFR2* à partir de leur région génique est inspirée de Kawabata et al, 1999¹⁹⁸.

À ce jour, aucun mécanisme de régulation n'a été mis en évidence que ce soit au niveau transcriptionnel ou traductionnel pour *TFR2β*. *Tfr2α* semble être régulé transcriptionnellement par

les facteurs de transcription Gata1, Klf1 et Cebp/α dans la lignée fibroblastique embryonnaire murine NIH3T3 ; Fog1 serait au contraire en mesure d'inhiber l'effet de Gata1²⁰¹. De plus, une augmentation de la transcription de *Tfr2α* est observée dans les souris invalidées pour *Hnf4α* spécifiquement dans le foie²⁰². Contrairement à leur cousin TFR1, ni TFR2α, ni TFR2β ne sont régulés de façon post-transcriptionnelle par le système IRE/IRP^{119,203,204} (pour rappel, cette régulation a été expliquée dans la partie [II.2.A. Mécanismes de régulation au niveau cellulaire, figure 14](#)).

TFR2α est très exprimé dans les hépatocytes comme nous l'avons vu précédemment²⁰⁵, mais également dans les érythroblastes^{206,167,30}, les macrophages²⁰⁷, le cerveau²⁰⁸⁻²¹⁰, et dans une moindre mesure dans les entérocytes^{211,212}. TFR2β est quant à lui exprimé faiblement mais de façon ubiquitaire¹⁹⁸ ; la rate¹⁹⁸ et le cœur²¹³ sont les tissus dans lesquels son expression est la plus forte.

Outre leur différence d'expression d'un point de vue tissulaire, du fait des quatre exons « manquants » à TFR2β, il ne possède pas les domaines cytoplasmique et membranaire trouvés dans TFR2α. Ainsi, TFR2β est identique au domaine extracellulaire de TFR2α et fait 60 kiloDaltons (**kDa**). Aucun peptide signal n'a été identifié dans TFR2β, on suppose donc qu'il est cytoplasmique. TFR2α se constitue de 801 aa¹⁹⁸, et du fait de sa glycosylation, fait 102 kDa. Il a une courte queue cytoplasmique (acides aminés (**aa**) 1 à 83) ne présentant aucune homologie avec celle de TFR1, bien qu'elle contienne une séquence consensus d'endocytose, YQRV¹⁴⁶, comme TFR1 qui a un motif d'internalisation YTRF²¹⁴ ([figure 17](#)). Dans son domaine intracellulaire se trouve un motif **MTS** (*Mitochondrial Targeting Sequence*), laissant sous-entendre qu'il peut être adressé à la mitochondrie ([figure 17](#))²¹⁵. À proximité de son domaine transmembranaire, 4 cystéines (aa 89-98 et 108-111) lui permettent de former des ponts disulfures et ainsi de s'homodimériser¹⁹⁸. Cette dimérisation est dépendante de la présence de N-glycosylation²¹⁶. Finalement, TFR2α possède un large domaine extracellulaire identique à 45% et similaire à 66% à celui de TFR1¹⁹⁸. Dans ce domaine extracellulaire se trouve un *protease-associated* motif, et 2 motifs **RGD** (Arginine, Glycine, Aspartate) permettant la fixation de la transferrine di-ferrique (appelée holo-transferrine, **Holo-Tf**)²¹⁷. Comme TFR1, TFR2α a une très faible affinité pour la transferrine non-chargée en fer (appelée apo-transferrine, **Apo-Tf**)²¹⁸. Son affinité pour l'Holo-Tf est cependant 27 fois inférieure à celle de TFR1¹⁴⁵. La fixation de l'Holo-Tf sur TFR2 n'est possible que si TFR2 est dimérisé, et notre équipe a montré que la fixation de l'Holo-Tf sur le dimère TFR2 pourrait

inhiber son clivage par des protéases. Ce clivage génère une forme « soluble » de TFR2 qui est relarguée dans le sérum²¹⁹. De plus, il a été montré que TFR2 était localisé au niveau des microdomaines cavéolaires et dans les radeaux lipidiques, dont le rôle est de recruter les récepteurs pour qu'ils soient activés par leur ligand²²⁰. TFR2 α ne reste pas exprimé longtemps à la surface avant d'être recyclé ; cependant la fixation de l'Holo-Tf le stabilise à la surface, et augmente sa demi-vie, lui permettant ainsi de transmettre un signal en aval^{204,146,219,221,222}. Il est de plus recyclé^{146,223}. Au contraire, une faible saturation en transferrine (*i.e.* : une concentration faible d'Holo-Tf circulante) aboutit à l'endocytose clathrine-dépendante de TFR2²²³ qui se solde par sa dégradation par le lysosome²²⁴. Finalement, il a été montré que Tfr2 α interagissait avec la tétraspanine hépatique **CD81** (Cluster de différenciation 81), qui pouvait induire sa dégradation²²⁴.

2. La signalisation de TFR2 et ses partenaires

A. Les protéines s'associant à TFR2

Si la signalisation en aval de TFR2 reste inconnue, plusieurs de ses partenaires protéiques ont été identifiés. Le plus notable d'entre eux est le récepteur à l'érythropoïétine (**EPOR**). Notre équipe a montré que dans les érythroblastes humains, EPOR et TFR2 forment un complexe protéique, et cette association se fait dès le réticulum endoplasmique¹⁶⁷. Dans les souris *Tfr2*^{-/-}, les CFU-E ont une sensibilité diminuée à l'EPO qui s'explique par la présence diminuée d'EPOR en surface. TFR2 faciliterait le transport d'EPOR à la surface, et donc la maturation des érythroblastes¹⁶⁷. Plus récemment, la protéine plateforme SCRIBBLE, fortement exprimée dans les progéniteurs érythroïdes, a été identifiée comme partenaire d'EPOR et de TFR2²²⁵. Le knockdown de *SCRIB* (encodant SCRIBBLE) induit un phénotype similaire à celui observé lors d'une déprivation en fer, et le nombre de colonies érythroïdes dépendantes d'EPO est diminué en méthyl-cellulose (cf. [I.2.B.a. L'érythropoïèse précoce](#)), tandis que le knockdown de *TFR2* mène à une augmentation d'expression de SCRIBBLE. L'expression de SCRIBBLE en surface est régulée par le fer, et cette régulation est TFR2-dépendante²²⁵. Les auteurs émettent l'hypothèse que SCRIBBLE faciliterait l'expression en surface d'EPOR, mais qu'en condition de carence martiale, TFR2 serait déstabilisé et dégradé par le lysosome, entraînant la dégradation de SCRIBBLE – ce qui mènerait à une expression diminuée d'EPOR²²⁵. Que ce soit EPOR ou SCRIBBLE, on notera que ni l'un ni l'autre ne semble responsable de la transduction du signal en aval de TFR2. Finalement, Khalil et collaborateurs ont pu mettre en évidence une association entre RAB7

(marqueur lysosomal), la Mitofusine-2 (**MFN-2**, impliquée dans les fusions entre le lysosome et les autophagosomes²²⁶) et TFR2, suggérant un rôle lysosomal de TFR2 qui sera plus discuté ci-après ([III.3. Le trafic intracellulaire de TFR2](#))²²⁷.

B. Voies de signalisation en aval de TFR2

Plusieurs voies de signalisation en aval de TFR2 ont été proposées par observation de modèles murins, les principales étant SMAD1/5/8 et p38/ERK. Poli et collaborateurs ainsi que Wallace et collaborateurs observent que la phosphorylation basale de Erk1/2 semble diminuée en absence de *Tfr2*¹⁵⁵, ce qui est d'autant plus vrai dans leur modèle doublement invalidé *Tfr2*^{-/-} *Hfe*^{-/-}¹⁵⁴. Poli et collaborateurs observent également cette diminution dans un modèle d'HepG2 (lignée humaine d'hépatocarcinome) où l'expression de *TFR2* a été réprimée par **siRNA** (*small interfering RNA*)¹⁵⁵. Calzolari et collaborateurs observent la phosphorylation de ERK1/2 dans les K562 (lignée érythroleucémique humaine) en utilisant un anticorps spécifique de TFR2 mimant la fixation de l'Holo-Tf, et impliquent la MAP kinase p38²²⁸. Quelques années plus tard, ils montrent également que ERK1/2 est phosphorylé en réponse à l'Holo-Tf dans des lignées de glioblastomes exprimant TFR2²²⁹. Rauner et collaborateurs observent également une phosphorylation de Erk1/2 et de p38 diminuée dans les ostéoblastes cultivés *ex vivo* de leur modèle *Tfr2*^{-/-}, ainsi qu'une diminution de la phosphorylation de Smad1/5/8²³⁰. Poli et collaborateurs ont également observé dans leur modèle HepG2 *TFR2*^{Knockdown} que la phosphorylation de SMAD1/5/8 est diminuée, ainsi que l'expression de la FURINE (protéase qui a été impliquée dans le clivage de HJV)¹⁵⁵. Ils n'observent cependant pas cette diminution de phosphorylation de Smad1/5/8 dans leur modèle murin, et Wallace et collaborateurs ne l'observent également pas dans le leur¹⁵⁴. Latour et collaborateurs, quant à eux, rapportent une légère diminution de pSMAD1/5/8 dans leur modèle *Tfr2*^{-/-} *Bmp6*^{-/-} comparé à leur modèle *Bmp6*^{-/-}²³¹. La signalisation en aval de TFR2 reste floue, du fait des observations contradictoires mais aussi car l'identification de ces voies s'est faite de façon indirecte. De plus, la plupart de ces observations a été faite dans les hépatocytes – la signalisation transduite par le TFR2 dans les autres tissus n'a que très peu été étudiée.

3. Le trafic intracellulaire de TFR2

Dans la littérature, le rôle de TFR2 comme importateur de fer dans la cellule est toujours débattu. Si des expériences *in vitro* montraient que TFR2 pouvait importer du fer dans la cellule

lors de sa découverte¹⁹⁸, la présence de Tfr2 ne suffit pas à pallier le manque de fer dans les modèles murins *Tfr1*^{-/-} qui meurent *in utero*²³². Néanmoins, il a été suggéré que TFR2 soit ciblé aux corps multi-vésiculaires²³³ (endosomes tardifs adressés au lysosome) et que la présence d'Holo-Tf contrôlerait sa dégradation/recyclage dans les HepG2¹⁴⁶. Ses caractéristiques sont de premier abord plus cohérentes avec un senseur (affinité pour l'Holo-Tf faible, stabilisation par celle-ci à la surface). Cependant, Khalil et collaborateurs ont décrit une organisation structurale de lysosomes et de mitochondries dans les progéniteurs érythroïdes, et montrent que dans les progéniteurs érythroïdes humains, une grande partie de la transferrine est acheminée aux lysosomes plutôt qu'à l'endosome²²⁷. Ils ont pu observer que les mitochondries sont plus petites dans les K562 où l'expression de *TFR2* est diminuée par shRNA, ainsi que dans les cellules de moelle osseuse de souris *Tfr2*^{-/-}. En diminuant l'expression de *TFR2* dans les cellules érythroïdes primaires humaines par shRNA, ils observent que la transferrine n'est plus acheminée aux lysosomes – et donc que TFR2 serait nécessaire à cet import particulier de transferrine. Cette voie d'import de fer semble importante pour les cellules érythroïdes puisque le *knockout* (**KO**, c'est-à-dire l'inactivation du gène) de *Mcoln1*, encodant la **Mucolipin-1** qui régule l'efflux de fer du lysosome, entraîne une diminution du nombre de globules rouges générés ainsi qu'un niveau d'hémoglobine diminué. La MFN-2, qu'ils ont montrée comme partenaire de TFR2, semble impliquée dans l'établissement de contacts dans la structure mitochondries-lysosomes puisqu'en diminuant l'expression de *MFN2* par shRNA dans les érythroblastes humains primaires, ou dans les K562 et HUDEP-2 (lignée humaine érythroïde), Khalil et collaborateurs ont pu observer une synthèse d'hème diminuée. Il est intéressant que MFN-2 soit un partenaire de TFR2 et établisse les contacts lysosomaux-mitochondriaux, puisqu'un signal d'adressage à la mitochondrie a été identifié dans TFR2 et Mastroberardino et collaborateurs ont pu mettre en évidence un import TFR2-dépendant de transferrine à la mitochondrie dans les neurones dopaminergiques²¹⁵. À ce jour, ce type d'import par TFR2 n'a pas été décrit dans les hépatocytes primaires.

4. Le rôle tissu-spécifique de TFR2

A. Le rôle hépatique de TFR2

Du fait de son rôle central dans l'hémochromatose héréditaire de type 3 (**HH3**), le rôle hépatique de TFR2 α (ci-après « TFR2 ») est celui qui a été le plus exploré. Du fait que son affinité pour l'Holo-Tf soit plus faible que celle de TFR1, dont le rôle est d'importer le fer dans la cellule¹⁴⁵,

et que la fixation de son ligand le stabilise à la surface²²³, le rôle de « senseur du fer » de TFR2 dans les hépatocytes s'est imposé comme une évidence. En effet, alors que TFR1 est rapidement recyclé, internalisant l'Holo-Tf avec lui favorisant une baisse de son expression via le système IRE/IRP, TFR2 va au contraire être dans des conditions favorables pour activer une signalisation en aval.

Comme expliqué précédemment ([II.3.B.a.ii. Induction par TFR2](#)), il a été suggéré l'existence d'un « ménage à trois » entre TFR1, TFR2 et HFE^{149,150}. Ainsi, en cas de faible saturation en transferrine, HFE pourrait s'associer avec TFR1, tandis que l'augmentation de la saturation en transferrine provoquerait le déplacement de cette association. HFE serait alors libre de s'associer à TFR2, et de signaler en aval, menant à une expression accrue d'hepcidine, et *in fine* au rétablissement de la balance.

De nombreux modèles murins ont été développés, dont des modèles dans lesquels *Tfr2* a été invalidé spécifiquement dans le foie^{234,235}, ainsi que des modèles où *Tfr2* et *Hfe* ont tous les deux été invalidés^{153,154}. Les mutations du *Tfr2* hépatique entraînent une surcharge en fer systémique, se traduisant par une teneur en fer hépatique élevée. Ces dépôts de fer sont périportaux, ce qui est typique de la pathologie. Dans tous les cas, une expression anormale de l'hepcidine est observée, menant à une surcharge en fer hépatique plus ou moins sévère selon les modèles²³⁶. Les modèles doublement invalidés *Tfr2/Hfe* présentaient des symptômes plus sévères que les modèle où seul *Tfr2* était invalidé. Cependant, la simple invalidation de *Tfr2* menait à des symptômes plus sévères que la simple invalidation de *Hfe*¹⁵⁴. Dans la double invalidation *Tfr2/Hjv*, on observe un niveau d'hepcidine similaire à ce que l'on observe dans les modèle où *Hjv* est invalidé²³¹. Cela sous-entend que l'implication de HJV dans la régulation du fer se fait en aval de celle de TFR2 dans le foie. De plus, la transcription du gène *Hamp* était plus réprimée chez les souris doublement invalidées *Tfr2/Bmp6*, doublement invalidées *Hfe/Bmp6*, ou triplement invalidées *Tfr2/Bmp6/Hfe* que dans les souris où seule l'expression de *Bmp6* était invalidée²³¹. Ces résultats placent l'influence de TFR2 et d'HFE sur la régulation de *HAMP* en aval de celle de BMP6, mais en amont de celle de HJV.

B. Le rôle extra-hépatique de TFR2

Bien que TFR2 soit surtout exprimé dans les hépatocytes et dans les érythroblastes, il est également exprimé en moindre mesure dans d'autres tissus. Son potentiel rôle dans ces tissus sera esquissé ci-après ; son rôle dans les érythroblastes sera discuté en détail dans la partie suivante.

a. Le rôle de TFR2 dans l'os

Les os sont particulièrement sensibles aux variations de concentration en fer sérique. En effet, la densité minérale des os est corrélée négativement avec la concentration systémique en fer et une surcharge martiale aggrave la perte osseuse observée suite à une ovariectomie²³⁷. De plus, comme expliqué précédemment ([II.5. Les déséquilibres du métabolisme du fer](#)), un des symptômes de l'hémochromatose héréditaire est l'ostéoporose^{238,239}.

En 2019, Rauner et collaborateurs ont exploré les effets du fer sur la formation des os en se basant sur des modèles murins *Tfr2* KO²³⁰. Ils ont ainsi pu montrer tout d'abord que *Tfr2α* (et en moindre mesure *Tfr2β*) était exprimé dans l'os cortical du fémur et dans les vertèbres par les ostéoclastes, les ostéoblastes et les ostéocytes. Ils montrent de plus que *Tfr2* est principalement exprimé en surface pendant la différenciation des ostéoclastes et ostéoblastes, et que cette expression est maximale dans les ostéoclastes matures et dans les ostéoblastes immatures.

Les souris *Tfr2* KO ont une masse osseuse augmentée, qui peut être attribuée à une formation osseuse exacerbée, et non à une résorption osseuse amoindrie puisque les souris femelles sont toujours soumises à des pertes osseuses après ovariectomie. Un régime pauvre en fer et l'injection du chélateur de fer Déféroxamine (**DFO**) ne corrigent pas le phénotype observé chez les souris *Tfr2* KO. De plus, la comparaison d'un modèle murin KO pour *Tfr2β* et d'un modèle KO pour *Tfr2β* constitutif et *Tfr2α* KO spécifiquement dans le foie (induisant une surcharge martiale) ne met pas en évidence de différence dans le volume osseux de ces souris. La surcharge martiale hépatique ne semble donc pas affecter la masse osseuse. Finalement, le KO *Tfr2* spécifiquement dans les progéniteurs ostéoblastiques suffit à entraîner une augmentation de la masse osseuse. La formation osseuse est également augmentée dans un KO spécifique des précurseurs ostéoblastiques.

En réalisant un RNAseq d'ostéoblastes de souris WT versus *Tfr2* KO, Rauner et collaborateurs mettent également en évidence une répression des gènes impliqués dans l'ossification ainsi que des

voies de signalisation Wnt et Smad. Il a été suggéré précédemment que la voie de signalisation Bmp/Smad régulerait l'expression d'inhibiteurs de la signalisation Wnt. De plus, ils observent une phosphorylation diminuée de Smad6, Erk et de p38. La surexpression de *Mapk14* (codant p38) suffit à corriger la masse osseuse dans un contexte *Tfr2* KO, argument supplémentaire en faveur d'une signalisation en aval de TFR2 passant par p38 et Erk.

Finalement, les auteurs démontrent que Bmp2 se fixe sur Tfr2. De ce fait, Tfr2 pourrait agir comme une protéine appât empêchant Bmp2 de se fixer sur son récepteur et ainsi inhiber l'ossification.

b. Le rôle de TFR2 dans le cœur

Le cœur est un site majeur de la consommation en oxygène. Bien que les cardiomyocytes ne semblent pas jouer un rôle dans le contrôle de l'homéostasie du fer, leur expression de Hcp et de Fpn est élevée – ce qui leur permet de contrôler leur pool intracellulaire en fer et ainsi d'assurer leur fonction²⁴⁰.

Il a été montré que Tfr2 β est particulièrement transcrite dans le cœur¹⁹⁸. Boero et collaborateurs ont montré en 2015 que la transcription de Tfr2 β augmente après une blessure par ischémie/reperfusion (interruption de l'afflux sanguin au tissu myocardique puis ré-oxygénation subite pouvant entraîner des dommages cellulaires par nécrose et/ou ferroptose, et infarctus du myocarde)^{90,213}. La comparaison de modèles dans lesquels la forme Tfr2 β est invalidée avec des modèles *wild-type* (WT) montre une tolérance accrue des blessures par ischémie chez les souris invalidées par rapport aux souris WT. Cette invalidation mène également à une augmentation d'expression du facteur HIF2 α , de l'hème oxygénase 1 (**HO-1**), ainsi que de la catalase. De plus, des voies impliquées dans la survie des cardiomyocytes semblent être activées. Finalement, une diminution de la transcription de *Slc40a1* (encodant Fpn) est observée – ce qui pourrait entraîner la séquestration du fer dans les cellules réticuloendothéliales cardiaques. Cela pourrait déclencher l'activation des voies cardio-protectrices, ainsi que l'activation des enzymes de gestion du stress oxydant, protégeant ainsi les cardiomyocytes de dommages supplémentaires.

c. Le rôle de TFR2 dans le cerveau

Les différents types cellulaires du cerveau accumulent le fer sous forme de ferritine de façon différentielle avec l'âge²⁴¹. La surcharge martiale favorise l'apparition de pathologies telles que la

maladie de Parkinson ou d'Alzheimer (explorées un peu plus ci-après dans la partie [III.5.C. Alzheimer et Parkinson](#)). Au contraire, un manque de fer va affecter le développement neuronal²⁴².

Des transcrits de *TFR2* ont été identifiés dans le cérébellum^{209,210}, le cortex, l'hippocampe et le striatum²⁰⁹. La protéine a été retrouvée dans les lignées immortalisées de glioblastomes, dans les échantillons de patients atteints de glioblastomes²²⁹, dans un lysat total de cerveau de souris²⁰⁹, ainsi que dans les neurones dopaminergiques chez le rat et chez l'Homme²¹⁵.

Pellegrino et collaborateurs ont pu observer que les neurones du circuit limbique des mutants *Tfr2*^{-/-} sont suractivés par rapport à ceux des souris WT²⁰⁹. De plus, les auteurs notent que les souris mutantes semblent présenter un comportement anxieux (lors de tests en labyrinthe de Morris et d'*Elevated plus maze test*). La sur-activation et les comportements anxieux ne sont pas observés lorsque les souris sont soumises à un régime appauvri en fer. Ils notent de plus une apoptose accrue des microglies, et une surcharge martiale plus accrue dans le cerveau des mutants. TFR2 jouerait donc un rôle de régulateur de l'homéostasie du fer au sein du cerveau.

d. Le rôle de TFR2 dans les macrophages

Les macrophages sont particulièrement impliqués la gestion du métabolisme du fer – que ce soit parce qu'ils sont un second tissu de réserve (derrière les hépatocytes) ou parce qu'ils sont responsables de l'érythrophagocytose (macrophage du système réticulo-endothélial de la rate et du foie). Rishi et collaborateurs, en réalisant un mutant *Tfr2*^{-/-} spécifiquement dans les macrophages, observent une expression de Fpn diminuée dans les macrophages péritonéaux en absence de Tfr2²⁰⁷, ce qui sous-entendrait une rétention du fer dans ces cellules. Cependant, les auteurs ne notent pas de niveau de fer intracellulaire augmenté, et ce *knockout* macrophage-spécifique ne semble pas affecter l'homéostasie du fer au niveau systémique, montrant que le Tfr2 des macrophages n'est pas requis pour sa régulation. Son rôle exact reste donc à déterminer.

C. Le rôle érythroïde de TFR2

TFR2 est exprimé par les érythroblastes au cours de la différenciation érythroïde humaine^{30,167,206} et murine (Gautier, Leduc, et al., soumis). Le locus de *TFR2* a été associé aux caractéristiques des globules rouges dans plusieurs *Genome Wide Association Studies*^{243–245}.

Les travaux de notre équipe en 2010 mettent en évidence un nombre réduit de colonies CFU-E provenant de souris *Tfr2*^{-/-} par rapport à des souris WT¹⁶⁷. Lee et collaborateurs avaient observé en 2012 que leur mutant *Tfr2*^{-/-}*Tmprss6*^{-/-} avaient une érythropoïèse et un nombre de réticulocytes plus accrus que leur mutant *Tmprss6*^{-/-} (qui induit une sévère anémie, mimant le phénotype d'IRIDA)²⁴⁶. En 2014, Nai et collaborateurs observèrent dans leur double *knockout* *Tfr2*^{-/-}*Tmprss6*^{-/-} un nombre de réticulocytes augmenté, ainsi qu'une quantité d'hémoglobine plus élevée comparé à leur modèle *Tmprss6*^{-/-} également muté *Tfr2* mais de façon foie-spécifique²³⁵, ce qui laissait présager un rôle extra-hépatique de *Tfr2*. En 2015, Wallace et collaborateurs observent au contraire une différenciation érythroïde ralentie chez les mutants *Tfr2*^{-/-}*Tmprss6*^{-/-} comparés aux simples mutants *Tmprss6*^{-/-}²⁴⁷.

Pour mettre en évidence un potentiel rôle du TFR2 érythroïde, Nai et collaborateurs réalisèrent en 2015 un mutant invalidé pour *Tfr2* spécifiquement dans la moelle osseuse par transplantation de moelle osseuse de souris *Tfr2*^{-/-} dans des souris WT. Ils observent un nombre de globules rouges et un niveau d'hémoglobine augmentés lorsque ces souris sont soumises à un régime appauvri en fer²⁴⁸, suggérant un rôle du TFR2 érythroïde. En 2016, Rishi et collaborateurs réalisent également un *knockout* moelle-osseuse spécifique reposant cette fois sur la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur de *Vav1* ; ce qui permet l'invalidation du *Tfr2* floxé dans tous les types cellulaires hématopoïétiques²⁴⁹. Contrairement à Nai et collaborateurs, Rishi et collaborateurs observent alors un délai dans la différenciation érythroïde²⁵⁰.

Les différences observées (production de globules rouges et d'hémoglobine accrue *versus* un délai d'érythropoïèse) peuvent s'expliquer par le fond génétique des souris utilisées dans les différentes études (AKRB6, 129SvJ, C57BL/6, ...), leur âge, leur sexe, et surtout par leur régime alimentaire (appauvri, normal ou enrichi en fer) et pendant combien de temps elles ont été soumises à ce régime (depuis la naissance et constamment, ou imposé pendant quelques semaines). De plus, pour ce qui est des modèles moelle-osseuse spécifiques, les observations contradictoires pourraient s'expliquer par le fait que l'intégralité de la niche hématopoïétique est *Tfr2*^{-/-} dans le modèle de transplantation, alors que dans le second modèle, seules les cellules érythroïdes sont mutées.

Dans tous les modèles cités, l'érythropoïèse est affectée, et les modèles moelle osseuse-spécifiques impliquent directement le TFR2 érythroïde dans ce phénotype. Finalement, le knockdown de *TFR2* par shRNA dans les érythroblastes humains primaires provoque un important délai de

différenciation, voire une dys-érythropoïèse (c'est-à-dire, un défaut de maturation des érythroblastes)¹⁶⁷.

Le fait que TFR2 facilite le transport à la surface d'EPOR, récepteur au principal régulateur de l'érythropoïèse, souligne le rôle important du TFR2 érythroïde dans l'érythropoïèse. Les travaux de Khalil et collaborateurs l'impliquent dans une potentielle seconde voie d'import de fer dans la cellule érythroïde (se référer à la partie [III.3. Le trafic intracellulaire de TFR2](#)). Finalement, un rôle de senseur de fer du TFR2 érythroïde n'est pas écarté, car il est également stabilisé à la surface par l'holo-transferrine plutôt qu'immédiatement internalisé, et la production de GDF15, potentiel régulateur érythroïde de l'homéostasie du fer, est sous le contrôle de TFR2 (pour rappel sur les régulateurs érythroïdes du métabolisme du fer, se référer à la partie [II.3.B.c. La régulation de l'hepcidine par les régulateurs érythroïdes](#)).

5. TFR2 & pathologies

A. L'hémochromatose héréditaire de type 3 - Implication différentielle des deux variants de TFR2

Si l'implication de mutations de *TFR2* dans l'hémochromatose de type 3 est connue depuis une vingtaine d'années¹⁹⁶, le rôle de chacun des variants dans la pathologie est un peu plus flou. La première mutation décrite, Y250X, générant un codon stop prématuré dans la phase codante, affecte les deux variants puisqu'elle se situe dans l'exon 6 (**figure 17**). Il en est de même pour de nombreuses mutations, telle que R678P qui affecte le motif RGD et donc la fixation de la transferrine sur TFR2²⁵¹.

Afin de mimer la pathologie humaine, un modèle murin contenant la mutation de *Tfr2* Y245X (équivalente à la mutation humaine Y250X) a été généré^{195,252}. Cette mutation a pour conséquence l'introduction d'un codon stop prématuré. On observe alors les mêmes symptômes que chez les patients atteints de HH3, c'est-à-dire une surcharge en fer apparaissant très tôt. La teneur en fer hépatique est très élevée chez les homozygotes, même chez les jeunes souriceaux exposés à un régime alimentaire normal.

La mutation M172K affecte le codon d'initiation de la traduction de la forme β , mais résulte également en la modification de la méthionine 172 qui est conservée chez la souris^{253,254}. Il a été décrit que la forme mutée du variant α était séquestrée dans le réticulum endoplasmique, et n'était

donc pas exprimée à la membrane – cependant, sa mutation équivalente chez la souris suggère qu'elle est fonctionnelle²³⁴. Les symptômes observés chez ces patients sont similaires à ceux que l'on observe avec les autres mutations – *i.e.* cirrhose hépatique, hypogonadisme, cardiomyopathie et arthrite à un âge médian de diagnostic usuel pour une hémochromatose héréditaire de type 3. Un modèle murin *Tfr2*^{-/-} et *knock-in* (**KI**) pour la mutation M167K (équivalent à la mutation humaine M172K) a été généré. Dans ce modèle, seule la forme mutée de *Tfr2* α est exprimée. Ce modèle se caractérise par une saturation de la transferrine et une teneur martiale hépatique normale. Le KO de *Tfr2* dans le foie de ces souris KI entraîne l'apparition des symptômes de l'hémochromatose, démontrant que le rôle hépatique de TFR2 est au centre de la pathologie. Ces souris accumulent également du fer dans leur rate, suite à une réduction de l'expression de l'exportateur *Fpn* par les macrophages de la rate.²³⁴

Finalement, l'étude des familles de patients portant la mutation E60X, qui affecte spécifiquement le variant α ²⁵⁴, montre que la pénétrance de cette mutation n'est pas complète. Les symptômes observés, lorsqu'ils sont présents, sont cependant similaires à ceux observés avec les autres mutations. Ainsi on peut supposer que la forme β pourrait alléger le fardeau des symptômes.

B. Cancer

L'expression de TFR2 a été retrouvée dans certaines tumeurs, dont les glioblastomes, les leucémies, les hépato-carcinomes et les cancers du côlon, ainsi que dans de nombreuses lignées immortalisées dont les lignées érythroïdes^{206,212,229,255–257}. Une forte expression de TFR2 semble être un bon pronostic dans les syndromes myélodysplasiques²⁵⁸ et dans les leucémies aigües myéloïdes²⁵⁹.

Calzolari et collaborateurs ont pu montrer en 2010 que l'expression de TFR2 était exprimée par une sous-population de glioblastomes ayant une propriété initiatrice. Ces cellules sont plus sensibles au témozolomide, et bien que cette sensibilité semble être indépendante de TFR2, celui-ci peut être utilisé comme marqueur de cette sous-population²²⁹.

C. β -Thalassémie

Comme mentionné précédemment, Nai et collaborateurs ont observé dans leurs modèles murins invalidé pour *Tfr2* spécifiquement dans la moelle osseuse un nombre de globules rouges accru²⁴⁸. L'érythropoïèse inefficace observée chez les patients atteints de β -thalassémie, et

l'hémolyse accrue des globules rouges matures mènent à un relativement faible nombre de globules rouges viables en circulation, provoquant une anémie (pour rappel, cf. [II.5. Les déséquilibre du métabolisme du fer](#)). Le groupe d'Antonella Nai a souhaité explorer la possibilité de contre-balancer l'anémie causée par une β -thalassémie en invalidant Tfr2.

En transplantant la moelle osseuse de souris thalassémiques ($Hbb^{Th3/+}$) invalidées pour *Tfr2* à des souris thalassémiques, les auteurs ont pu observer à court-terme une quantité d'hémoglobine et un nombre de globules rouges augmentés, en particulier avec un régime pauvre en fer²⁶⁰. Ils observent de plus une quantité diminuée d'Epo, ce qui est cohérent avec l'amélioration des paramètres hématologiques, et une faible diminution de la transcription des gènes cibles de la signalisation Epo/Epor, dont *Erfe*. Selon l'hypothèse des auteurs, l'invalidation de Tfr2 augmente la sensibilité des érythroblastes à l'Epo, expliquant la production augmentée de globules rouges. Les auteurs observent également que la quantité de fer accumulé avec l'âge dans le foie, la rate, et les reins des souris thalassémiques est amoindrie dans le modèle de souris thalassémique avec une invalidation de *Tfr2* dans la moelle osseuse, ce qui pourrait en partie être expliqué par la sécrétion diminuée d'Erfe qui est responsable de l'inhibition de la production d'hepcidine¹⁸⁶.

Les auteurs évoquent la possibilité de développer des stratégies ciblant uniquement le TFR2 érythroïde afin d'améliorer l'anémie chez les patients β -thalassémiques sans aggraver la surcharge martiale qui surviendrait avec l'inhibition complète de TFR2. D'autres stratégies ciblant l'hepcidine, la transferrine, TMPRSS6, ou des la voie du TGF- β sont également prometteuses (cf. partie [II. Le métabolisme du fer](#) pour rappel sur l'implication de ces différents acteurs). Notamment, un nouvel inhibiteur de la FPN, le VIT-2763, est actuellement en essai clinique de phase 1²⁶¹. La seule stratégie curative à ce jour étant la transplantation de moelle osseuse, la possibilité de pouvoir combiner ces différentes stratégies palliatives est intéressante. Il est cependant à noter que la seule étude réalisée à ce jour sur TFR2 dans les érythroblastes humains réalisée par mon équipe montre un retard de différenciation ainsi qu'une sensibilité diminuée à l'Epo en absence de Tfr2¹⁶⁷, et non une production exacerbée de globules rouges. C'est également le cas dans d'autres modèles murins^{247,250}, ce qui sous-entend que ce n'est pas une différence humain/souris. L'utilisation de la stratégie du groupe d'Antonella Nai étant dépendante d'un rôle du TFR2 érythroïde comme inhibiteur de la différenciation, elle n'est peut-être pas la plus judicieuse tant que le fonctionnement du TFR2 érythroïde n'a pas été mieux caractérisé.

D. Alzheimer et Parkinson

Comme mentionné précédemment ([III.4.B.c. Le rôle de TFR2 dans le cerveau](#)), l'accumulation de fer dans les neurones est à l'origine de dysfonctionnement de ceux-ci, comme c'est le cas dans la maladie d'Alzheimer. En 2014, Crespo *et al.* ont réalisé une analyse génétique sur 116 patients atteints de la maladie d'Alzheimer versus 98 patients sains, en se basant sur des *single nucleotide polymorphisms* (**SNP** ; polymorphisme d'un seul nucléotide) de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme du fer²⁶². Ils ont pu mettre en évidence une association positive entre le SNP rs7385804 présent dans le gène *TFR2* et la pathologie. Ils observent, de plus, une diminution de la transcription de *TFR2* chez les patients atteints d'Alzheimer comparés aux patients sains.

Chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, le fer s'accumule dans les neurones de la *substantia nigra* (substance noire). Une analyse groupée des gènes du métabolisme du fer chez les patients atteints de la maladie de Parkinson *versus* chez des patients sains révèle une association de la pathologie avec la transferrine et avec *TFR2*²⁶³. Mastroberardino et collaborateurs ont pu mettre en évidence une voie d'importation de fer dans la mitochondrie dépendant du *TFR2* dans les neurones dopaminergiques de rat (pour rappel, se référer à la partie [III.3. Le trafic intracellulaire de TFR2](#)). Dans leur modèle de Parkinson, ils observent une accumulation de fer dans la mitochondrie de ces neurones dopaminergiques²¹⁵. Cette voie serait donc perturbée chez les patients atteints de la maladie de Parkinson.

Il n'est cependant pas établi si le fer dans ces pathologies est un facteur favorisant leur initiation ou leur progression.

E. Ossification hétérotopique

En démontrant l'implication de *Tfr2* dans la différenciation ostéoblastique et ostéoclastique en 2019, Rauner et collaborateurs ont également exploré le rôle de *Tfr2* dans la fibrodysplasie ossifiante progressive (**FOP**), pathologie caractérisée par une ossification hétérotopique excessive. En effet, leurs données suggèrent que *Bmp2* se lie à *Tfr2*. *BMP2* est suggéré comme impliqué dans la FOP²⁶⁴, et l'utilisation d'un inhibiteur de la signalisation de BMP (le palovarotène) est testé en clinique. L'injection de *Bmp2* entraîne une ossification hétérotopique dans les muscles de souris WT. En injectant un peptide contenant le domaine extracellulaire de *Tfr2* en même temps que

Bmp2 chez les souris WT, Rauner et al. ont pu montrer que Bmp2 ne pouvait alors pas provoquer d'ossification hétérotopique, et donc que Tfr2 fonctionne comme protéine appât²³⁰. Ils montrent de plus que l'utilisation de leur peptide est aussi efficace que le palovarotène dans le traitement de l'ossification hétérotopique, sans effets secondaires observés. L'utilisation de leur peptide dans un contexte d'ossification hétérotopique induite par trauma donne également des résultats similaires au palovarotène. Cela fait de l'utilisation de peptides du domaine extracellulaire de TFR2 une potentielle stratégie thérapeutique dans les pathologies provoquant une ossification excessive.

IV. Objectifs généraux de la thèse

Le rôle de TFR2 est discuté dans la littérature. Le premier point de discordance porte sur l'effet de TFR2 sur l'érythropoïèse. Comme mentionné dans l'introduction, selon les modèles murins utilisés^{247,248,250}, Tfr2 semble favoriser ou réprimer l'érythropoïèse. Chez l'Homme, seuls les travaux de notre équipe ont étudié le rôle de TFR2, et il est nécessaire à une érythropoïèse efficace¹⁶⁷. Cet effet de TFR2 pourrait partiellement s'expliquer par son rôle en tant que protéine escorte d'EPOR, dont l'expression en surface favorise la survie des érythroblastes en présence d'EPO. Le second point de discordance porte sur son statut de récepteur ou d'importateur. Comme nous l'avons vu précédemment, Khalil et collaborateurs ont décrit un système d'import de fer reposant exclusivement sur TFR2 dans les cellules érythroïdes²²⁷. Cependant, certaines caractéristiques de TFR2 le dépeignent comme un senseur de fer, suggérant que son rôle ne se cantonne pas à l'import de fer dans la cellule. Nous avons souhaité mettre en évidence l'existence d'une signalisation en aval du TFR2 érythroïde.

Notre équipe a pu observer qu'avec le knockdown de *TFR2* dans les érythroblastes humains primaires, l'expression de GDF15 est fortement diminuée¹⁶⁷. GDF15 étant un régulateur érythroïde du métabolisme du fer, et TFR2 pouvant potentialiser la survie des érythroblastes *via* le transport d'EPOR, nous avons émis l'**hypothèse que le TFR2 érythroïde agirait comme un senseur de fer capable d'adapter le taux d'érythropoïèse à la concentration en fer disponible**. Ce rôle de senseur reposant sûrement sur la transduction d'un signal *via* une interaction protéine-protéine, nous avons tenté :

- 1) de **caractériser ses potentiels partenaires protéiques** pouvant participer à cette signalisation.
- 2) d'**identifier les gènes cibles de TFR2 dans les cellules érythroïdes**.

V. Résultats

1. Modèles cellulaires

A. Les érythroblastes humains primaires

Afin de se rapprocher au plus des conditions physiologiques, mes travaux de thèse ont majoritairement été réalisés à partir de cellules primaires humaines infectées par des vecteurs lentiviraux codant des shRNA. Mon laboratoire d'accueil a pu développer un protocole de culture *in vitro* des érythroblastes humains primaires isolés à partir de cytophéréèses.

La cytophérése consiste à augmenter le nombre de cellules souches circulantes en prodiguant plusieurs injections de *Granulocyte Colony-Stimulating Factor* (G-CSF) au donneur. Si l'action exacte du G-CSF sur la niche hématopoïétique n'est pas encore totalement comprise², ces injections vont entraîner la sortie des HSCs dans le sang qui est alors dit « mobilisé », et peut être utilisé pour des allogreffes. En collaboration avec le service d'hémobiologie de la Pitié Salpêtrière, 1-2mL de sang mobilisé issu de cytophérése de donneurs sains est récupéré. Après élimination des globules rouges par lyse hypotonique, les progéniteurs sont isolés par tri magnétique en utilisant le marqueur CD34 (exprimé des HSCs aux BFU-Es). Ceux-ci sont cultivés 5 jours en présence d'IL-3, d'IL-6 et de SCF, à la suite desquels sont ajoutés de la dexaméthasone et de l'EPO pour amplification des progéniteurs érythroïdes (**figure 18**). La dexaméthasone permet le maintien des progéniteurs érythroïdes à un stade immature de proérythroblastes tout en favorisant leur prolifération. La pureté de la population est déterminée après 2 jours de culture dans ces conditions en utilisant les marqueurs CD36 (exprimé dès le stade CFU-E), et GPA (acquis lors de la transition proérythroblaste – érythroblaste basophile 1). L'infection par vecteurs lentiviraux se fait sur une population dont la CD36-positivité est supérieure à 85% et dont la GPA-positivité est inférieure à 5% (*id est* constituée majoritairement de proérythroblastes). Deux infections sont effectuées avec 6h à 12h d'intervalle, ce qui permet une plus grande efficacité d'infection. La dexaméthasone est maintenue tout du long du processus d'infection, ce qui maintient la culture au stade proérythroblaste. La différenciation est initiée de façon synchrone en contrant l'action de la dexaméthasone avec son antagoniste le RU486. La différenciation terminale est alors suivie tous les deux jours par cytométrie en flux en utilisant les marqueurs de différenciation GPA, Intégrine $\alpha 4$ et bande 3 (I.2.B.b.i. Caractéristiques morphologiques et immunophénotypiques), par coloration

MGG pour analyse de la morphologie cellulaire et identification des stades de différenciation, et par marquage à la benzidine permettant d'évaluer le taux d'hémoglobinisation (**figure 18**).

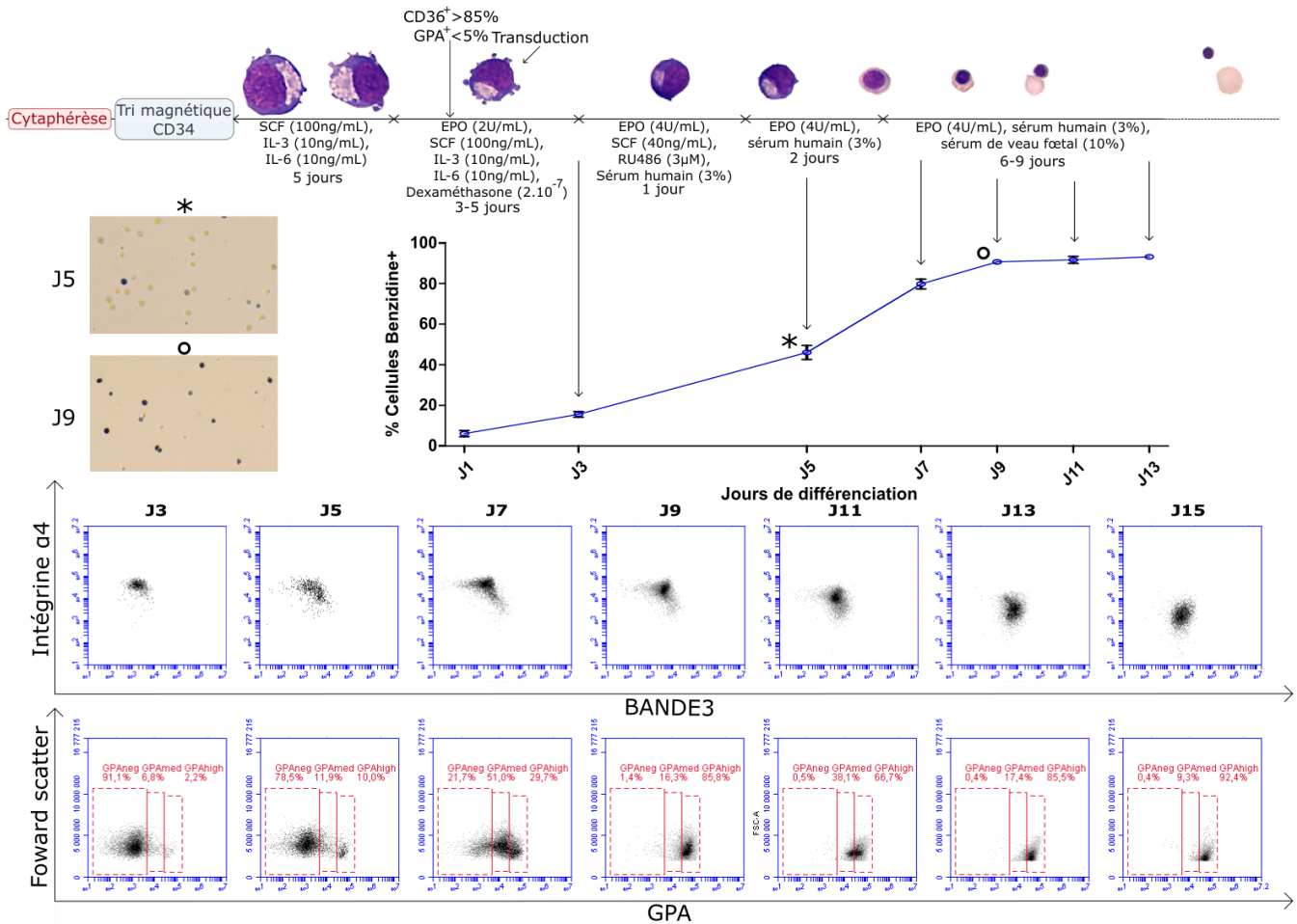


Figure 18 : Culture des érythroblastes humains primaires.

Les progéniteurs érythroïdes obtenus à partir de cytophérèse sont d'abord maintenus à un stade immature avec de la dexaméthasone en présence d'EPO, SCF, IL-3, et IL-6. Après infection par vecteurs lentiviraux, la différenciation terminale est amorcée à l'aide du RU486, antagoniste de la dexaméthasone. Un suivi est effectué tous les deux jours, au cours duquel les cellules sont préparées pour analyse morphologique par coloration MGG (en haut). Au cours de ce suivi, le taux d'hémoglobinisation est mesuré (au milieu à gauche : images représentatives après 5 (*) et 9 (°) jours post-infection respectivement – les cellules bleues étant hémoglobinisées ; au milieu à droite : pourcentage d'hémoglobinisation en fonction du temps de différenciation). Finalement, le stade de différenciation est également établi en se basant sur les marqueurs de surface glycophorine A (GPA), intégrine α4 et bande3 (panels de cytométrie en flux en bas).

B. Les cellules MEDEP

Les cellules MEDEP (pour *Mouse Embryonic stem cell-Derived Erythroid Progenitor*) ont été isolées à partir de cellules souches embryonnaires murines par Hiroyama et collaborateurs en 2008²⁶⁵. Ces cellules sont maintenues à un stade immature avec de la dexaméthasone et du SCF. La présence d'EPO dans le milieu initie la différenciation terminale. L'évolution des marqueurs de surface et l'hémoglobinisation sont similaires à celles observées dans les cellules primaires de souris. Elles sont, de plus, en mesure d'énucléer en culture. Finalement, la comparaison du protéome de ces cellules avec celui des érythroblastes murins primaires réalisée par notre équipe démontre une forte corrélation du contenu protéique des MEDEP avec celui des primaires par stade de différenciation (Gautier EF, Leduc M, et al., soumis). Le suivi de différenciation (cytométrie en flux, marquage benzidine, coloration MGG) est effectué toutes les 12h.

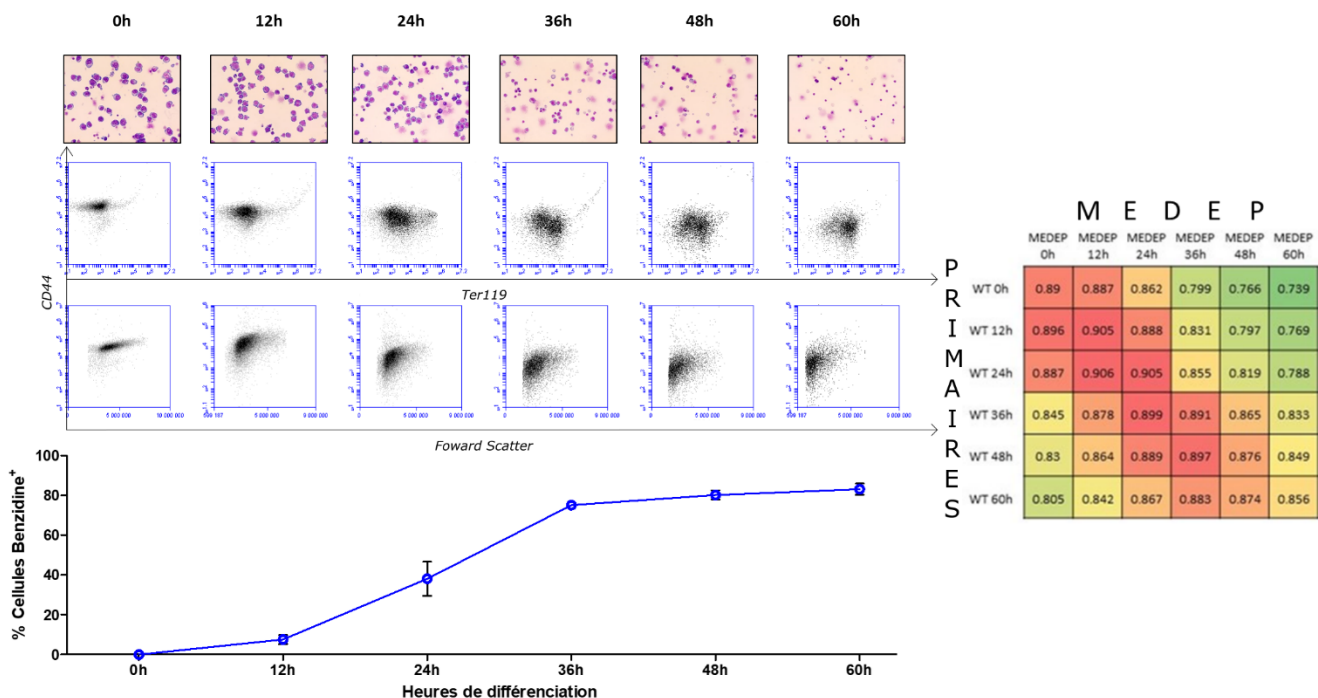


Figure 19 : Différenciation des cellules MEDEP.

Les MEDEP sont en mesure d'énucléer (coloration MGG, haut), tout comme les cellules primaires. L'acquisition du Ter119 et la perte progressive du CD44 permettent de suivre leur différenciation par cytométrie en flux (milieu), comme pour des cellules primaires murines. De même, leur hémoglobinisation se fait dans des temps de différenciation similaires (bas). L'analyse de leur contenu protéique révèle une très forte corrélation avec le contenu protéique des cellules primaires murines (droite), surtout au début de la différenciation terminale [Extrait de Gautier, Leduc, et al., soumis]. Avant induction, les cellules sont équivalentes à des Pro-E. Après 12h de différenciation, la culture est constituée d'un mélange Pro-E/Baso-E ; 24h Baso-E/Poly-E ; 36h Acido-E ; 48h Acido-E/Rétic. ; 60h Rétic.

2. Résultats, première partie : TFR2 forme un complexe avec la Sérine/Thréonine kinase MRCK α

A. Contexte

Afin de caractériser la signalisation en aval de TFR2, nous avons tenté d'identifier ses partenaires. Bien que TFR2 ait été découvert il y a 20 ans, très peu de partenaires lui ont été attribués – les plus notables étant EPOR trouvé en 2010 par notre équipe¹⁶⁷, et SCRIBBLE²²⁵ plus récemment. Pour cela, nous avons eu recours à la spectrométrie de masse après immunoprécipitation de TFR2. Plusieurs analyses en spectrométrie de masse ont été réalisées, et parmi les candidats retrouvés, la Sérine/Thréonine kinase MRCK α était présente dans toutes les analyses. L'expression de cette kinase a été décrite comme régulée par le fer *via* le système IRE/IRP (cf. II.3.A. Mécanismes de régulation au niveau cellulaire), ce qui suggère son implication dans le métabolisme du fer – nous nous sommes donc attelés à confirmer et étudier le rôle de l'interaction entre MRCK α et TFR2, et son implication dans le processus d'érythropoïèse.

B. Article “MRCK α is a new regulator of erythropoiesis”

MRCK α IS A NEW REGULATOR OF ERYTHROPOIESIS

Cyrielle RICHARD⁽¹⁾, Carine LEFEVRE⁽¹⁾, Sophie VIRET⁽¹⁾, Maria-Lilia BRASSART⁽¹⁾, El Hassan FAOUZI⁽¹⁾, Marjorie LEDUC^(1,2), Nabih AZAR⁽³⁾, Catherine LAVAZEC⁽¹⁾, Patrick MAYEUX^(1,2), Frédérique VERDIER⁽¹⁾.

- (1) Institut Cochin, INSERM U1016-CNRS UMR8104-Université Paris Descartes – Labex Gr-EX, PARIS, France
- (2) Proteomic platform of Université Paris-Descartes (3P5), Paris, France.
- (3) Hemobiology unit, Hôpital La Pitié Salpêtrière, PARIS, France

Abstract

The transferrin receptor type 2 (TFR2) is expressed by erythroblasts, and facilitates the export of the erythropoietin receptor (EPOR) to cell surface through their interaction. Previously known as an extracellular iron sensor in hepatocytes, its role during erythropoiesis remains to be clarified and its downstream signaling is still unknown. To define the downstream signaling of TFR2, we aimed at identifying its protein partners.

TFR2 was immuno-precipitated and its prospective partner were identified by mass spectrometry. The Serine/Threonine kinase MRCK α promotes cytoskeletal reorganization and its expression is regulated by the intracellular iron concentration. We show that MRCK α is co-expressed with TFR2

during terminal differentiation, and associates with both EPOR and TFR2. Knockdown of *CDC42BPA* (encoding MRCK α) in human primary erythroblasts leads to a decreased cell surface expression of both transferrin receptor type 1 and TFR2, while increasing cell-surface expression of EPOR. Alongside the affected expression of these major receptors, the terminal differentiation and hemoglobinization are delayed with the knockdown of *CDC42BPA*. MRCK α regulation of terminal differentiation is conserved among species as knockout of *Cdc42bpa* in murine erythroid MEDEP cells also leads to delayed differentiation and impaired hemoglobinization.

Our data show MRCK α regulates erythropoiesis. MRCK α interacts with both TFR2 and EPOR, and controls TFR2, EPOR and TFR1 cell-surface expression. As TFR2 seems to act as an extracellular iron sensor and EPOR regulates erythropoiesis, we suggest the existence of an MRCK α -TFR2-EPOR complex able to adapt the rate of erythropoiesis to available circulating iron quantity.

Introduction

Erythropoiesis is the process of red blood cells (RBCs) production, and is mainly regulated by the kidney-produced cytokine erythropoietin (EPO). EPO and its receptor EPOR are required for survival and proliferation of erythroid progenitors (BFU-Es and CFU-Es) and early erythroblasts, leading to their differentiation into RBCs⁵⁷. EPOR expression level in erythroid cells is low with less than a thousand copies per cell, even in between the colony forming units-erythroid (CFU-E) and polychromatic erythroblast stages when its expression is the highest²⁶⁶.

Previously, we showed EPOR transport at cell surface was facilitated by the transferrin receptor type 2 (TFR2) through their interaction in human erythroblasts¹⁶⁷. Erythroid cells claim around 60% of the iron stored in the body²⁶⁷, though iron-loaded transferrin (holo-transferrin) internalization by the transferrin receptor type 1 (TFR1), homolog of TFR2. *Tfr1* invalidation leads to death *in utero*, indicating that *Tfr2* is not sufficient to take over *Tfr1* function²³². Loss-of-function mutations in *TFR2* leads to hereditary hemochromatosis type 3, a disorder that is characterized by a progressive accumulation of iron in the organs. TFR2 acts as an iron sensor in the hepatocytes, transducing a signal leading to hepcidin production. It also readily responds to iron deprivation in both hepatocytes¹⁴⁶ and erythroblasts by shifting from recycling to lysosomal degradation due to lack of holo-transferrin binding. TFR2 also regulate erythropoiesis, as demonstrated with *TFR2* invalidation in human and murine erythroid cells^{167,248,250}.

TFR2 regulation of erythropoiesis may partly be through EPOR export, however it seems able to transduce a signal upon holo-transferrin binding during terminal differentiation. Indeed, in absence of TFR2, the growth differentiation factor 15 (GDF15) is not produced anymore by the erythroblasts¹⁶⁷. As the signaling downstream of TFR2 remains elusive in erythroid cells, we aimed at identifying its protein partners. Here we purified the TFR2 complex in human erythroleukemic UT-7 cells, and were able to identify by mass spectrometry the Myotonic dystrophy kinase-related CDC42-binding kinase α (MRCK α). MRCK α is a Serine/Threonine kinase directly regulated by CDC42, a GTPase regulating cytoskeleton reorganization. MRCK α phosphorylates the myosin regulatory light chain II (MLC2), by which it regulates myosin activity²⁶⁸. As MLC2 is involved in the trafficking of membrane proteins^{269,270}, we hypothesized that MRCK α may control TFR2 and EPOR trafficking.

In this study, we investigated the role of the prospective new partner MRCK α in the TFR2-EPOR complex. We show here that MRCK α and TFR2 are co-expressed during human terminal differentiation, and that MRCK α interacts with both membrane-bound TFR2 and membrane-bound EPOR. We found that the knockdown of MRCK α increases EPOR presence at cell-surface but reduces both TFR1 and TFR2 cell surface expression. As all those three proteins regulate erythropoiesis, we investigated the role of MRCK α in erythropoiesis. In human primary erythroblasts, knockdown of *CDC42BPA* by ShRNA, leads to a delayed terminal differentiation, as illustrated by a more immature morphology during terminal differentiation as well as by impaired hemoglobinization. Knocking out *Cdc42bpa* by CRISPR/CAS9 in the MEDEP murine erythroid cells show a more severe delay in differentiation. In this study, we identified MRCK α as a regulator of three major receptors involved in erythropoiesis, designating MRCK α as a master regulator of terminal erythroid differentiation.

The Serine/Threonine kinase MRCK α is a new partner of TFR2

As TFR2 signaling remains unknown, we aimed at identifying protein partners of TFR2. To do that, TFR2 was immuno-precipitated following the steps described in figure 1A, and proteins present in the precipitated fraction were analyzed by mass spectrometry. False positives were determined using the precipitated fraction with the control antibody. The efficiency of TFR2 immunoprecipitation allowed us to identify 275 prospective partners, 16 of which were found in all analyses (figure 1B). Among the potential candidates, we focused on MRCK α (Myotonic

dystrophy kinase-Related CDC42-binding Kinase α) since this Serine/Threonine kinase possesses an Iron Responsive Element in its 3'UTR¹¹⁸, suggesting that its expression may be regulated by intracellular iron level. Furthermore, it was shown to co-localize with the transferrin receptor type 1 (TFR1)²⁷¹, homolog of TFR2. MRCK α expression pattern correlates with TFR2 during human terminal differentiation, and the quantity of both proteins decreases with the differentiation process (figure 1C). First, we confirmed the association between TFR2 and MRCK α in the erythroleukemic cell line UT-7, by immunoprecipitating TFR2 (figure 1D). As TFR2 and TFR1 are highly similar, TFR2 antibodies were checked for their ability to immuno-precipitate TFR1 in a non-TFR2 expressing cell line, and were found to be highly specific of TFR2 (*data not shown*). As TFR2 has been demonstrated to interact with the erythropoietin receptor (EPOR)¹⁶⁷, we assessed the ability of EPOR to interact with MRCK α . Immunoprecipitation of EPOR in UT-7 cells led to MRCK α precipitation (figure 1E). Our data suggest the existence of an MRCK α -TFR2-EPOR complex, and the association between those proteins was also observed with the immunoprecipitation of TFR2 in human primary erythroblasts (figure 1F). Neither time nor dose-dependent exposure to either iron-loaded transferrin or erythropoietin was found to affect the interaction in between the triplex (supplemental data, figure 1), implying MRCK α association is not dependent on ligand-binding.

MRCK α regulates cell-surface expression of both transferrin receptors and of EPOR

As MRCK α regulates the regulatory myosin light chain (MLC2) that is involved in membrane protein trafficking^{269,270}, we hypothesized it could control the cell-surface localization of its partners. To investigate the role of MRCK α in its interaction with TFR2 and EPOR, *CDC42BPA* (encoding MRCK α) expression was knocked-down by two different shRNA in human primary erythroblasts (figure 2A). The cell-surface expression of EPOR, TFR1, and TFR2 was then measured in polychromatophilic erythroblasts by flow cytometry. EPOR expression was consistently higher in the MRCK α knockdown conditions (0.99 ± 0.002 and 0.96 ± 0.04 *versus* 0.61 ± 0.11) (figure 2B). TFR1 was found significantly decreased at cell surface on the erythroblasts (1.05 ± 0.03 and 1.12 ± 0.07 *versus* 1.43 ± 0.1) (figure 2C), as was TFR2 (1.01 ± 0.01 and 0.99 ± 0.01 *versus* 1.18 ± 0.06) (figure 2D). Those results were confirmed in several sub-clones of UT-7 knocked-down for *CDC42BPA* expression. In the knocked down clones, residual expression of MRCK α amounted to 5-10% of the quantity found in control clones (figure 2E). The knockdown led to a 1.5-time increase of cell-surface EPOR expression (1.54 ± 0.18 and 1.69 ± 0.22 *versus*

1±0.04) (figure 2F). TFR1 had a cell-surface expression decreased by 30% in the knockdown compared to the control (0.72±0.03 and 0.66±0.08 *versus* 1.06±0.065) (figure 2G). By flow cytometry, TFR2 expression at cell-surface is too weak to be detected in UT-7 cells. Therefore, we could not confirm the decrease of TFR2 in the knocked down conditions in this model. As cell-surface expression is affected, MRCK α seems to regulate either the export, the recycling or the internalization of the transferrin receptors and of EPOR. To check whether MRCK α is able to bind TFR2 and EPOR when they are expressed at the surface, we used biotin-labelled erythropoietin, allowing us to recover all the proteins interacting with plasma membrane-bound EPOR. MRCK α presence is found in the precipitated fraction, meaning it does interact with the membrane-bound TFR2/EPOR (figure 2H). However, in UT-7 sub-clones in which *CDC42BPA* expression was knockdown by shRNA, no MRCK α is detected in the precipitated fraction, even though TFR2 and EPOR are present at cell-surface. Therefore, MRCK α binds to cell-surface expressed TFR2 and EPOR but is not absolutely required for their export.

MRCK α positively regulates human terminal erythroid differentiation

As both EPOR and TFR2 regulate erythropoiesis, we aimed at determining if MRCK α is also involved in erythroid differentiation. To answer this question, we knocked down the expression of *CDC42BPA* (encoding MRCK α) by shRNA in human primary proerythroblasts (figure 3A) and monitored the terminal differentiation. The survival of the knocked-down erythroblasts was not significantly affected compared to control (supplemental data, figure 2A). Proliferation tended to be greater in the knockdown conditions, however this increase is not significant (figure 3B). Additionally, the knockdown of *CDC42BPA* in UT-7 cells does not affect cell proliferation (supplemental data, figure 2B). Morphological analyses by May-Grünwald-Giemsa staining showed the knocked-down erythroblasts were more immature than control cells, with less condensed chromatin, and relatively bigger cells (figure 3C). This delay in morphological maturation was lost at the end of differentiation (supplemental data, figure 2C), possibly because the residual expression of MRCK α was sufficient for latter stages. In accordance with their more immature morphology, knocked-down erythroblasts exhibited a delayed hemoglobinization as measured by benzidine staining. This delay was significant at day 5 of differentiation (mainly late basophilic erythroblasts) which corresponds to the onset of hemoglobinization (24.43± 3.3 and 25.8± 2.16 *versus* 39.23± 4.79 in the control) (figure 3D). The delay observed with MRCK α

knockdown was also illustrated by cell surface acquisition of Glycophorin A (GPA), which is progressively acquired from early basophilic erythroblast to polychromatophilic erythroblast. The proportion of GPA^{high} cells at day 5 of differentiation was smaller in the knockdown conditions compared to the control (12.19%±0.73 and 8.86±1.7 compared to 15.13%±0.08) (figure 3E).

Mrck α positively regulates murine terminal erythroid differentiation

As several differences exist between murine and human erythropoiesis, and knockouts of human primary erythroid progenitors is not possible, we elected to generate a knockout of *Cdc42bpa* in murine cells to better understand the role of MRCK α . As MEDEP cells recapitulate closely murine erythropoiesis²⁶⁵(Gautier EF, Leduc M, et al., submitted), we engineered *Cdc42bpa*^{Knockout} clones in this cell line using the CRISPR/CAS9 technology (figure 4A). Analyses of the cell morphology during terminal differentiation revealed the knockout cells are more immature than control cells, and were relatively bigger (figure 4B; supplemental data, figure 3A). The difference in cell size was also observed by flow cytometry using the forward scatter (figure 4C). The analysis of the cell surface markers as described previously²⁷² also indicate a major delay in differentiation, with delayed acquisition of CD71 and Ter119, and delayed loss of CD44 and CD117 (figure 4C; supplemental data, figure 3B). Conjointly, the hemoglobinization process is totally blocked for 24 hours while around 30% of the WT cells are already hemoglobinized (figure 4D). The block of differentiation was not due to impaired survival of the knockout clones (supplemental data, figure 3C). As immature erythroblasts proliferate more, this delay may explain the greater growth of *Cdc42bpa* knockout cells (figure 4E).

Discussion

Our data demonstrate the presence of MRCK α in the EPOR-TFR2 complex by various means. Several mass spectrometry analyses of TFR2 complex pointed out MRCK α as a partner, and co-precipitation experiments confirmed the existence of an interaction in between these proteins (figure 1). As TFR2 and EPOR are tightly associated¹⁶⁷, further investigations are required to determine whether MRCK α interacts with only one of them or both of them.

Precipitation of biotin-labelled EPO allows for MRCK α recovery, demonstrating that MRCK α interacts with cell-surface TFR2 and EPOR. However, MRCK α is not required for EPOR and TFR2

export, as the invalidation of *CDC42BPA* does not prevent EPOR nor TFR2 from reaching the surface (figure 2). We showed previously that TFR2 acts as an escort protein for EPOR¹⁶⁷. In accordance with this observation, EPO deprivation of human primary erythroblasts leads to an increase of cell-surface EPOR but also to an increase of cell-surface TFR2 (*data not shown*). However, we observe that MRCK α invalidation leads to a decreased cell-surface expression of both TFR1 and TFR2, while cell-surface expression of EPOR is increased (figure 2). The fact of TFR2 and EPOR not being affected conjointly may be explained by MRCK α regulating the recycling and/or the internalization of one of them, and not the other. This hypothesis need to be tested.

Previously, MRCK α has been suggested to participate in transferrin uptake, as well as to co-localize with a transferrin receptor – most likely TFR1²⁷¹. As we observed a decreased cell-surface expression of both TFR1 and TFR2 with *CDC42BPA* knockdown, it is our hypothesis that MRCK α regulates mainly the trafficking of transferrin receptors, although its regulation of EPOR trafficking cannot be excluded.

MRCK α promotes acto-myosin contractility by phosphorylating Ser19 on the regulatory myosin-II light chain 2 (MLC2)²⁶⁸, as well as by phosphorylating the myosin-binding subunit MYPT1 of the myosin light chain phosphatase. Phosphorylation of MYPT1 prevents dephosphorylation of MLC2²⁷³. Non muscle myosin II has been suggested as a regulator of clathrin-mediated endocytosis (CME)²⁷⁰. Both transferrin receptors are internalized by CME^{97,223}, and clustering of TFR1 promotes coat pit initiation²⁷⁴. Transferrin uptake was found impaired in K562 cells in which *CDC42BPA* expression was silenced (Cmejla et al., 2010), and inhibition of myosin-II leads to a defective uptake of transferrin, that is roughly 50% less efficient²⁷⁰, highlighting reliance on CME for transferrin delivery. Activation of MLC2 was described to positively regulate CME, therefore a decreased phosphorylation of MLC2 due to knocked down *CDC42BPA* should in theory yield to a greater quantity of transferrin receptors at cell-surface, while we observe a reduced expression. The interaction between myosin, actin, and molecular motors being transient and complex, these contradictory results could be explained by yet another unknown regulatory mechanism/partner. Furthermore, our results do not allow us to exclude the possibility of MRCK α regulating the recycling of the transferrin receptors, even though no information on a potential role of either MLC2 or MRCK α in recycling pathway has been described as of yet.

As MRCK α controls cell surface expression of both transferrin receptors and EPOR, three major actors of erythropoiesis, its role in terminal differentiation was investigated. Knockdown of *CDC42BPA* in human primary erythroblasts leads to a delayed terminal differentiation as illustrated by the delayed onset of hemoglobinization and GPA acquisition. The delay in morphology is lost after a few days, which can be explained by the use of shRNA as a few active MRCK α molecules remain in this set-up. To avoid remains of active Mrck α in MEDEP cells, we used the CRISPR/CAS9 technology. The knockout of *Cdc42bpa* in MEDEP cells leads to a more drastic delay in terminal differentiation. The onset of hemoglobinization is delayed by 24h, as is nucleus compaction and cell shrinkage. Cell surface markers acquisition/loss is strikingly altered. Proliferation tends to be greater in the knocked-out MEDEP cells as well as in the knocked down human primary erythroblasts. However, the proliferation of *CDC42BPA* knocked-down UT-7 cells, which are unable to differentiate, is not greater than the proliferation of their control. This suggests the increased proliferation observed can be imparted to the delay of differentiation. As EPOR cell-surface expression is higher in the *CDC42BPA* knocked-down erythroblasts, its signaling might be increased which may participate in the delay of differentiation by promoting proliferation of immature stage erythroblasts. More importantly however, we showed previously that the knockdown of *TFR2* in human erythroblasts leads to an even more severe delay in differentiation¹⁶⁷. As *CDC42BPA* knockdown leads to a decreased cell-surface TFR2 expression, the observed delay could be due to a reduced signaling downstream of TFR2. Alternatively, MRCK α being possibly involved in clathrine-dependent receptor internalization, the invalidation of *CDC42BPA* could affect the cell-surface expression of other receptors not studied in this manuscript.

TFR1-Transferrin delivery being most likely altered, the observed delay could also be induced by lack of cellular iron content at least in regards to hemoglobinization. Khalil and collaborators showed recently the existence of an alternative endocytic pathway for TFR2-Transferrin²²⁷ by which erythroid cells are able to direct iron to the mitochondria via mitochondrial-lysosomal contacts. TFR2 expression being decreased with *CDC42BPA* knockdown in addition to TFR1, this is in favor of erythroblasts being further deprived of transferrin delivery. Finally, Khalil and collaborators identified recently the scaffold protein SCRIBBLE as a partner of both EPOR and TFR2²²⁵. Their hypothesis is that iron deprivation would lead to a decreased EPOR expression due to trapping of SCRIBBLE by TFR2 which is degraded by the lysosome in absence of iron-bound

transferrin binding. As discussed previously, knockdown of *CDC42BPA* leads to an increased EPOR and decreased TFR2 cell-surface expression. While our results are not in accordance with Khalil and collaborators, this may be explained by TFR2 being more recycled than sent to the lysosome in our condition, which would not quench SCRIBBLE.

MRCK α belongs to the Dystrophy Myotonic Protein Kinase (DMPK) kinase family, to which also belongs MRCK β , MRCK γ , and the RhoA binding coiled-coil containing kinase 1 and 2 (ROCK1, ROCK2). While MRCK β and MRCK γ are not expressed in erythroid cells³⁰, ROCK1 and ROCK2 are also expressed. ROCK1 has previously been shown to be involved in terminal erythroid differentiation⁷⁹, and phosphorylates MLC2 on both Ser19 and Thr18, allowing further activation. ROCK1 and MRCK α have been found to have redundant function in other biological phenomena²⁷³, which could allow partial compensation by ROCK1. Both ROCK1 and MRCK α are involved in cytoskeleton reorganization²⁶⁸. Terminal differentiation is marked by extensive morphological changes, affecting cell size and the properties of the plasma membrane. Non muscle myosin-II participates in this reorganization⁴², and controls the curvature and deformability of mature red blood cells⁴⁸. The delayed cell shrinkage and differentiation we observed in absence of MRCK α could be explained also by a delayed remodeling of the membrane components.

In this manuscript, we characterize the Serine/Threonine kinase MRCK α as a new regulator of erythropoiesis. Its regulation of cell surface expression of the main receptors involved in erythropoiesis – EPOR, TFR2, TFR1 – makes it an interesting conductor balancing both iron requirement and differentiation. Its action is most likely pleiotropic as it is probable it is also involved in membrane remodeling which, alongside hemoglobin synthesis, is crucial to red blood cell function.

Materials and Methods

Reagents and antibodies

Anti-EPOR antibody (C-236) used in immunoprecipitation experiments has been described previously²⁷⁵. Anti-TFR2 rabbit polyclonal antibodies were generated against a recombinant protein containing the human TFR2 ectodomain fused to THIOREDOXIN produced in bacteria. For Western Blot experiments, anti-TFR2 (9F8 1C11), anti-MRCK α (B-3), anti-HSC70 (B6), anti-EPOR (C-20) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology.

Immunoprecipitation

Solubilization of either human primary erythroblasts or UT-7/EPO cells was done in 1mL of solubilization buffer (10mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% NP40, 10% Glycerol) containing Complete protease inhibitors (Roche Diagnostics), and phosphatases inhibitors (β -glycerophosphate 25mM, sodium pyrophosphate 1mM, sodium fluor 20mM, vanadate 1mM) on ice for 20min. Cell extracts were cleared by centrifugation (27 000g, 20min). Precipitation was done using G-coupled sepharose beads and 1 μ g antibodies. Samples were washed twice in solubilization buffer, and twice more with the washing solution containing 0.1% NP40. For mass-spectrometry analyses, samples were washed once more in phosphate buffered saline then eluted in SDS 2% Tris-HCl 50 mM pH 7.5 and heated at 90°C for 5 minutes. Samples were digested by Trypsin and analyzed on a Q-Exactive mass spectrometer. For EPOR immunoprecipitation, UT-7/EPO cells were deprived of EPO for 12h.

Streptavidin precipitation

UT-7/EPO cells were deprived for 12h of EPO, then stimulated 10 minutes with 10U/mL of either biotinylated-EPO or regular EPO. Cells were then solubilized in 1mL of solubilization buffer (10mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% NP40, 10% Glycerol) containing Complete protease inhibitors (Roche Diagnostics), and phosphatases inhibitors (β -glycerophosphate 25mM, sodium pyrophosphate 1mM, sodium fluor 20mM, vanadate 1mM) on ice for 20min. Cell extracts were cleared by centrifugation (27 000g, 20min). Precipitation was done using Pierce™ High Capacity Streptavidin Agarose (purchased from ThermoScientific, #20357). Samples were washed twice in solubilization buffer, and twice more with the washing solution containing 0.1% NP40, then eluted in laemmli buffer containing 50mM of dithiothreitol, and heated at 90°C for 5 minutes.

Western blot

Cell lysis was done in un-supplemented Laemmli sample buffer allowing protein quantity assessment using Pierce BCA Protein Assay Kit. Dithiothreitol was added afterwards. Whole cell extracts were fractionated by SDS-PAGE and transferred to Amersham Protran nitrocellulose membranes. Protein presence and samples even loading were assessed using Ponceau staining. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C. Secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody were purchased from SIGMA Aldrich Bands were detected using Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent. Acquisition of images were done using a LAS-3000 camera (Fujifilm).

Flow cytometry

For differentiation monitoring, cells were stained as described previously³⁰. PC7-conjugated anti-Glycophorin A (GPA), APC-conjugated anti-CD49d ($\alpha 4$ integrin), were purchased from Beckman Coulter; anti-BRIC6 (anti-band 3) was from the NHSBT International Blood Group Reference Laboratory (Bristol, UK). APC-CD71 was purchased from BioLegend. For TFR2 and EPOR labelling, cells were blocked 10 minutes in AB+ human serum, washed in PBS SVF 2% 0.01% sodium azide, then stained for 30 minutes at 4°C with either anti-TFR2 polyclonal antibodies versus corresponding pre-immune serum, or with anti-EPOR mAb (Roche) versus normal mouse IgG purchased from Santa Cruz. Cells were washed with PBS SVF 2% 0.01% sodium azide, then stained using Alexa Fluor 647 antibodies for another 30 minutes at 4°C. After another wash, samples were acquired on a BD Accuri C6 Flow cytometer, and analyzed using the manufacturer's software.

Cell lines

UT-7/EPO cells were cultured in Minimum Essential Medium α (Gibco) containing 2mM glutamine (Gibco), 100u/ml Penicillin-Streptomycin (Gibco), and 2U/mL EPO (Roche). Cells were maintained at a concentration range in between 300 000 cells/mL and 600 000 cells/mL prior to immunoprecipitation experiments. For knock-down of *CDC42BPA* by shRNAs, cells were sub-cloned after lentiviral infection (see “production and use of lentiviral constructs”), and 2 independent clones for each shRNA were established and used for subsequent experiments.

MEDEP cells²⁶⁵ were cultured in Iscove Dulbecco Modified Eagle Medium (IMDM) containing 2mM L-Glutamine and 100u/ml Penicillin-streptomycin, 15% SVF, ITS (Insulin, Transferrin,

Selenium), ascorbic acid 50µg/mL, 45nM α -Thioglycerol, 10^{-7} Dexamethasone and 50nM stem cell factor (SCF). ITS, ascorbic acid, α -Thioglycerol, dexamethasone and murine SCF were purchased from Sigma-Aldrich. Differentiation is launched by removing SCF and dexamethasone from the medium through phosphate saline buffer wash, and adding 4U/mL EPO. Monitoring of MEDEP cells differentiation is performed every 12h. Inactivation of *Cdc42bpa* was obtained with the use of the CRISPR/CAS9 technology, and deleted mutant were sub-cloned and established as stable lines.

Purification and culture of human primary erythroblasts

Progenitors were obtained from human donors who gave informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki Principles. The study has been approved by the INSERM Institutional Review Board IRB 00003888. CD34⁺ cells were purified from peripheral blood after cytopheresis by positive magnetic selection using the MACS CD34 isolation kit, purchased from Miltenyi Biotech. Cells were then cultured at 5% CO₂ and 37°C for 5 days in Iscove Dulbecco Modified Eagle Medium (IMDM) containing 1% L-Glutamine (Gln, purchased from Gibco) and 1% Penicillin-streptomycin (PS, purchased from Gibco), 15% BIT 9500 (Bovine serum albumin, insulin, transferrin, purchased from Stem Cell Technologies), 100ng/mL stem cell factor (SCF, Miltenyi Biotech), 10 ng/mL interleukin-3 (IL-3, Miltenyi Biotech), and 10ng/mL interleukin-6 (IL-6, Miltenyi Biotech). The obtained erythroid progenitor population was amplified for up to 5 days in IMDM BIT 15%, Gln 2mM, PS 100U/ml, SCF 100ng/mL, IL-3 10ng/mL, Dexamethasone 2.10^{-7} (Sigma-Aldrich) and 2U/mL erythropoietin Terminal differentiation was then initiated by washing the pure proerythroblast population in phosphate saline buffer, and culturing the cell for 24h in IMDM BIT 15%, Gln, PS, SCF 40ng/mL, EPO 4U/mL, 3% AB+ human serum and 3µM RU486. Afterwards, erythroblasts are cultured in IMDM BIT 15%, Gln 1%, PS 1%, EPO 4U/mL, 3% AB+ human serum. 5% SVF is added to the medium when the erythroid precursors reached the polychromatophilic stage, and differentiation takes up to 15 days.

Production and use of lentiviral constructs

Lentiviral constructs for control (VSCII 266) and *CDC42BPA* (1: V3SH11252-229379838; 2: V3SH11252-229962420) shRNAs were purchased from Dharmacon. Recombinant lentiviruses were obtained by transiently transfecting 293T cells by calcium phosphate precipitation with pCMV-G (VSVG envelope coding sequence), pCMV-gag-pol and a Dharmacon SMART vector

containing either a control or *CDC42BPA* targeting shRNA sequence. Supernatants containing infectious lentiviral particles were concentrated by ultracentrifugation. Infections of human erythroid precursors with lentiviruses were performed during the amplification phase (see “purification and culture of human primary erythroblasts”) in presence of SCF, IL-3, EPO and Dexamethasone.

Statistical analysis

Data extracted from Gautier et al., Cell report, 2016³⁰, are expressed as mean values +/- SDs. Original data are expressed as mean values +/- S.E.M. To allow comparison between flow cytometry experiments on human primary erythroblasts, the mean intensity of fluorescence was usually normalized by the control of each experiment, then the ratios were compared between the groups using Student t-test. For analyses pertaining to the differentiation process (hemoglobinization, survival, proliferation), t-test were executed between the groups only if the 2-way ANOVA test was significant – else, the data are considered inconclusive. Results of the statistical analysis was shown on as: ns non-significant (p-value >0.05), * p-value \leq 0.05, ** p-value \leq 0.01, *** p-value \leq 0.001

Legends

Figure 1:

Identification of MRCK α as a binding partner of TFR2.

(A) Strategy for identification of TFR2 partners. At the end of the purification process, the eluted proteins were digested by trypsin. Peptides were recovered and analyzed by mass spectrometry using a Q-Exactive mass spectrometer. The different steps of the purification process were analyzed by Western Blot using anti-TFR2 antibodies.

(B) Proteins were identified using Maxquant. Classical contaminants were removed from the list. Analysis of anti-TFR2 immunoprecipitations yielded 275 prospective partners, 16 of which (TFR2 among them) were present in all three analyses, and in none of the control immunoprecipitations.

(C) Left: Label-free quantification of TFR2 and MRCK α by mass-spectrometry during human erythroid differentiation. Symbol corresponds to the mean copy number per cell per differentiation stage, error bars correspond to Standard Deviation. Black: TFR2. Grey: MRCK α . Pro-E: Pro-Erythroblast. Baso-E: Basophilic Erythroblast. Poly-E: Polychromatophilic Erythroblast. Ortho-E: Orthochromatic Erythroblast. Right: Primary human progenitors were produced from circulating hematopoietic progenitors using a 2-step culture protocol. Samples were taken regularly during erythroid differentiation and analyzed by Western blot. The same quantity of proteins was loaded in each lane. Day 1: Pro-Erythroblast. Day 3: Early Basophilic erythroblasts. Day 5: Late basophilic erythroblasts. Day 7: Polychromatophilic erythroblast. Day 10: Orthochromatic erythroblast. Day 13: Mixture of polychromatophilic and orthochromatic erythroblasts. Day 15: Reticulocytes. Samples were analyzed using anti-MRCK α , anti-TFR2 and anti-HSC70 antibodies.

(D) TFR2 and MRCK α interact in UT-7/EPO cells. After solubilization, the proteins were incubated with either anti-TFR2 or preimmune serum, then precipitated with G-sepharose beads. The precipitated proteins and total cell lysates were analyzed by Western blotting using anti-MRCK α and anti-TFR2 antibodies. SN: Supernatant. IP: Immunoprecipitation.

(E) EPOR and MRCK α interact in UT-7/EPO cells. After 12h of EPO deprivation, the UT-7 cells were solubilized, the proteins were incubated with either anti-EPOR or preimmune serum, then precipitated with G-sepharose beads. The precipitated proteins and total cell lysates were analyzed by Western blotting using anti-MRCK α , anti-TFR2, and anti-EPOR antibodies. SN: Supernatant. IP: Immunoprecipitation.

(F) TFR2 and MRCK α interact in human primary erythroblasts. After solubilization, the proteins were incubated with either anti-TFR2 or preimmune serum, then precipitated with G-sepharose beads. The precipitated proteins and total cell lysates were analyzed by Western blotting using anti-MRCK α , anti-TFR2, and anti-EPOR antibodies. SN: Supernatant. IP: Immunoprecipitation.

Figure 1

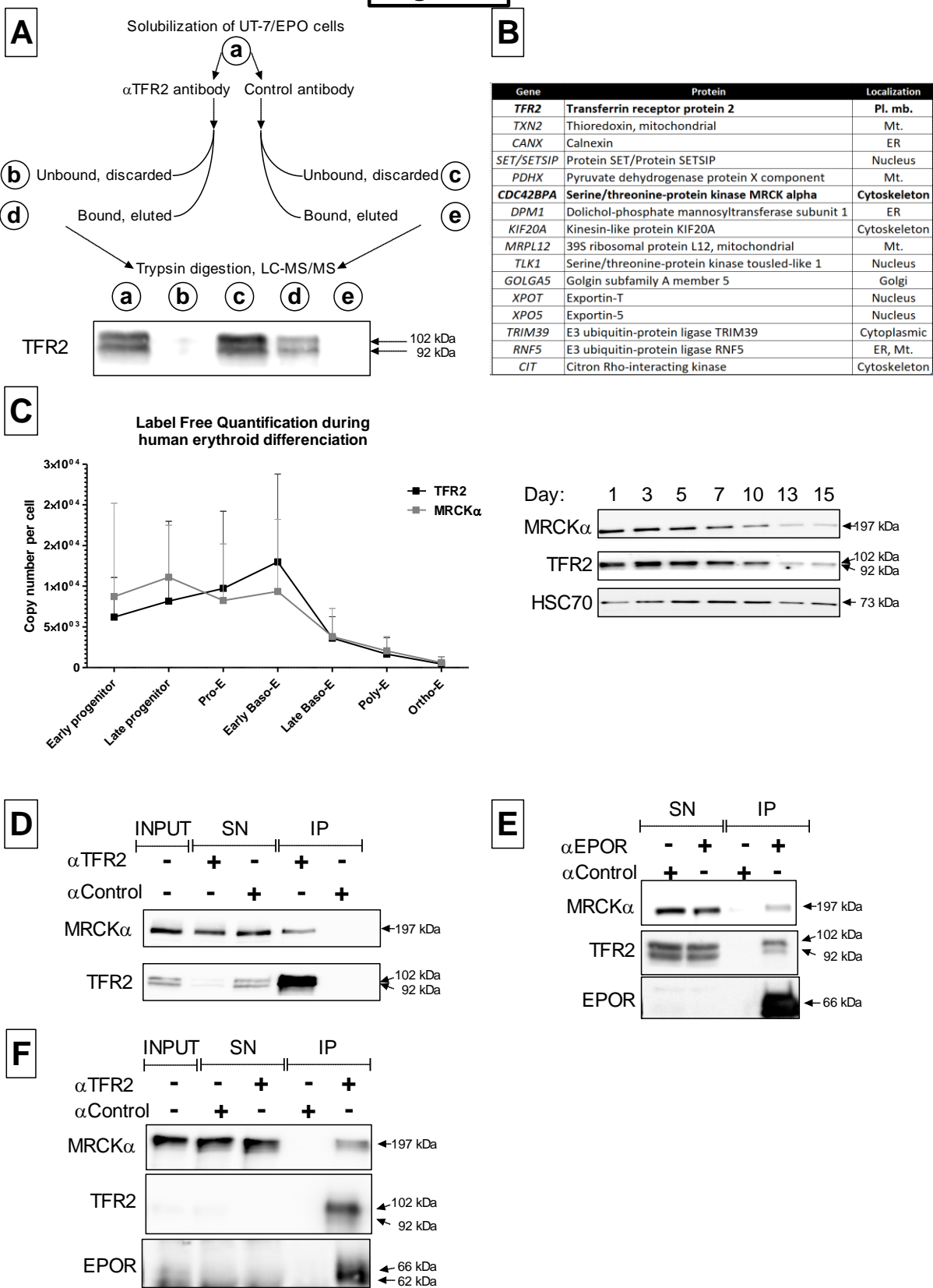


Figure 2:

MRCK α regulates TFR2, TFR1 and EPOR cell surface expression.

(A) Primary human progenitors were produced from circulating hematopoietic progenitors using a 2-step culture protocol. Samples were taken regularly during erythroid differentiation and analyzed by Western blot. The same quantity of proteins was loaded in each lane. Day 3: Early Basophilic erythroblasts. Day 5: Late basophilic erythroblasts. Day 7: Polychromatophilic erythroblast. Day 9: Orthochromatic erythroblast. Samples were analyzed using anti-MRCK α and anti-HSC70 antibodies, then quantified using MultiGauge software.

(B) Flow cytometry analysis of cell-surface EPOR expression in human primary polychromatophilic erythroblasts. Cells were deprived of EPO for 4h prior to staining. Purple: SCR (shRNA control). Dark orange: shRNA 1 targeting *CDC42BPA* “MRCK α -1”. Light orange: shRNA 2 targeting *CDC42BPA* “MRCK α -2”. Mean of three independent experiments, error bars represent Standard Error of the Mean. Statistical analysis: t-test; * p-value ≤ 0.05 . The overlay of one SCR, one MRCK α -1, and one MRCK α -2 EPOR staining of a representative experiment is shown.

(C) Flow cytometry analysis of cell-surface TFR1 expression in human primary polychromatophilic erythroblasts. Purple: SCR (shRNA control). Dark orange: shRNA 1 targeting *CDC42BPA* “MRCK α -1”. Light orange: shRNA 2 targeting *CDC42BPA* “MRCK α -2”. Mean of three independent experiments, error bars represent Standard Error of the Mean. Statistical analysis: t-test; * p-value ≤ 0.05 . The overlay of one SCR, one MRCK α -1, and one MRCK α -2 TFR1 staining of a representative experiment is shown.

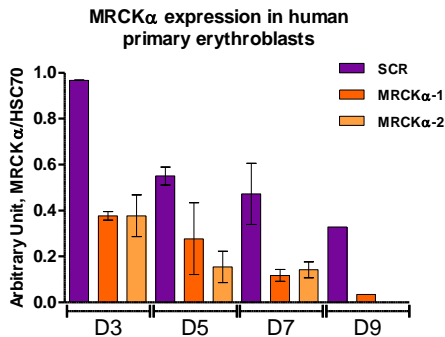
(D) Flow cytometry analysis of cell-surface TFR2 expression in human primary polychromatophilic erythroblasts. Purple: SCR (shRNA control). Dark orange: shRNA 1 targeting *CDC42BPA* “MRCK α -1”. Light orange: shRNA 2 targeting *CDC42BPA* “MRCK α -2”. Mean of three independent experiments, error bars represent Standard Error of the Mean. Statistical analysis: t-test; * p-value ≤ 0.05 . The overlay of one SCR, one MRCK α -1, and one MRCK α -2 TFR2 staining of a representative experiment is shown.

(E) Isolation of UT-7/EPO sub-clones knocked down for *CDC42BPA* (encoding MRCK α). UT-7/EPO cells were transduced with a lentiviral construct coding either a shRNA control (Scramble; SCR) or various shRNA targeting *CDC42BPA* (shRNA 1 “MRCK α -1” and 2 “MRCK α -2”). Two sub-clones were selected for each kind of shRNA. Samples were analyzed using anti-MRCK α and anti-HSC70 antibodies, then quantified using MultiGauge software.

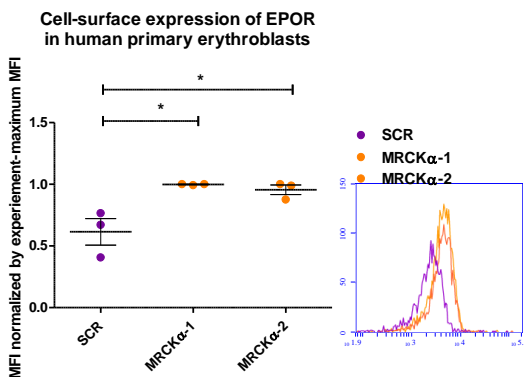
(F) Flow cytometry analysis of cell-surface EPOR expression in UT-7/EPO sub-clones. Cells were deprived of EPO for 12h prior to staining. Purple: SCR (shRNA control). Dark orange: shRNA 1 targeting *CDC42BPA* “MRCK α -1”. Light orange: shRNA 2 targeting *CDC42BPA* “MRCK α -2”.

Figure 2

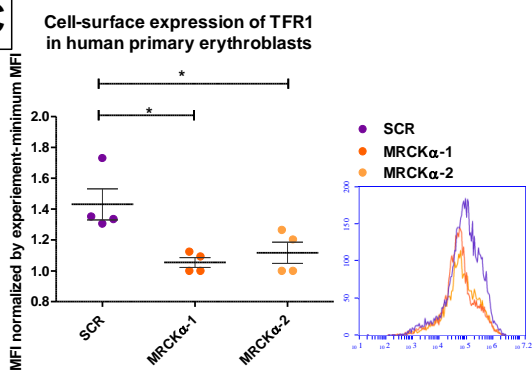
A



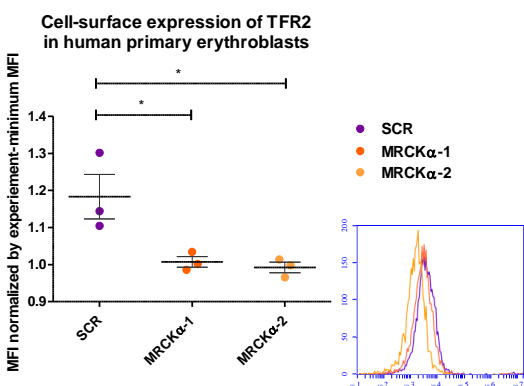
B



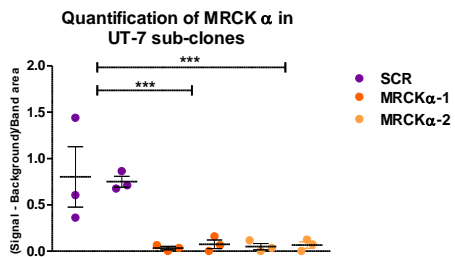
C



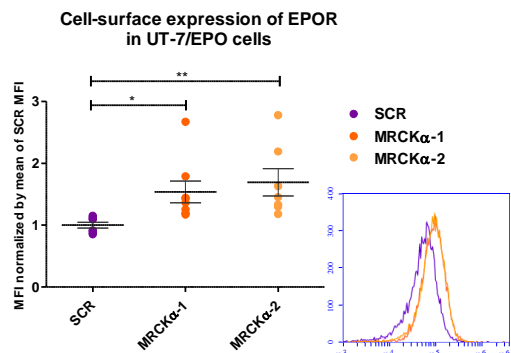
D



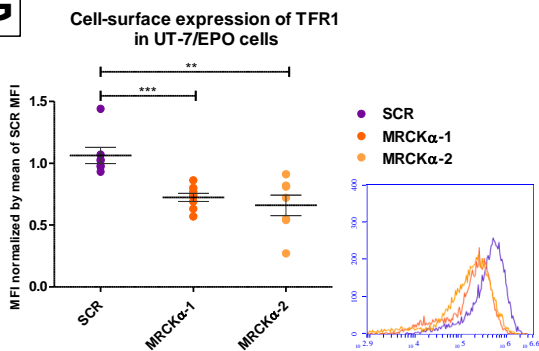
E



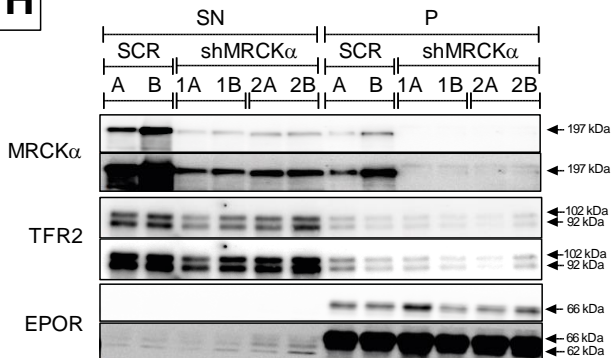
F



G



H



Mean of four independent experiments, error bars represent Standard Error of the Mean. Statistical analysis: t-test; * p-value ≤ 0.05 , ** p-value ≤ 0.01 . The overlay of one SCR, one MRCK α -1, and one MRCK α -2 EPOR staining of a representative experiment is shown.

(G) Flow cytometry analysis of cell-surface TFR1 expression in UT-7/EPO sub-clones. Purple: SCR (shRNA control). Dark orange: shRNA 1 targeting *CDC42BPA* “MRCK α -1”. Light orange: shRNA 2 targeting *CDC42BPA* “MRCK α -2”. Mean of four independent experiments, error bars represent Standard Error of the Mean. Statistical analysis: t-test; ** p-value ≤ 0.01 , *** p-value ≤ 0.001 . The overlay of one SCR, one MRCK α -1, and one MRCK α -2 TFR1 staining of a representative experiment is shown.

(H) UT-7 sub-clones were deprived of EPO for 12h, then stimulated for 10 minutes with 10U/mL of either biotinylated EPO. After solubilization, the proteins were precipitated with streptavidin beads, and analyzed by Western blot using anti-MRCK α , anti-TFR2 and anti-EPOR antibodies. Two sub-clones (A and B) were selected for each kind of shRNA (Control; SCR; shRNA targeting *CDC42BPA* 1 “MRCK α -1” and 2 “MRCK α -2”). SN: supernatant. P: streptavidin precipitation.

Figure 3:

MRCK α regulates human erythropoiesis.

(A) Primary human progenitors were produced from circulating hematopoietic progenitors using a 2-step culture protocol, and transduced with lentiviral constructs coding either a shRNA with a scramble sequence (shSCR) or shRNAs targeting *CDC42BPA* (sh*CDC42BPA*-#1 and sh*CDC42BPA*-#2). Samples were taken regularly during erythroid differentiation and analyzed by Western blot using anti-MRCK α , and anti-HSC70 antibodies. The same quantity of proteins was loaded in each lane. Day 3: Early Basophilic erythroblasts. Day 5: Late basophilic erythroblasts. Day 7: Polychromatophilic erythroblast. Day 9: Orthochromatic erythroblast.

(B) Proliferation of shSCR (control shRNA) *versus* shMRCK α -1 (shRNA 1 targeting *CDC42BPA*) *versus* shMRCK α -2 (shRNA 2 targeting *CDC42BPA*) erythroblasts. Cumulative cell number was determined by counting cells by trypan blue exclusion. Results are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments. Purple: shSCR. Dark orange: shMRCK α -1. Light orange: shMRCK α -2.

(C) Effect of *CDC42BPA* knockdown on erythroid cell maturation. Left: Stages of differentiation were assessed following staining with May-Grünwald-Giemsa; the percentage of each cell population was determined. Samples were grouped relying on the proportions found in the control condition (shSCR). Results are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments. shMRCK α -1: shRNA 1 targeting *CDC42BPA*. shMRCK α -2: shRNA 2 targeting *CDC42BPA*. Right: Representative fields of shSCR (control shRNA) *versus* shMRCK α -1 (shRNA 1 targeting *CDC42BPA*) *versus* shMRCK α -2 (shRNA 2 targeting *CDC42BPA*) erythroblasts stained by May-Grünwald-Giemsa staining at day 3 of differentiation are shown.

(D) Absence of MRCK α induces a delay in hemoglobinization. Top: The percentage of hemoglobinized cells was determined by benzidine staining at the indicated days of culture. Results are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments. Purple: shSCR (control shRNA). Dark orange: shMRCK α -1 (shRNA 1 targeting *CDC42BPA*). Light orange: shMRCK α -2 (shRNA 2 targeting *CDC42BPA*). Statistical analysis: 2-way ANOVA, significant for the shRNA variable (0.0442*) and highly significant for the time variable (<0.0001***). Bottom: Histogram of the percentage of benzidine positive cells at day 5. Statistical analysis: 1-way ANOVA: significant (0.0316*), t-test; * p-value \leq 0.05. Purple: shSCR. Dark orange: shMRCK α -1. Light orange: shMRCK α -2.

(E) The absence of MRCK α delays GLYCOPHORIN A acquisition. Histogram of the percentage of GPA^{high} cells at day 5 of differentiation. Results are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments. Purple: shSCR (control shRNA). Dark orange: shMRCK α -1 (shRNA 1 targeting *CDC42BPA*). Light orange: shMRCK α -2 (shRNA 2 targeting *CDC42BPA*). Statistical analysis: 1-way ANOVA: significant (0.0171*), t-test; * p-value \leq 0.05.

Figure 3

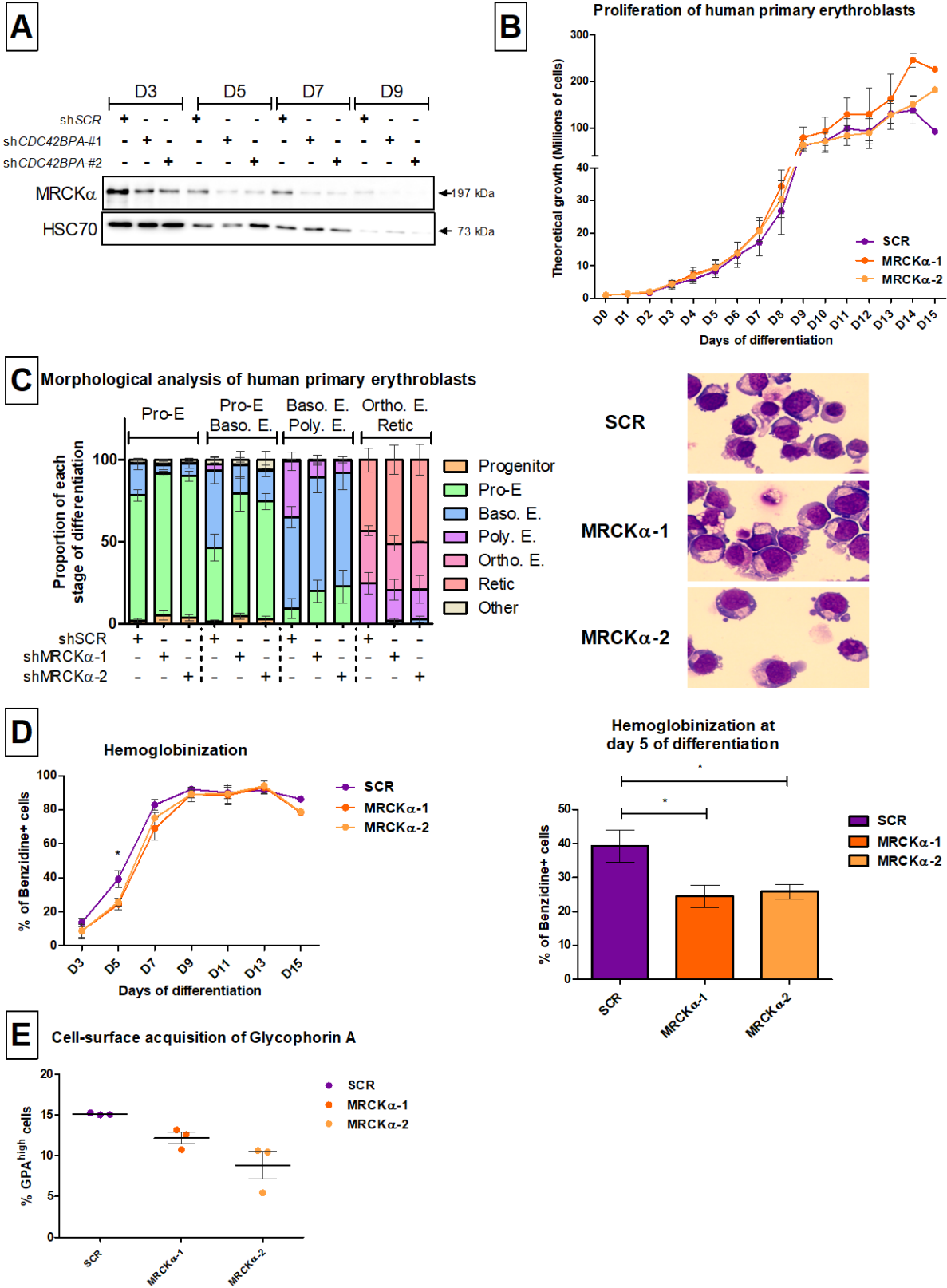


Figure 4:

Mrck α regulates murine erythropoiesis.

(A) MEDEP cells were knocked out for *Cdc42bpa* using the CRISPR/CAS9 technology. The equivalent of 0.3M of cells were analyzed by Western blot using anti-Mrck α and anti-Hsc70 antibodies.

(B) Effect of *Cdc42bpa* knockout on murine erythroid cell maturation. Representative fields of WT *versus* Mrck α -KO1 (*Cdc42bpa*^{-/-} clone 1) *versus* Mrck α -KO2 (*Cdc42bpa*^{-/-} clone 2) MEDEP cells at 36h of differentiation after May-Grünwald-Giemsa staining.

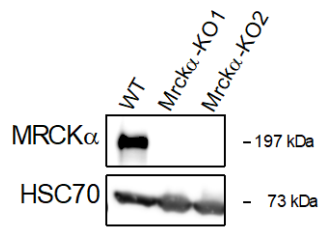
(C) Flow cytometry analysis of the differentiating MEDEP cells. Top: Forward scatter/Side scatter at 36h of differentiation showing a higher cell size in time-matched knockout clones. Bottom: Histograms show the overlay of WT (purple) *versus* Mrck α -KO1 (*Cdc42bpa*^{-/-} clone 1, dark orange) *versus* Mrck α -KO2 (*Cdc42bpa*^{-/-} clone 2, light orange) MEDEP cells staining of either CD117, CD44, CD71 or Ter119 of a representative experiment at 12h of differentiation.

(D) Absence of Mrck α induces a delay in hemoglobinization. The percentage of hemoglobinized cells was determined by benzidine staining at the indicated hours of culture. Purple: WT. Dark orange: Mrck α -KO1 (*Cdc42bpa*^{-/-} clone 1). Light orange: Mrck α -KO2 (*Cdc42bpa*^{-/-} clone 2). Statistical analysis: 2-way ANOVA (***)p-value \leq 0.001). Purple: shSCR. Dark orange: shMRCK α -1. Light orange: shMRCK α -2.

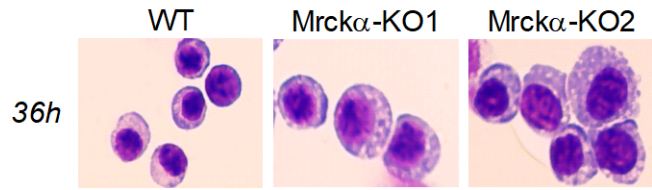
(E) Proliferation of WT (purple) *versus* two different *Cdc42bpa*^{KO} MEDEP clones (Mrck α -KO1 and Mrck α -KO2; orange and light orange respectively). Cumulative cell number was determined by counting cells with trypan blue exclusion every 12h. Results are expressed as the mean \pm SEM of two independent experiments.

Figure 4

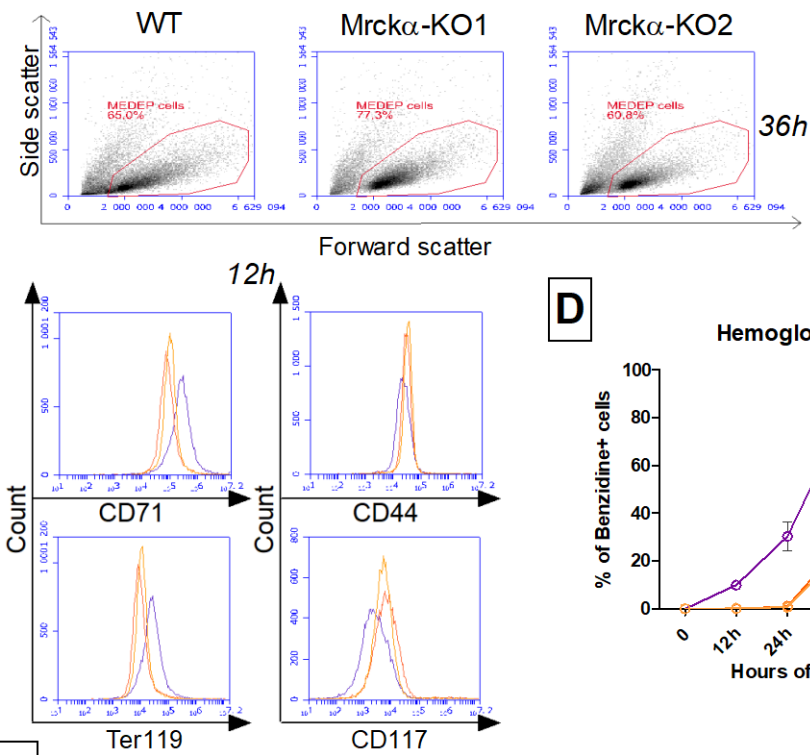
A



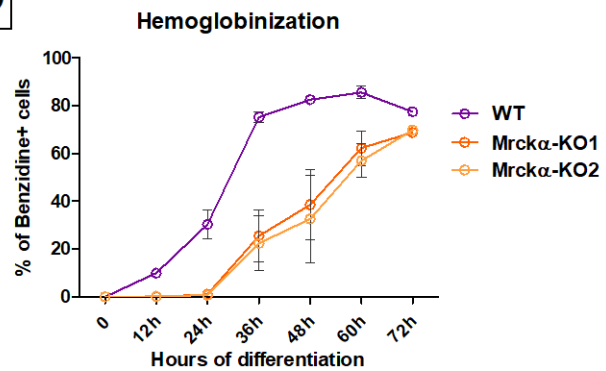
B



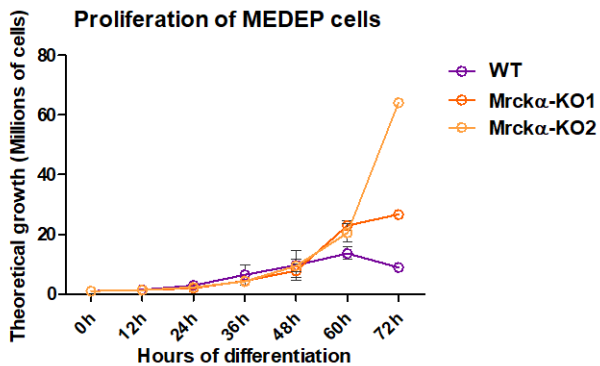
C



D



E



SUPPLEMENTAL DATA (1/2)

Figure 1:

Neither holo-transferrin nor EPO regulates the interaction between EPOR, TFR2 and MRCK α in UT-7/EPO cells. After 12h of EPO deprivation, the UT-7 cells were either solubilized right away (0), or incubated for 15 minutes (15) or 60 minutes (60) with either 10U EPO, or 25 μ M Holo-transferrin or both. The proteins were incubated with either anti-TFR2 or preimmune serum, then precipitated with G-sepharose beads. The total cell lysates (INPUT) and precipitated proteins (IP) and were analyzed by Western blotting using anti-MRCK α , anti-TFR2, and anti-EPOR antibodies.

Figure 2:

(A) Survival of shSCR (control shRNA) *versus* shMRCK α -1 (shRNA 1 targeting *CDC42BPA*) *versus* shMRCK α -2 (shRNA 2 targeting *CDC42BPA*) human primary erythroblasts. Cell viability was determined by trypan blue exclusion. Results are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments. Purple: shSCR. Dark orange: shMRCK α -1. Light orange: shMRCK α -2. Results are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments.

(B) UT-7 cells were washed and incubated 72h with increasing doses of EPO (0; 0.003; 0.01; 0.03; 0.1; 0.3; 1; 3 U/mL). Cell viability and proliferation was assessed using the Uptiblue reagent and Typhoon detector. SCR (Control shRNA) clones are in purple, shMRCK α -1 (shRNA 1 targeting *CDC42BPA*) in dark orange and shMRCK α -2 (shRNA 2 targeting *CDC42BPA*) in light orange.

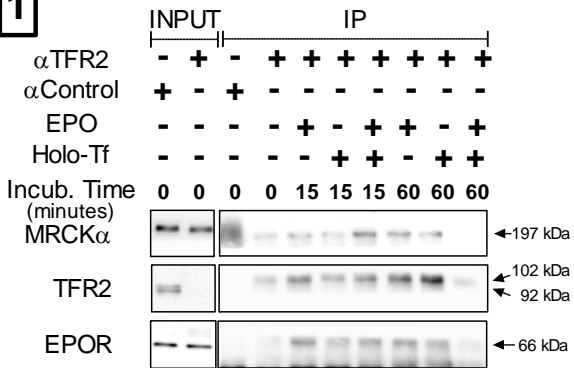
(C) Representative fields of shSCR (control shRNA) *versus* shMRCK α -1 (shRNA 1 targeting *CDC42BPA*) *versus* shMRCK α -2 (shRNA 2 targeting *CDC42BPA*) erythroblasts stained by May-Grünwald-Giemsa staining at day 3 (D3), 5 (D5), 7 (D7), 9 (D9) and 11 (D11) of differentiation are shown.

Figure 3:

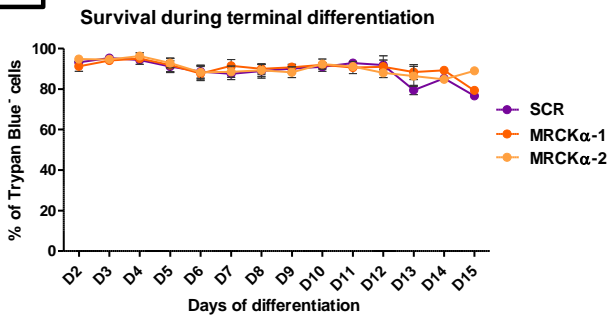
(A) Representative fields of WT *versus* Mrck α -KO1 (*Cdc42bpa*^{-/-} clone 1) *versus* Mrck α -KO2 (*Cdc42bpa*^{-/-} clone 2) MEDEP cells at 0h, 12h, 24h, 36h, 48h and 60h of differentiation after May-Grünwald-Giemsa staining. 60h time is not shown for WT as the culture was comprised of MEDEP reticulocyte whose fragility led to splatters on the slide.

Supplemental data

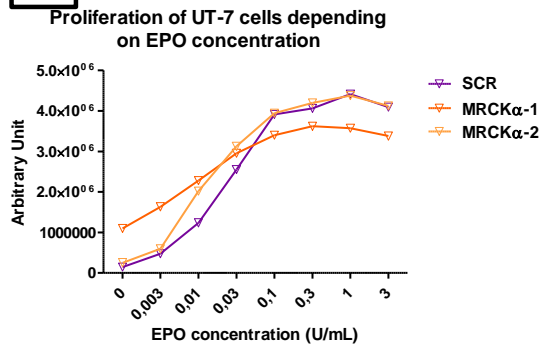
1



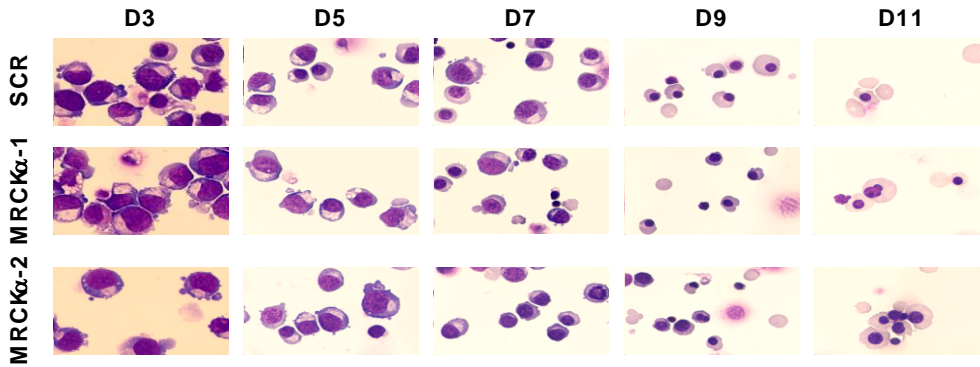
2A



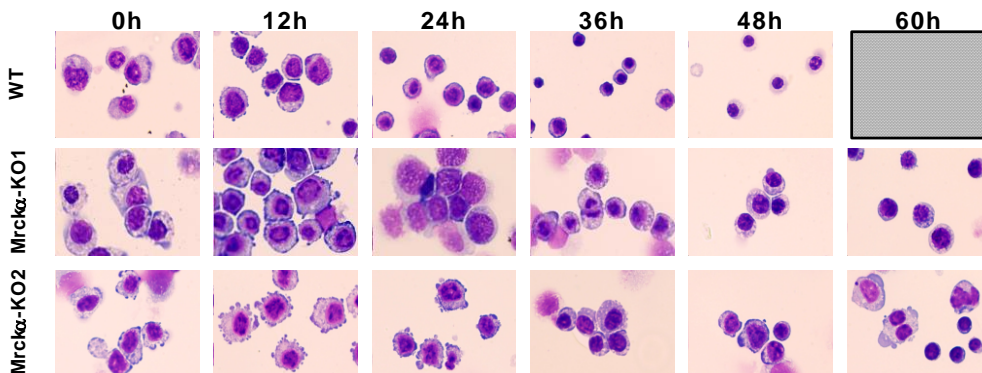
2B



2C



3A



SUPPLEMENTAL DATA (2/2)

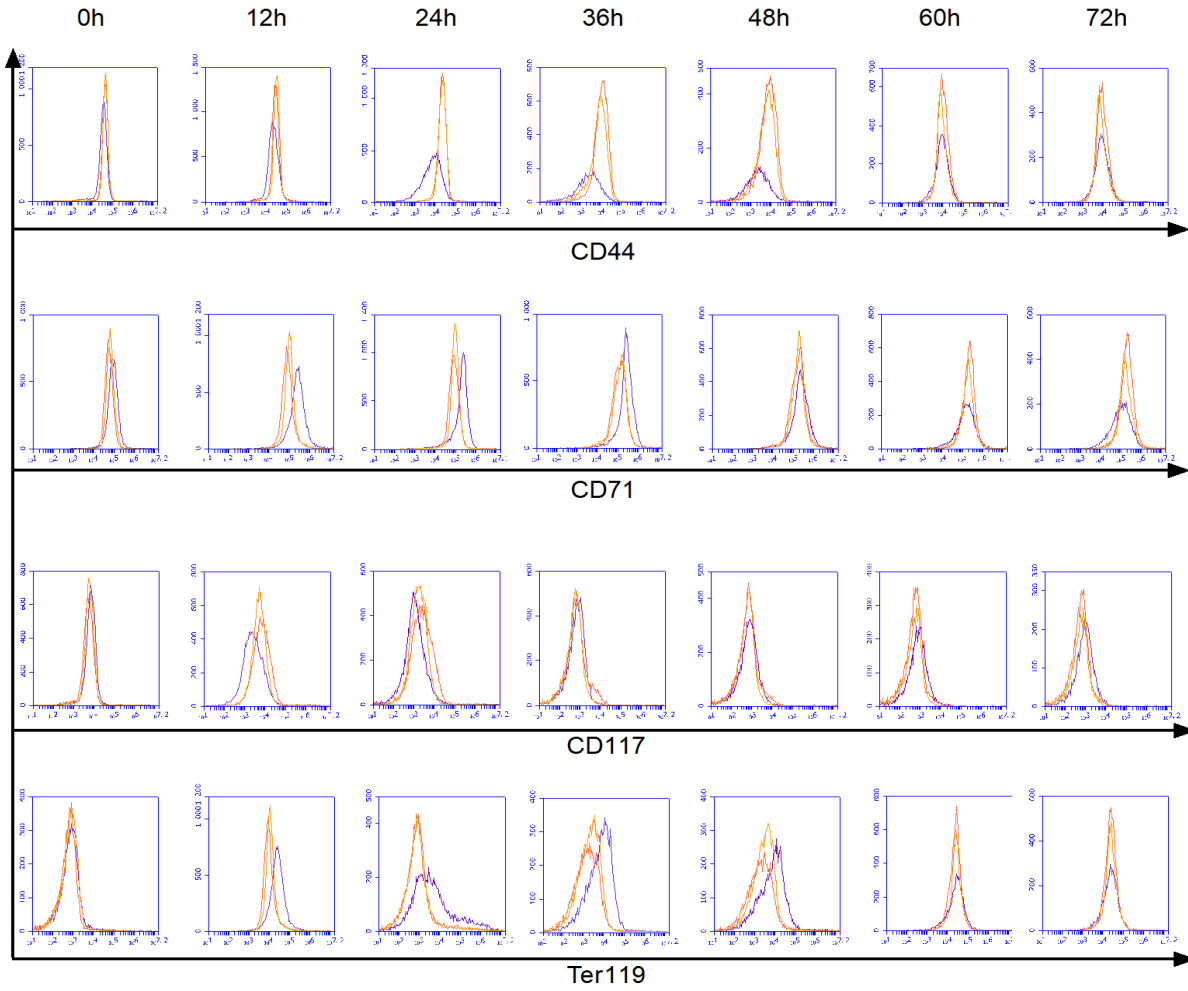
Figure 3

(B) Flow cytometry analysis of the differentiating MEDEP cells. Histograms show the overlay of WT (purple) *versus* Mrck α -KO1 (*Cdc42bpa*^{-/-} clone 1, orange) *versus* Mrck α -KO2 (*Cdc42bpa*^{-/-} clone 2, pale orange) MEDEP cells staining of either CD44, CD71, CD117, or Ter119 of a representative experiment every 12h.

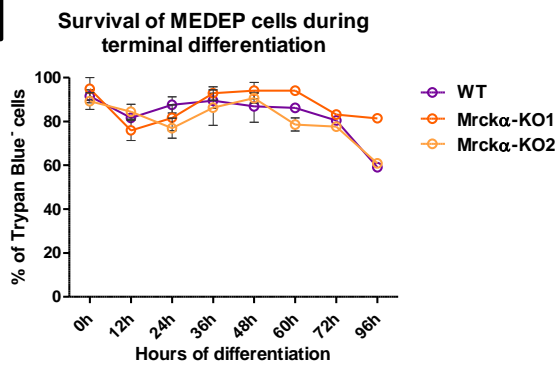
(C) Survival of WT (purple) *versus* two different *Cdc42bpa*^{KO} MEDEP clones (Mrck α -KO1 and Mrck α -KO2; orange and light orange respectively). Cell viability was determined by trypan blue exclusion every 12h. Results are expressed as the mean \pm SEM of two independent experiments.

Supplemental data

3B



3C



C. Conclusions & perspectives

Au cours de cette étude, nous avons établi que la Sérine/Thréonine kinase MRCK α est un nouveau partenaire de TFR2 et d'EPOR. Nous nous sommes intéressés à MRCK α car Cmejla et collaborateurs ont décrit la présence d'un IRE dans sa 5'UTR¹¹⁸ (pour rappel, cf. partie [II.3.A. Mécanismes de régulation au niveau cellulaire](#)). Ils montrent de légères variations de l'expression de MRCK α en fonction de la surcharge/chélation en fer exercée sur des HepG2. J'ai pu effectivement observer une augmentation d'expression de *CDC42BPA* au niveau ARNm avec la chélation en fer, mais je n'ai pas observé de diminution de cette expression avec la supplémentation en fer (**figure 20**). De plus, en testant la réponse de MRCK α au statut martial dans les UT-7 et les K562 au niveau protéique (**figure 20**), ainsi que dans les érythroblastes humains primaires (*résultats non montrés*), je n'ai pas pu mettre en évidence de variation d'expression.

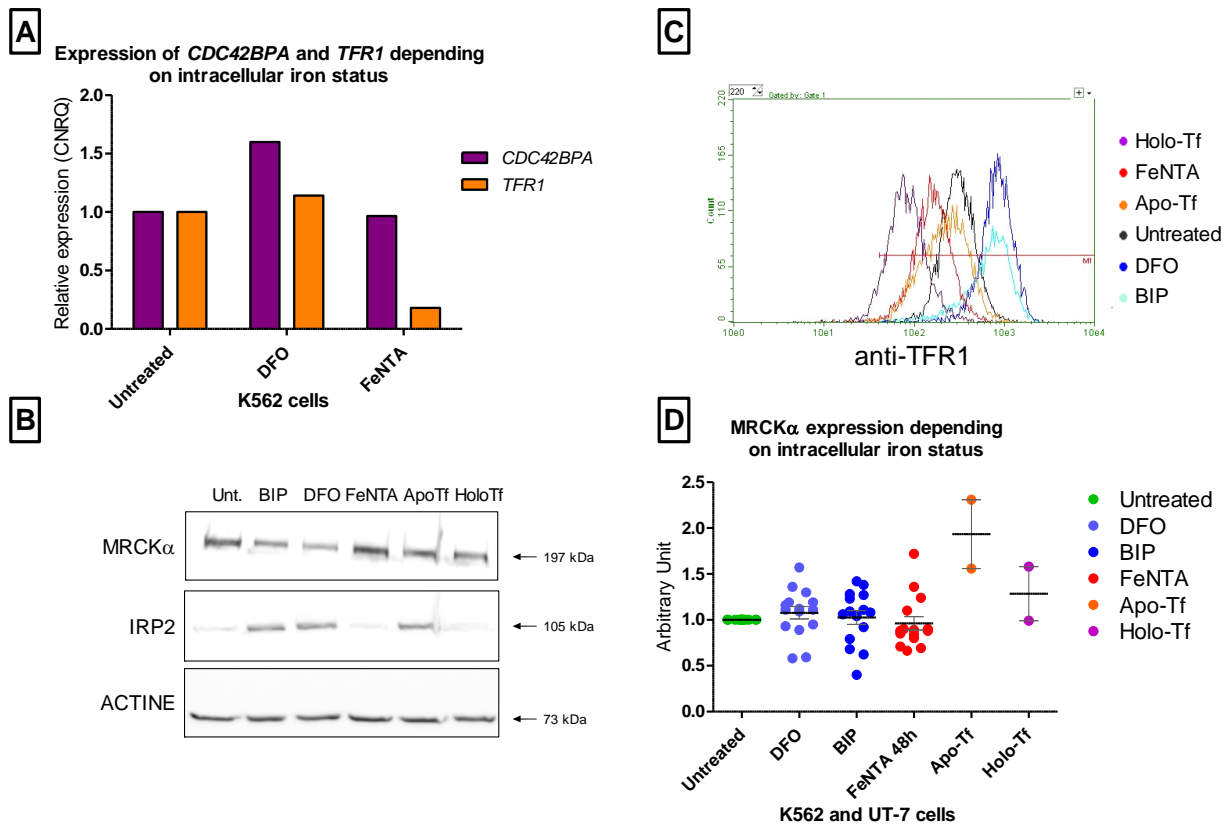


Figure 20 : Expression de MRCK α en fonction de la concentration intracellulaire en fer.

A) Afin de tester les variations de *CDC42BPA* (violet) au niveau ARNm, les K562 ont été incubées 48h avec 10 μ M de DFO (Desferrioxamine, chélateur de fer), ou 200 μ M de FeNTA (mélange de FeCl₃ et d'acide nitrilotriacétique permettant d'induire une surcharge en fer). *TFR1* (orange) est utilisé comme témoin de l'état fonctionnel du système IRE/IRP. B) Ces mêmes expériences ont été répétées dans les K562 en ajoutant les conditions BIP 100 μ M (bipyridyl,

chélateur de fer), ApoTf 13 μ M et Holo-TF 13 μ M pour observer les variations au niveau protéique, en utilisant un anticorps anti-MRCK α . IRP2 répond au statut intracellulaire en fer, et a été utilisée comme témoin de ce statut. L'actine a été utilisée comme témoin de charge. C) L'expression en surface de TFR1 a été utilisée comme témoin additionnel de la bonne surcharge/chélation en fer de ces expériences. Holo-Tf : violet. FeNTA : rouge. Apo-Tf : orange. Non traité : noir. BIP : bleu clair. DFO : bleu foncé. D) La quantification du niveau d'expression protéique de MRCK α rapporté à l'actine est montrée.

En effet, les variations d'expression de MRCK α sont faibles et ne semblent pas être corrélées au statut martial de la cellule – alors que d'autres protéines telles qu'IRP2 et TFR1 réagissent de façon attendue. Une possibilité pouvant expliquer cette absence de régulation par le système IRE/IRP est le fait qu'il n'y a qu'un unique IRE sur l'ARNm de MRCK α – comparé à 5 sur celui de TFR1. Il est possible que la régulation de MRCK α soit donc moins « sensible » que celle de TFR1.

Un autre argument qui nous a incité à porter notre attention sur MRCK α est sa co-expression avec TFR2 au cours de la différenciation terminale. Nous avons validé l'association entre ces deux protéines ainsi que l'interaction entre MRCK α et EPOR. EPOR et TFR2 formant un complexe¹⁶⁷, nos data ne suffisent pas à affirmer avec certitude que MRCK α interagit à la fois avec TFR2 et EPOR, ou seulement avec une seule de ces protéines. L'immunoprécipitation de TFR2 dans des cellules hépatiques qui expriment TFR2 et MRCK α mais pas EPOR, permettrait de répondre partiellement à cette question. L'interaction directe entre MRCK α et EPOR est plus difficile à prouver, puisqu'il n'y a pas de modèle cellulaire exprimant MRCK α et EPOR sans TFR2 ; ce qui nous forcerait donc à utiliser un système de surexpression de MRCK α et d'EPOR dans un modèle n'exprimant aucune de ces protéines. Les surexpressions favorisant les interactions non physiologiques, cela demeurerait une preuve passable d'association s'ils interagissaient. Cmejla et collaborateurs ont pu observer une co-localisation à la surface de cellules HeLa entre la transferrine et leur construction MRCK α taguée GFP, ainsi qu'un import de fer diminué dans des K562 avec une expression de MRCK α amoindrie par siRNA²⁷¹. Les travaux de Cmejla et collaborateurs laissent penser que TFR1, homologue de TFR2, pourrait également interagir avec MRCK α . Il est donc possible que MRCK α soit en mesure d'interagir avec les récepteurs à la transferrine. TFR1 a été retrouvé dans nos immunoprécipitations (IP) de TFR2 (*résultats non montrés*), cependant nos contrôles excluent l'hypothèse que l'anticorps anti-TFR2 précipite TFR1. La présence de TFR1 dans nos IP n'est pas systématique, et pourrait être attribuée au fait que le TFR1 soit exprimé de façon très majoritaire dans les cellules érythroïdes – comme en témoigne sa présence occasionnelle

dans nos IP contrôles. Une autre possibilité est que la forte similarité entre TFR1 et TFR2 permette la formation d'hétérodimères TFR1-TFR2. Il est possible – mais non le plus probable – d'imaginer que l'interaction entre TFR2 et MRCK α se fait par le biais de ces hétérodimères, cependant la quantité de MRCK α retrouvée dans la fraction précipitée avec un anticorps anti-EPOR ou avec l'EPO-biotinylée argue plus en faveur d'une interaction TFR2-MRCK α plutôt qu'une interaction TFR2-TFR1-MRCK α , puisqu'EPOR est le partenaire de TFR2. Le test de nouveaux anticorps anti-MRCK α pour leur capacité à immunoprécipiter la protéine est en cours, et nous permettra de conclure sur l'existence d'une association également avec TFR1.

MRCK α étant composée de différents domaines (détaillés ci-après, dans la [figure 22](#)), il serait intéressant de caractériser *via* quel domaine se font les interactions entre MRCK α et ses partenaires. Nous disposons de différentes constructions encodant MRCK α – l'une encodant uniquement son domaine kinase, l'autre son domaine *coiled-coil*, une construction encodant l'intégralité de MRCK α taguée GFP, et une dernière encodant l'intégralité de MRCK α mais dont le domaine kinase est non-fonctionnel. La transfection simultanée de ces constructions avec TFR2 ou EPOR dans un modèle cellulaire où ces derniers ne sont pas exprimés (telles que les cellules HeLa) nous permettra de déterminer si l'interaction entre ces protéines est directe, et si l'activité kinase de MRCK α est nécessaire à l'établissement de ces interactions.

Dans certaines de nos IP anti-TFR2 se trouvent également la *MYL9*, plus connue sous le nom de *myosin regulatory light chain 2* (MLC2), cible directe de MRCK α . En phosphorylant la Ser19 de MLC2, MRCK α va permettre le passage de la *non muscle myosin II* (NMMII) d'une conformation inactive à une conformation active²⁶⁸. MRCK α phosphoryle également MYPT1, sous-unité de la phosphatase de MLC2²⁷³, ce qui a pour conséquence d'inhiber son activité – stabilisant d'autant plus l'activation de NMMII. MRCK α régule donc le cytosquelette *via* le contrôle de la NMMII. MLC2 ayant été impliquée à plusieurs reprises dans le trafic de protéines membranaires^{269,270}, nous avons émis l'hypothèse que l'interaction de MRCK α avec ses partenaires aurait un rôle dans le *trafficking* de ces protéines.

Nous avons établi qu'en absence de MRCK α , il y a moins de TFR2 et de TFR1 en surface, tandis que l'expression d'EPOR est, elle, augmentée. Ces observations ont été effectuées à la fois dans le modèle UT-7 (la survie et la prolifération de ces cellules étant dépendante d'EPO mais celles-ci sont incapables d'effectuer une différenciation érythroïde) et dans les érythroblastes

basophiles et polychromatophiles primaires. De ce fait, ces différences d'expression ne peuvent être imputées à une cinétique de différenciation perturbée. MRCK α contrôle donc bien le *trafficking* de ces protéines.

Nos expériences réalisées avec l'EPO biotinylée nous ont permis de conclure que MRCK α interagissait avec TFR2 et EPOR lorsque ceux-ci étaient présents en surface. Or, le *knockdown* de *CDC42BPA* par shRNA dans les UT-7/EPO n'a pas empêché l'expression en surface d'EPOR et de TFR2. Cela exclut un potentiel rôle de MRCK α dans l'export de ces récepteurs. Il n'exclut cependant pas un rôle dans l'internalisation ou le recyclage de ceux-ci.

Afin de tester ces hypothèses, nous réalisons en ce moment des expériences de biotinylation de surface après incubation avec divers inhibiteurs tels que la méthyl- β -cyclodextrine (inhibant l'internalisation par endocytose *via* la déplétion du cholestérol membranaire) ou la monensine (bloquant le trafic de vésicules intracellulaires, menant à l'inhibition de l'adressage au lysosome et du recyclage à la membrane). La précipitation par streptavidine des cellules ainsi traitées permet de récupérer toutes les protéines exprimées à la surface, et de les quantifier par western blot. Nous confirmerons également par cette méthode biochimique nos résultats obtenus par cytométrie en flux sur la quantité exprimée en surface de TFR2, TFR1 et EPOR. Si MRCK α est responsable de l'inhibition de l'internalisation de ces récepteurs, la quantité de ces protéines retrouvées à la surface du contrôle et à la surface des cellules *knockdown* pour *CDC42BPA* sera similaire suite au traitement avec la méthyl- β -cyclodextrine. S'il s'agit plutôt d'une inhibition du recyclage, l'utilisation de monensine devrait entraîner une quantité diminuée de récepteurs dans les conditions contrôles similaire à ce que nous observons dans les conditions *knockdown* pour *CDC42BPA*.

Il est intéressant de noter que Chandrasekar et collaborateurs ont suggéré que la myosine 2 (NMMII) serait un régulateur du processus d'endocytose médié par les clathrines²⁷⁰. TFR1 et TFR2 étant tous deux internalisés de façon clathrine-dépendante^{97,223}, nous pourrions émettre l'hypothèse que MRCK α contrôle l'endocytose clathrine-dépendante des récepteurs à la transferrine. Chandrasekar et collaborateurs utilisent d'ailleurs le fait que TFR1 soit internalisé par ce mécanisme pour démontrer l'implication de la myosine 2 – ils observent une internalisation de la transferrine diminuée de 50% en présence d'un siRNA ciblant la myosine 2²⁷⁰. De plus, le *clustering* de TFR1 favorise l'initiation des puits recouverts de clathrine (*clathrin-coated pits*) en

vue de l'endocytose²⁷⁴. Un inhibiteur spécifique de l'endocytose clathrine-dépendante tel que le dynasore pourrait être envisagé si nos résultats sont positifs avec la méthyl- β -cyclodextrine.

Cependant, les résultats de Chandrasekar et collaborateurs semblent plus indiquer que l'activation de NMMII permet cette endocytose ; tandis que dans nos conditions, la diminution de MRCK α suggère un niveau de phosphorylation de la Ser19 de MLC2 réduite, et donc une activité de NMMII réduite. Plusieurs hypothèses peuvent être énoncées pour expliquer cette contradiction :

- La première hypothèse est que le réseau actine-myosine étant dynamique, une non-activation de NMMII peut également « relâcher » les mailles et permettre plus d'internalisation – pas forcément médiée par les clathrines d'ailleurs.

- La seconde hypothèse est qu'une autre kinase surcompense l'absence de MRCK α en phosphorylant d'autant plus MLC2 – on peut alors penser à ROCK1, également de la famille des DMPK (*Dystrophy Myotonic Protein Kinase*)²⁷⁶ comme MRCK α , et exprimée par les érythroblastes. Il a d'ailleurs été montré par Gabet et collaborateurs que ROCK1 est nécessaire à la différenciation terminale⁷⁹. Parmi les autres membres de la famille DMPK, ROCK2 est également exprimée et est donc un autre candidat potentiel ; MRCK β et MRCK γ ne sont quant à elles pas exprimées au cours de la différenciation terminale³⁰. Les anticorps anti-phospho-MLC2 commerciaux testés donnent des résultats très différents les uns des autres, et après concertation avec une autre équipe travaillant également sur ce domaine, nous avons conclu que ces anticorps n'étaient pas suffisamment efficaces pour déterminer s'il y a une différence dans le niveau de phosphorylation de MLC2. La recherche de nouveaux anticorps à tester est en cours.

- La dernière hypothèse est que MRCK α contrôle le recyclage, et non pas l'internalisation des récepteurs à la transferrine, *via* un autre mécanisme qui est pour l'instant inconnu. MLC2 ayant été également impliquée dans l'export de la protéine *Bile Salt Export Protein* dans des cellules rénales et hépatiques²⁶⁹, il est probable qu'elle soit impliquée dans le processus de recyclage de récepteurs puisqu'elle peut médier à la fois trafic antérograde^{42,269} et rétrograde²⁷⁰.

Contrairement aux récepteurs à la transferrine, EPOR est plus exprimé en surface en absence de MRCK α . EPOR interagit avec TFR2, et TFR2 lui sert de protéine escorte. En accord avec ce fait, la déprivation en EPO d'érythroblastes humains primaires a pour conséquence une présence accrue d'EPOR en surface, mais également une augmentation d'expression de TFR2 par

rapport à une condition non déprivée (*résultats non montrés*). TFR2 et EPOR semblent être exprimés de concert dans les précurseurs érythroïdes immatures. La divergence d'expression observée en l'absence de MRCK α sur ces récepteurs est d'autant plus intéressante. Une hypothèse pouvant expliquer cet effet est une tentative de compensation de l'expression en surface de TFR2 par l'érythroblaste ; en essayant d'exprimer plus de TFR2 en surface, une quantité plus importante d'EPOR présent dans le pool intracellulaire pourrait être acheminée à la surface en profitant de l'export de TFR2. En absence de MRCK α , ce TFR2 « supplémentaire » est de nouveau internalisé une fois qu'il a atteint la surface, tandis que l'EPOR est toujours présent à la membrane. En conséquence, à un temps t, on observe plus d'EPOR et moins de TFR2 dans les érythroblastes *knocked down* (**figure 21**).

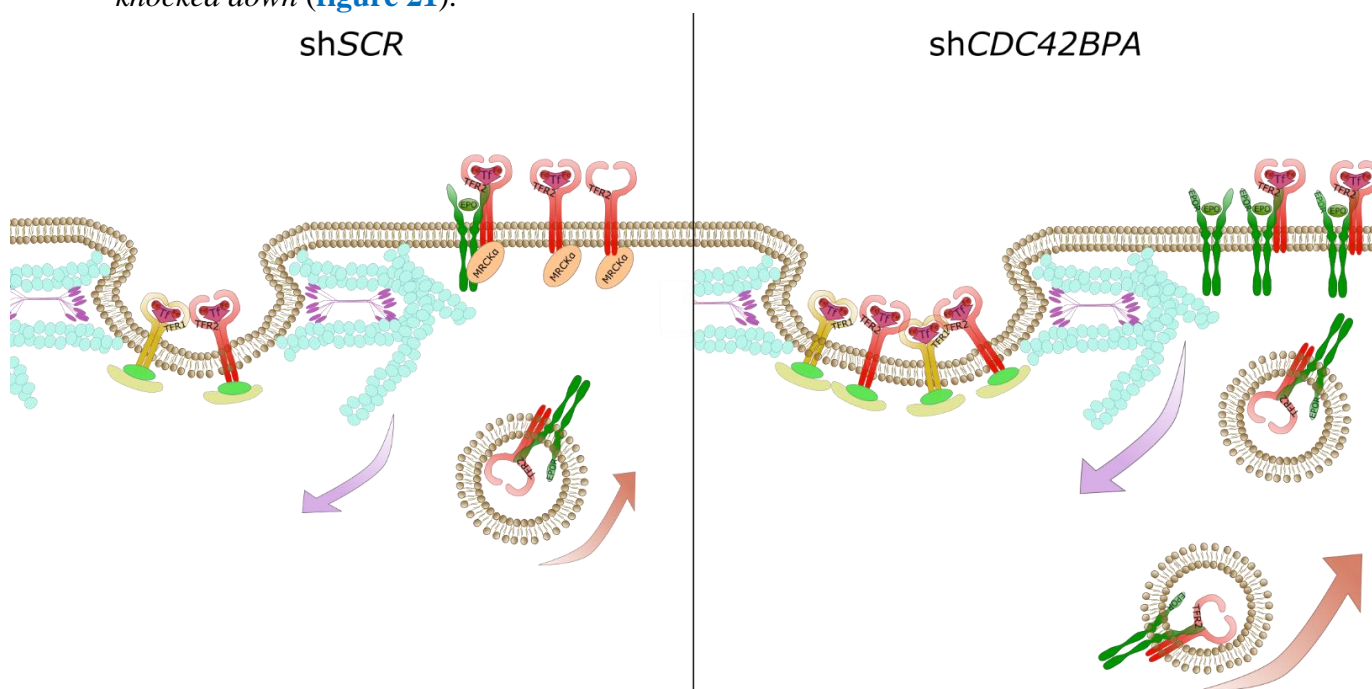


Figure 21 : Hypothèse quant à la surexpression d'EPOR observée en absence de MRCK α .

TFR2 (rouge) et EPOR (vert) s'associe dès le réticulum endoplasmique, et TFR2 facilite alors le transport d'EPOR à la membrane (flèche rouge). MRCK α (beige) s'associe à TFR2 et EPOR lorsqu'ils sont présents à la membrane. MRCK α inhibe l'internalisation et/ou le recyclage (flèche violette) de TFR2 et de TFR1 (jaune), potentiellement en favorisant la contraction de la *non muscle myosin II* (violet) aux abords de la membrane. Lorsque MRCK α est absent (shCDC42BPA), l'internalisation/recyclage de TFR2 et TFR1 est exacerbé. Il est probable que la cellule exporte alors plus de TFR2 à la surface. EPOR est alors emporté dans ces vésicules avec TFR2. Cependant, TFR2 est de nouveau internalisé à son arrivée en surface, alors qu'EPOR ne l'est pas. Filament bleu : actine. Ovale vert : protéine adaptatrice de type AP2, permettant l'endocytose. Croissant marron clair : clathrine. Dans ce schéma simplifié, TFR2 et TFR1 sont internalisés dans la même vésicule, ce n'est sûrement pas le cas dans la cellule.

Une autre hypothèse est que MRCK α régule bien l'internalisation/le recyclage d'EPOR mais par un autre mécanisme et/ou *via* d'autres partenaires.

Comme mentionné, MRCK α est de la famille des DMPK comme ROCK1 qui a été montrée par Gabet et collaborateurs comme impliqué dans la différenciation terminale. Elle est activée après clivage par la caspase 3⁷⁹. Gagliardi et collaborateurs ont montré que MRCK α pouvait être activée par clivage par les caspases dans les cellules épithéliales apoptotiques²⁷⁷. Le domaine kinase est alors libéré des domaines inhibiteurs ainsi que du domaine de localisation qui l'ancre à la membrane plasmique, et peut aller phosphoryler MYPT1 présent dans le cytoplasme (**figure 22**). Bien que ce contexte soit tout à fait différent, il serait intéressant de déterminer si l'activation constitutive des caspases au cours de la différenciation érythroïde pourrait activer MRCK α .

Pour des raisons de droits d'auteurs, cette figure a été retirée. Se référer à l'article :

MRCK α is activated by caspase cleavage to assemble an apical actin ring for epithelial cell extrusion, Gagliardi et al, J. Cell Biology, 2018. DOI: 10.1083/jcb.201703044

Figure 22 : MRCK α est clivable par les caspases.

Issues de Gagliardi et al., 2018, figure 3 et 10 respectivement²⁷⁷. Structure de MRCK α . Domaine kinase, **KD**. Domaine *coiled coil*, **CC**. Région conservée Protein kinase C, **C1**. Domaine *Pleckstrin homology-like*, **PH**. Domaine *Citron homology*, **CH**. Site d'interaction CDC42/Rac, **C**. Sites de coupure par les caspases : ciseaux rouges.

MRCK α est constituée de multiples domaines – un domaine kinase en N-terminal (vert), un domaine central (bleu) composé de trois domaines *coiled-coil* dont deux (**CC2** et **CC3**) ont un effet inhibiteur sur le domaine kinase, et un domaine C-terminal permettant l'ancrage à la membrane plasmique (rouge). Les caspases clivent MRCK α , ce qui mène à la séparation de ces trois domaines – le domaine kinase peut alors phosphoryler ses cibles MYPT1 et MLC2 dans le cytoplasme librement.

Nous identifions MRCK α comme nouveau partenaire de TFR2 et d'EPOR – l'an passé, Khalil et collaborateurs ont identifié la protéine *scaffold* SCRIBBLE comme partenaire de TFR2 et d'EPOR²²⁵. Dans leur modèle, en condition de faible saturation en transferrine, SCRIBBLE s'associerait à TFR2 pour l'accompagner au lysosome où ils seraient tous deux dégradés. SCRIBBLE ne serait alors plus disponible pour servir de protéine escorte pour EPOR dont l'expression serait alors réduite. Mes propres observations sur l'expression accrue de TFR2 en condition de déprivation d'EPO pourraient potentiellement s'accorder avec l'hypothèse de Khalil et collaborateurs, puisque l'export accru d'EPOR en surface pourrait recruter tout le SCRIBBLE disponible – ce qui n'en laisserait pas assez pour l'internalisation de TFR2 pour dégradation lysosomale. Ces résultats ne sont cependant pas conciliables avec les résultats que notre équipe avait montrés précédemment¹⁶⁷, puisque TFR2 servait directement de protéine escorte à EPOR, et l'aptitude à répondre à l'EPO des CFU-E murines *Tfr2*^{-/-} était diminuée (ce qui était bien en accord avec TFR2 et EPOR évoluant de concert). De plus, l'internalisation/recyclage de TFR2 accru en absence de MRCK α devrait hypothétiquement recruter tous les SCRIBBLE disponibles, ce qui devrait diminuer l'export d'EPOR – alors que j'observe une augmentation d'EPOR en surface. Nos modèles ne sont *a priori* pas conciliables dans les faits, ce qui suggère l'existence de mécanismes supplémentaires modulant nos observations respectives.

Notre équipe a montré précédemment que TFR2 était nécessaire pour une érythropoïèse humaine efficace¹⁶⁷, EPOR est le principal régulateur de l'érythropoïèse⁵⁷, et TFR1 est nécessaire à l'internalisation du fer pour la synthèse d'hémoglobine²³². Ces trois récepteurs étant des régulateurs de la différenciation terminale, nous nous sommes intéressés au rôle de MRCK α dans l'érythropoïèse.

Le *knockdown* de *CDC42BPA* dans les érythroblastes humains primaires a entraîné un retard de différenciation, illustré par une acquisition retardée de la glycophorine A, et un retard d'hémoglobinisat ion particulièrement visible lors de la transition érythroblaste basophile-1 – érythroblaste polychromatophile (J5). La morphologie des sh*CDC42BPA* en début de différenciation est également plus immature que celle des érythroblastes sh*SCR*. Cette différence morphologique est compensée au cours de la différenciation, potentiellement parce que la quantité de MRCK α nécessaire semble décroître avec la différenciation (cf. première figure du papier « *MRCK α is a new regulator of erythropoiesis* »). L'écart d'expression entre le contrôle et les

sh*CDC42BPA* s'atténue également, ce qui peut contribuer à l'absence de phénotype morphologique en fin de différenciation.

Pour pallier ce problème de kinase résiduelle toujours active, nous avons opté pour une invalidation du gène *Cdc42bpa* dans le modèle MEDEP, *via* la technologie CRISPR/CAS9. Le *knockout* dans les cellules MEDEP reproduit nos observations réalisées dans les érythroblastes humains primaires. L'initiation du processus d'hémoglobination dans les clones *Cdc42bpa*^{knockout} est retardé de 24h, et la coloration par MGG montre clairement que les cellules sont bloquées à un stade très immature (proérythroblaste, érythroblaste basophile), alors que les MEDEP WT sont déjà à un stade érythroblaste polychromatophile. L'analyse des marqueurs de surface CD71, Ter119, CD44 et CD117 montre également un retard très marqué. À la fin de leur différenciation, les cellules MEDEP atteignent le stade réticulocyte puis meurent assez rapidement (cela prend 60h à 72h dans les MEDEP WT). Nous avons voulu estimer combien de temps était nécessaire aux clones *Cdc42bpa*^{-/-} pour effectuer leur différenciation, et avons pu les conserver en culture jusqu'à 144h (*résultats non montrés*).

Cette persistance en culture explique la tendance que l'on observe à la prolifération accrue dans les érythroblastes humains *knockdown* pour *CDC42BPA* et dans les MEDEP *Cdc42bpa*^{-/-}. En effet, des tests utilisant le colorant UptiBlue (marquant les cellules viables) effectués sur les sous-clones UT-7 sh*CDC42BPA* et leurs contrôles en présence de doses croissantes d'EPO nous ont permis d'écarter la possibilité que la prolifération soit plus élevée. Les UT-7/EPO ne différenciant pas, le fait que leur prolifération ne soit pas accrue en absence de MRCK α suggère que cette tendance est dû au maintien des modèles qui se différencient à un stade plus immature. Les érythroblastes proliférant plus à ces stades qu'aux stades précurseurs matures, cela augmente la prolifération globale.

L'absence de diminution de taille cellulaire observée dans les MEDEP *Cdc42bpa*^{-/-}, ainsi que la condensation diminuée des noyaux, et l'inhibition de la division cellulaire observée dans les UT-7 incubées avec le BDP5290 (inhibiteur spécifique de MRCK α) suggèrent des défauts de remodelage du cytosquelette dont MRCK α est un régulateur *via* la NMMII. La NMMII participe d'ailleurs à la maturation du réticulocyte⁴², et a été montrée récemment comme régulateur de la courbure du globule rouge⁴⁸. Comme expliqué dans l'introduction, les changements morphologiques au cours de la différenciation terminale sont légions, et la mise en place du

cytosquelette spécifique du globule rouge contrôlant entre autres sa déformabilité est primordiale. La déformabilité des réticulocytes augmente avec leur maturation en globules rouges¹³. De plus, des expériences préliminaires effectuées dans notre équipe montrent que la déformabilité des érythroblastes augmente entre les stades érythroblastes acidophiles et réticulocyte (*résultats non montrés*). Le consensus actuel est que le cytosquelette se met en place lors de la maturation du réticulocyte, mais ces données tendent à indiquer que la mise en place du cytosquelette commence plus tôt dans la différenciation terminale. MRCK α contrôlant la myosine, la possibilité que MRCK α régule les propriétés mécaniques de la membrane des érythroblastes sera exploré. Pour répondre à cette problématique, nous envisageons de tester l'élasticité, et la déformabilité de la membrane *via* ektacytométrie, tests de microfluidique, et évaluation des fluctuations thermiques par spectrométrie. La quantité des protéines majeures de la membrane ainsi que leur phosphorylation seront également évaluées par western blot.

Finalement, le remodelage de la membrane se faisant conjointement avec la différenciation, nous pouvons émettre l'hypothèse que le retard de différenciation observé dans les cellules MEDEP (plus drastique, dû à une absence totale de Mrck α) pourrait en partie être imputé au retard de remodelage du cytosquelette. En effet, le cytosquelette spécifique des globules rouges étant indispensable à leur fonction, il est possible que le retard de sa mise en place puisse également retarder la différenciation dans son ensemble.

Nos travaux laissent entrevoir l'existence d'un nouveau mécanisme de régulation de l'érythropoïèse basé sur le contrôle coordonné du trafic des récepteurs. L'érythropoïèse est caractérisée par une différenciation progressive associée aux divisions cellulaires, avec une évolution coordonnée des différents remodelages – structurel avec la membrane, transcriptionnel avec des changements majeurs de l'expression génique, et protéique avec une modulation post-transcriptionnelle pouvant être dépendante du fer et de l'hypoxie qui sont des régulateurs clefs de l'érythropoïèse. L'expression successive de récepteurs spécifiques à des stades de différenciation donnés a été bien décrite dans l'érythropoïèse ; avec par exemple, la dépendance séquentielle des progéniteurs au SCF, puis au SCF et à l'EPO, puis à l'EPO seule. Que l'expression des récepteurs à la surface puisse être régulée de façon coordonnée non pas transcriptionnellement ou post-traductionnellement, mais en régulant leur trafic intracellulaire selon les stimuli externes à la cellule ajoute un nouveau niveau de modulation de l'érythropoïèse.

3. Résultats, seconde partie : TFR2 contrôle le stress oxydatif dans les érythroblastes via la FPN au cours de la différenciation terminale

A. Contexte

Afin d'établir la signalisation en aval de TFR2, caractériser les gènes sous son contrôle est nécessaire. Le gène *HAMP* est connu comme cible de la signalisation en aval du TFR2 hépatique¹⁵³ ; et nos précédents travaux ont montré que l'expression de GDF15 au cours de l'érythropoïèse est dépendante de la présence du TFR2 érythroïde¹⁶⁷. Ces derniers ne nous ont cependant pas permis d'identifier la signalisation en aval de TFR2. Du fait que cette signalisation ne soit pas caractérisée, les mécanismes permettant à TFR2 de réguler l'érythropoïèse demeurent inconnus. Nous avons donc tenté d'identifier d'autres gènes cibles pour comprendre cette régulation.

B. Matériel & Méthodes

Les éléments du matériel et méthodes non présentés dans ce paragraphe sont détaillés dans le *Materials and Methods* de l'article « *MRCKα is a new regulator of erythropoiesis* ».

Détermination du stress oxydatif

Pour l'évaluation du stress oxydatif, les érythroblastes humains primaires basophiles, polychromatophiles et acidophiles ont été incubés 4h30 avec ou sans FeNTA. Ils ont ensuite été incubés pendant 30 min à 37 °C, 5% CO₂ à l'obscurité avec 2mM de dihydroéthidium (DHE) (SIGMA-Aldrich). L'analyse des échantillons par cytométrie en flux a été réalisée sur un BD Accuri C6.

Séquences des guides pour les approches CRISPR/CAS9 et shRNA

Concernant les cellules MEDEP, les séquences utilisées pour les ARN guides sont : "TTCTAGGATCCTTAG" et "TAGCAAACCTACCTGACCTCA", ciblant la jonction intron/exon 2 sur le brin anti-sens, et la séquence "TGTTTAAGGGGGATCGGATG" qui cible la jonction intron/exon 3 sur le brin sens.

Concernant l'infection des érythroblastes, les vecteurs lentiviraux utilisés ont été achetés chez Dharmacon.

sh*SLC40A1*-#1 : V3SH11240-228783139(CATTAGATGAGTTCCCTCC)

shSLC40A1-#2 : V3SH11240-227506468 (AATATGTTGCCCATCTGA)

Extraction d'ARN et RT-qPCR

Pour les préparations d'ARN, les cellules ont été lysées en Tri-zol (Invitrogen), et l'ARN a été extrait avec du chloroforme. Les lavages ont été effectués en éthanol 75%, et la quantité et pureté des échantillons obtenus ont été évalués par mesure spectrophotométrique (Nanodrop™). La transcription inverse a été faite avec le kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit acheté chez Thermofisher scientific. La quantité relative des ARN a été évaluée par PCR quantitative avec le kit SensiFAST SYBR No-ROX Kit acheté chez Bioline. Les amorces utilisées lors de cette étude sont les suivantes ([Table 2](#)) :

Amorces de qPCR			
Gene	Sens / Antisens	Séquence (5'→3')	Taille de l'amplicon
<i>B2M</i>	Sens	GAG TAT GCC TGC CGT GTG	110
	Antisens	AAT CCA AAT GCG GCA TCT	
<i>ACTINE</i>	Sens	TCC CTG GAG AAG AGC TAC GA	194
	Antisens	AGC ACT GTG TTG GCG TAC A	
<i>UBC</i>	Sens	ATT TGG GTC GCA GTT CTT	133
	Antisens	TGC CTT GAC ATT CTC GAT GGT	
<i>FPN_{TOT}</i>	Sens	TTG CAG GCG TCA TTG CTG CTA	120
	Antisens	TGG AGT TCT GTA CAC CAT TTA T	
<i>FPN_{IRE}</i>	Sens	CAA ACC GCT TCC ATA AGG CTT TGC	234
	Antisens	TTC TGC GGC TGC TAT CGC TG	
<i>FPN_{NI}</i>	Sens	GGT GTG GCA TCT GGT TGG AGT TTC	296
	Antisens	CCA CAT CCG ATC TCC CCA AGT AG	
<i>TFR2</i>	Sens	GGA GTG GCT AGA GGG CTA CCT CA	103
	Antisens	GGT CTT GGC ATG AAA CTT GTC	
<i>FTH1</i>	Sens	AGG TGC GCC AGA ACT ACC AC	121
	Antisens	GCC ACA TCA TCG CGG TCA A	
<i>FTL</i>	Sens	AAC CAA CCA TGA GCT CCC AG	149
	Antisens	GCC TTC CAG AGC CAC ATC AT	
<i>GDF15</i>	Sens	GCA CTC CGA AGA CTC CAG ATT C	143
	Antisens	GCA CTT CTG GCG TGA GTA TC	

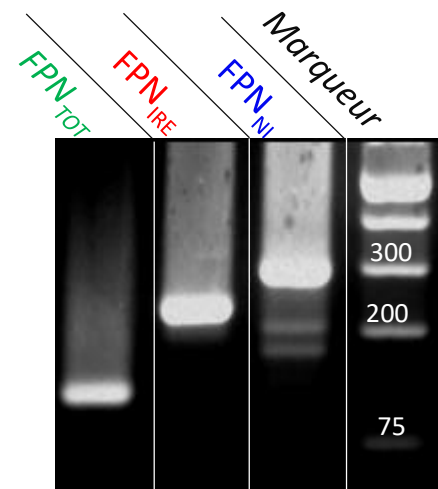


Table 2 : Séquences des amorces utilisées en PCR quantitative.

L'efficacité d'amplification de chaque couple d'amorces a été testée, et trouvée supérieure à 1.99. La pureté de l'amplicon a été évaluée *via* les courbes de fusion et sur gel (droite). La taille des amplicons a également été confirmée de cette façon. Les bandes surnuméraires dans la piste FPN_{NI} correspondent à la population III, minoritaire.

C. Résultats

Afin d'identifier les gènes cibles de TFR2, une expérience préliminaire consistant en l'étude du transcriptome (par *microarray*) de cellules UT-7/EPO et de cellules K562 *knockdown TFR2* ou non a été réalisée. Pour cela, les ARN de ces cellules ont été extraits, et analysés sur une puce *Affymetrix human gene 2.0 ST*. Pour l'analyse, les conditions *knockdown (KD)* des deux lignées ont été analysées ensemble *versus* les conditions contrôles. Les gènes cibles de TFR2 ont été identifiés en excluant les gènes dont les amplitudes de variation (*Fold Changes*) étaient inférieures à 1.5, ou dont les variations étaient anti-corrélées dans les deux lignées (*i.e.* dont l'expression dans la condition KD était augmentée dans une des lignées, et diminuée dans l'autre). Après ces filtres, les analyses montrent dans la condition KD **63 gènes dont l'expression est augmentée** et **76 gènes dont l'expression est diminuée** par rapport à la condition contrôle. Parmi ces derniers, on retrouve *TFR2*, confirmant que le KD a été efficace dans les deux lignées. Une analyse par priorisation a permis d'identifier au sein des 10 gènes les plus dérégulés (**table 3**) *SLC40A1* qui encode la FERROPORTINE (**FPN**). Nous nous sommes particulièrement intéressés à ce gène, du fait de son rôle dans le métabolisme du fer.

Gene	Description	Knockdown / Control
<i>TFR2</i>	Transferrin receptor protein 2	↓
<i>SLC40A1</i>	Solute carrier family 40 member 1 (Ferroportine)	↑
<i>TYRO3</i>	Tyrosine-protein kinase receptor TYRO3 precursor	↓
<i>FOLR1</i>	Folate receptor alpha precursor	↑
<i>TPO</i>	Thyroid peroxidase precursor	↓
<i>ZC3H12C</i>	Zinc finger CCCH-type-containing protein 12C	↑
<i>THBS1</i>	Thrombospondin-1 precursor	↑
<i>SELENBP1</i>	Selenium-binding protein 1	↑
<i>NPEPPS</i>	Puromycin-sensitive aminopeptidase	↑
<i>RARG</i>	Retinoic acid receptor gamma-1	↓

Table 3 : Principaux gènes différentiellement exprimés lors de l'analyse du transcriptome

Après obtention d'UT-7 et de K562 knocked down pour *TFR2*, les ARN ont été extraits, rétrotranscrits puis analysés par *microarray*. Après analyse de priorisation, les 10 principaux gènes dont l'expression est dérégulée dans les cellules *TFR2*^{Knockdown} sont listés. En première position, *TFR2* ; en seconde, *SLC40A1*, encodant la ferroportine. Flèche bleue : gène down-régulé dans le knockdown. Flèche rouge : gène up-régulé dans le knockdown.

Comme expliqué dans l'introduction, *SLC40A1* génère différentes populations d'ARNm, contenant ou non un *Iron Responsive Element (IRE)*, grâce à trois promoteurs alternatifs (**figure**

15). L'hypothèse la plus simple pour la régulation de *SLC40A1* par TFR2 étant que la signalisation en aval de TFR2 exerce un contrôle transcriptionnel sur ce gène, nous pouvons dans un premier temps nous demander si toutes les populations d'ARNm *SLC40A1* sont affectées par TFR2.

Pour répondre à cette question, j'ai dans un premier temps élaboré des amorces spécifiques des différentes populations (cf. [IV.4.B. Matériels & Méthodes](#)). Mes tests préliminaires semblent indiquer que la population III est exprimée de façon minimale dans les érythroblastes (*résultats non montrés*). J'ai donc considéré deux populations : la population contenant un IRE correspondant au type I, et la population sans IRE constituée principalement de la population II. J'ai ensuite caractérisé l'évolution de ces différentes populations au cours de la différenciation érythroïde humaine en prélevant des échantillons d'ARN à différents stades. Ceux-ci furent extraits avant d'être rétro-transcrits en ADN complémentaires après vérification de leur qualité par mesure d'absorbance (NanodropTM), puis analysés par PCR quantitative (**qPCR**).

Au cours de la différenciation terminale, la population d'ARNm de *SLC40A1* contenant un IRE (FPN_{IRE}) augmente progressivement (facteur 6, [figure 23](#)). La population ne contenant pas d'IRE (FPN_{NI}) est relativement constante, ne diminuant que d'un facteur deux entre le début et la fin de la différenciation. Il est intéressant de noter que si l'on considère les ARNm de *SLC40A1* dans leur totalité (FPN_{TOTAL}), ceux-ci sont en quantité relativement constante tout au long de la différenciation – ainsi en début de différenciation, les ARNm FPN_{NI} sont prépondérants, tandis qu'en fin de différenciation, ce sont les ARNm FPN_{IRE} qui sont majoritaires. Les variations observées de FPN_{TOTAL} sont en accord avec l'analyse transcriptomique réalisée par l'équipe de Narla Mohandas⁸⁹.

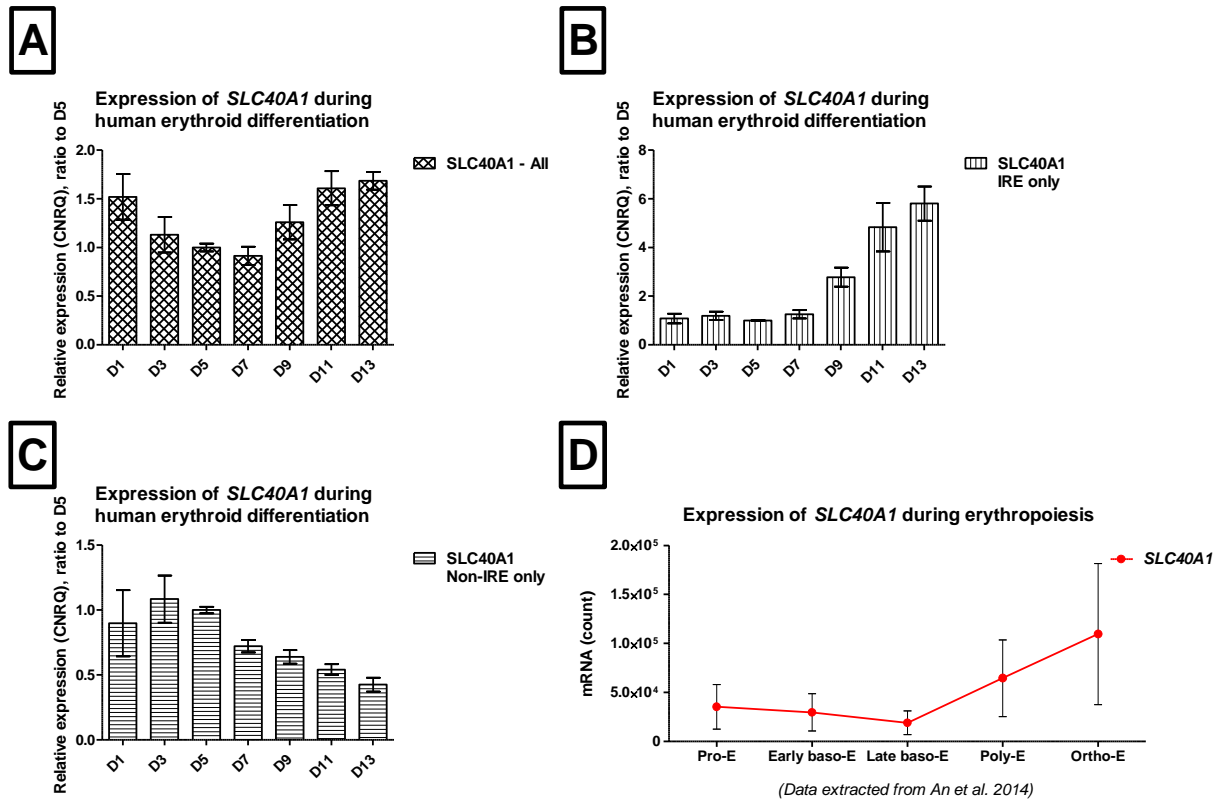


Figure 23 : Expression des différentes populations de *SLC40A1* au cours de la différenciation humaine. La quantité relative d'ARNm *SLC40A1* contenant un IRE (*IRE only*, B) et de ceux n'en contenant pas (*Non-IRE only*, C), ainsi que celle de tous les ARNm encodant la FPN (A) a été mesurée dans les érythroblastes humains primaires par PCR quantitative. A) Une légère baisse d'expression au niveau ARNm est observée au stade basophile-2 (équivalent D5) dans nos culture (haut, gauche) ainsi que par analyse transcriptomique (D ; extrait de An et al., 2014⁸⁹). B) La population contenant un IRE augmente au cours de la différenciation, tandis que celle n'en contenant pas diminue (C). Les barres d'erreur des Qpcr (A, B, C) représentent la *standard error of the mean (SEM)*, celles de l'analyse transcriptomique (D) la *standard deviation*. **Pro-E** : Proérythroblaste. **Early baso-E** : Érythroblaste basophile-1. **Late baso-E** : Érythroblaste basophile-2. **Poly-E** : Érythroblaste polychromatophile. **Ortho-E** : Érythroblaste acidophile.

Pour étudier l'effet de l'inactivation de *TFR2* sur la régulation de *SLC40A1*, j'ai ensuite réalisé des *knockdowns* de *TFR2* dans les lignées érythroleucémiques humaines UT-7 et K562 avec différents shRNA ciblant *TFR2*. L'expression de *SLC40A1* a ensuite été quantifiée dans des populations sous-clonales établies après *knockdown*. L'effet observé sur la transcription de *SLC40A1* dans ces clones est variable et minime, et non-corrélé à l'efficacité du *knockdown* de *TFR2* (figure 24).

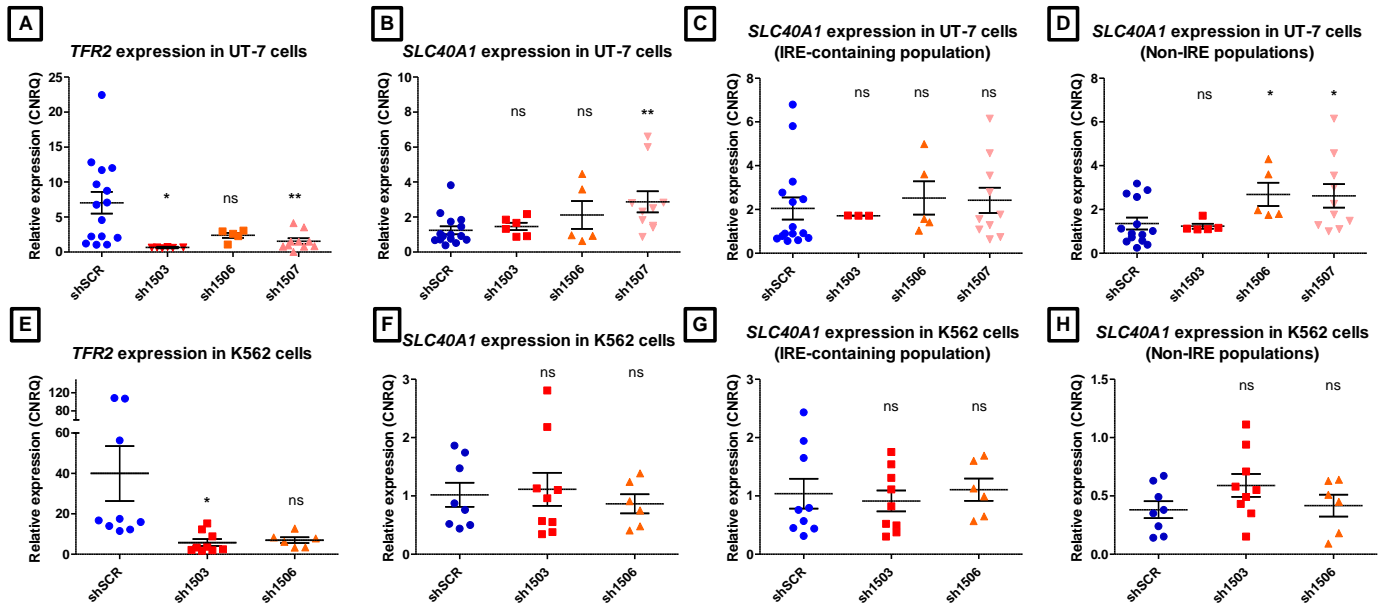


Figure 24 : Effet du *knockdown* de *TFR2* sur les transcrits de *SLC40A1* dans les lignées érythroleucémiques.

La quantité relative d'ARNm de *TFR2*, et des différentes populations de *SLC40A1* a été mesurée dans les UT-7 (haut, A-D) et dans les K562 (bas, E-H). Les numéros 1503, 1506 et 1507 correspondent à différentes séquences de shRNA ciblant toutes *TFR2*. Le *knockdown* de *TFR2* est efficace dans les deux lignées (A, E). Toutes les populations d'ARNm encodant *SLC40A1* sont mesurées dans le second panel (B, F), la population contenant spécifiquement un IRE (*IRE-containing population*) dans le troisième (C, G), et les populations dénuées d'IRE (*Non-IRE populations*) dans le quatrième panel (D, H). ShRNA contrôle en bleu, shTFR2 en rouge, orange et rose selon le shRNA utilisé. Les barres d'erreurs représentent la *standard error of the mean*. Test statistique : t-test. ns : non significatif. * p-value ≤ 0.05 . ** p-value ≤ 0.01 .

Par la suite, j'ai réalisé le *knockdown* de *TFR2* dans les érythroblastes humains primaires, au stade proérythroblaste. Ce *knockdown* est efficace jusqu'à la fin de la différenciation, comme le montre le manque de transcription de *GDF15* (figure 25) que mon équipe a démontré comme étant sous le contrôle de *TFR2* dans les érythroblastes humains¹⁶⁷. Une augmentation significative de la transcription de *SLC40A1* est alors observée par qPCR aux stades érythroblaste basophile et érythroblaste polychromatophile. Si on considère séparément les populations d'ARNm contenant un IRE et celles qui n'en contiennent pas, on retrouve une augmentation de la transcription à ces stades. Cependant, l'augmentation d'expression n'est pas la même dans les différentes populations : la transcription de l'ARNm canonique (*IRE-containing*) est augmentée de 4 fois au

stade basophile et de 10 fois au stade polychromatophile ; tandis que celle des populations sans IRE (*Non-IRE*) n'est augmentée que de 2 fois pour chaque stade.

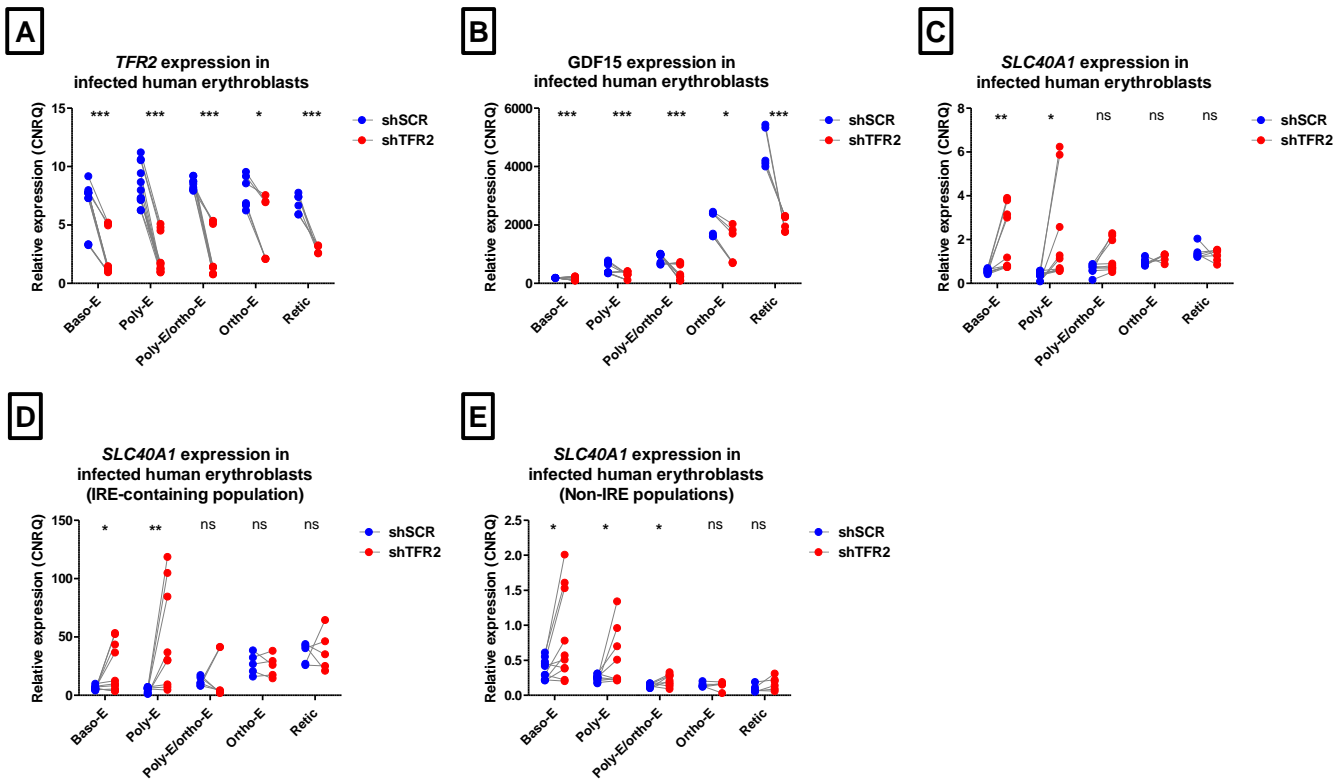


Figure 25 : Effet du *knockdown* de *TFR2* sur les transcrits de *SLC40A1* dans les érythroblastes humains primaires.

La quantité relative d'ARNm de *TFR2* (A), *GDF15* (B) et des différentes populations de *SLC40A1* (Total : C ; avec IRE : D ; sans IRE : E) a été mesurée dans les érythroblastes humains primaires lors de la différenciation terminale. shRNA contrôle en bleu, shTFR2 en rouge. Pour chaque expérience, le contrôle et le knockdown sont reliés en gris. Les barres d'erreurs représentent la *standard error of the mean*. Test statistique : t-test. ns : non significatif. * p-value \leq 0.05. ** p-value \leq 0.01, *** p-value \leq 0.001. **Baso-E** : Érythroblaste basophile. **Poly-E** : Érythroblaste polychromatophile. **Ortho-E** : Érythroblaste acidophile. **Retic** : Réticulocyte.

La confirmation de l'augmentation d'expression de FPN au niveau protéique n'a pas pu être faite car aucun anticorps commerciaux testé ne reconnaît la FPN humaine²⁷⁸. Grâce à l'analyse protéomique réalisée par mon équipe, il est possible d'observer la présence de la FPN tout au long de la différenciation érythroïde humaine (figure 26)^{30,49}. La quantité de FPN est du même ordre de grandeur que celle de TFR2 (bleu) lors de la différenciation terminale. Il est intéressant de noter l'importante quantité de FPN (rouge) aux stades réticulocyte (Retic) et globule rouge (RBC). Comme mentionné dans l'introduction (II.4. La ferroportine – acteur majeur du métabolisme du

fer), la présence de la FPN au stade globule rouge pourrait participer à la détoxification de ROS induis par la méthémoglobine (I.2.B.d.ii. Globule rouge et oxydation).

On observe de plus la dégradation de la chaîne légère des ferritines (FTL, orange) entre les stades érythroblaste acidophile (Ortho-E) et réticulocyte, et de la chaîne lourde (FTH1, vert) au cours de la maturation du réticulocyte. L'étude réalisée par mon équipe sur la ségrégation préférentielle des protéines entre le pyrénocyte et le réticulocyte permet d'exclure la possibilité que la ferritine ait été extrudée avec le noyau³⁰ – suggérant sa dégradation par le lysosome au sein du réticulocyte. Une cage de ferritine contenant jusqu'à 4 500 atomes de fer, et le relargage d'ions ferriques dans le cytoplasme pouvant participer à la génération de ROS, la présence de la FPN à ce stade pourrait permettre de limiter le stress oxydant.

Finalement, si l'on s'attarde sur le début de la différenciation terminale, on peut observer que le niveau de ferritine déjà présentes à ces stades est élevé, ce qui sous-entend que la cellule érythroïde possède déjà la capacité d'emmagasiner d'importantes quantité de fer. La présence simultanée de la FPN pourrait permettre la gestion de l'afflux majeur de fer *via* l'internalisation de complexes Holo-Tf-TFR1, nécessaire à la synthèse d'hémoglobine.

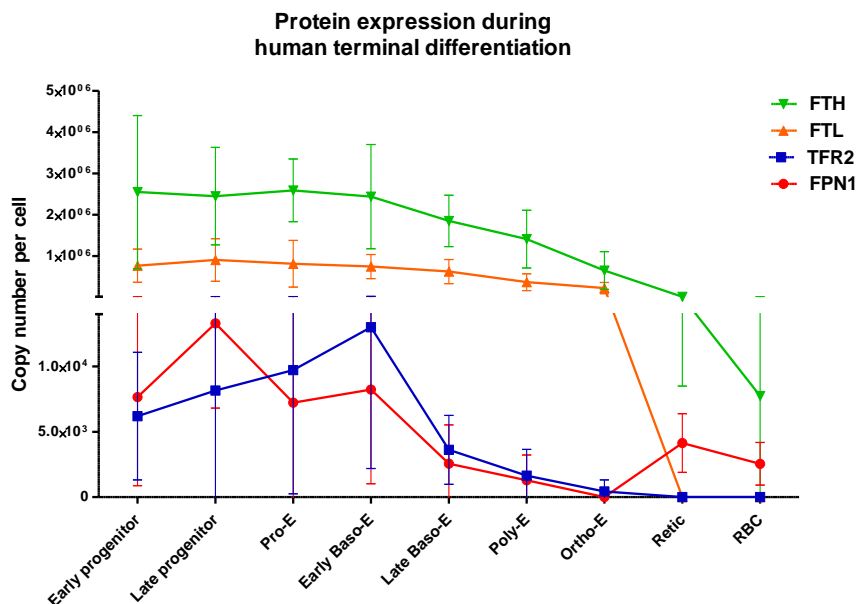


Figure 26 : Expression de TFR2, FPN, et des ferritines au cours de la différenciation érythroïde humaine.

Extrait de Gautier et al., 2016³⁰ et Gautier et al., 2018⁴⁹. Chaîne lourde des ferritines FTH en vert, chaîne légère FTL en orange, TFR2 en bleu, FPN en rouge. Les barres d'erreurs représentent la *standard deviation*. **Early progenitor** : BFU-E. **Late progenitor** : CFU-E. **Pro-E**: proérythroblaste. **Early Baso-E** : Érythroblaste basophile-1. **Late Baso-E** :

Érythroblaste basophile-2. **Poly-E** : Érythroblaste polychromatophile. **Ortho-E** : Érythroblaste acidophile. **Retic** : Réticulocyte. RBC : Globule rouge.

L'augmentation d'expression de *SLC40A1* en absence de TFR2 pouvant induire une déprivation martiale en augmentant l'export de fer, j'ai par la suite regardé l'effet du *knockdown* de *TFR2* sur les chaînes de ferritines.

Au niveau ARNm, une très faible augmentation de la transcription de *FTL* est observée aux stades proérythroblaste, et érythroblaste basophile (**figure 27B**), tandis qu'une diminution de deux fois de la transcription de *FTH1* est observée à ces mêmes stades (**figure 27A**). Au niveau protéique, une faible diminution non significative de FTH1 est présente au stade proérythroblaste (**figure 27C**). Cette tendance n'est pas retrouvée aux autres stades de différenciation. FTL ne semble pas varier avec le *knockdown* de *TFR2* (**figure 27D**). Les variations de ferritines observées avec les shTFR2 sont faibles à inexistantes.

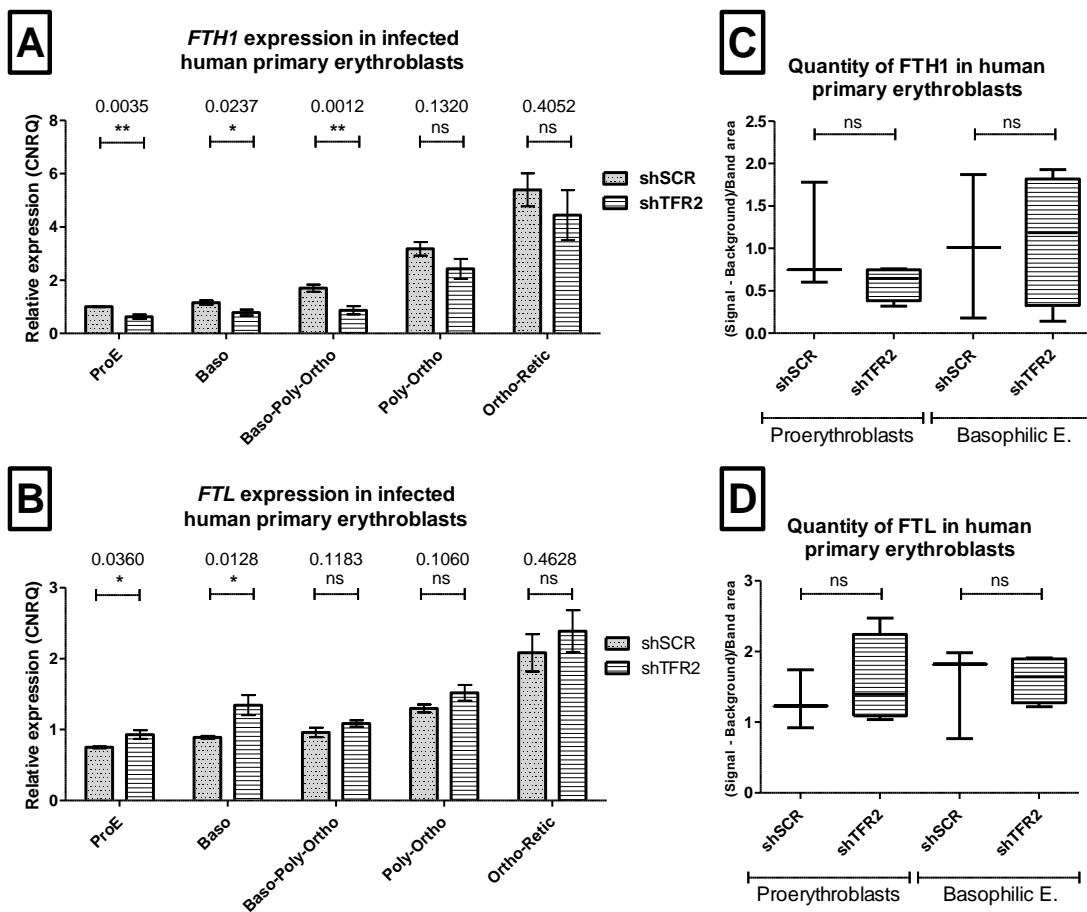


Figure 27 : Expression de FTH1 et FTL dans les érythroblastes humains primaires.

La quantité relative d'ARNm de *FTH1* (A) et *FTL* (B), ainsi que leur quantité au niveau protéique (C et D) ont été mesurées dans les érythroblastes humains primaires lors de la différenciation terminale. shRNA contrôle en gris

pointillé, shTFR2 en blanc rayé. Les barres d'erreurs représentent la *standard error of the mean*. Test statistique : t-test. ns : non significatif. * p-value ≤ 0.05 . ** p-value ≤ 0.01 . **ProE**: proérythroblaste. **Baso** : Érythroblaste basophile. **Poly** : Érythroblaste polychromatophile. **Ortho** : Érythroblaste acidophile. **Retic** : Réticulocyte.

Pour essayer d'établir un rôle physiologique de l'augmentation de FPN en absence ou faible présence de TFR2, j'ai par la suite réalisé un knockdown de *SLC40A1* dans les érythroblastes humains primaires, ainsi qu'un *knockout* de *Slc40a1* dans la lignée érythroïde murine MEDEP.

Les shRNA *SLC40A1*-#1 et *SLC40A1*-#2 entraînent une diminution d'expression de *SLC40A1* de 2 fois en moyenne (figure 28), répercutée sur l'ensemble des populations (IRE et Non-IRE, figure 28). Ce knockdown demeure efficace jusqu'au stade érythroblaste acidophile, où la pression exercée par le shRNA s'amenuise, en particulier sur la population contenant des IRE – dont la transcription augmente avec la différenciation dans les conditions physiologiques.

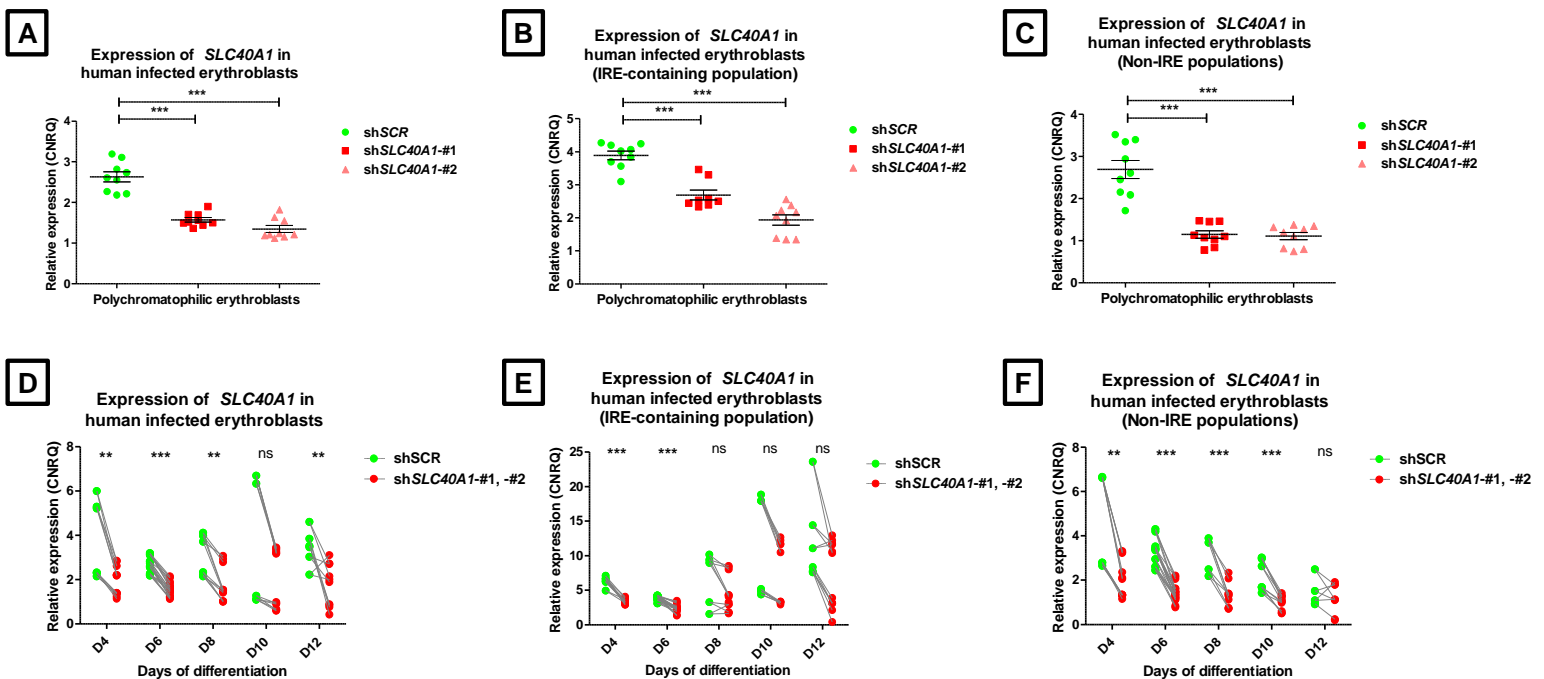


Figure 28 : Knockdown de *SLC40A1* dans les érythroblastes humains primaires.

La quantité relative d'ARNm des différentes populations de *SLC40A1* a été mesurée dans les érythroblastes humains après knockdown de *SLC40A1*. *SLC40A1* Total : A et D ; avec IRE : B et E ; sans IRE : C et F. Haut (A-C) : efficacité de knockdown de chaque shRNA au stade érythroblaste polychromatophile. shRNA contrôle en vert, *shSLC40A1*-#1 en rouge, *shSLC40A1*-#2 en rouge pâle. Bas (D-F) : Efficacité du knock-down pour tous les stades de différenciation, tous shRNA ciblant *SLC40A1* confondu (rouge). Pour chaque expérience, le contrôle et le knockdown sont relié en gris. Les barres d'erreurs représentent la *standard error of the mean*. Test statistique : t-test. ns : non significatif. * p-value ≤ 0.05 . ** p-value ≤ 0.01 , *** p-value ≤ 0.001 .

Le *knockdown* de *SLC40A1* dans les érythroblastes humains primaires n'affecte ni la survie, ni la prolifération des érythroblastes. De même, l'hémoglobinisaiton ne semble ni retardée, ni accélérée (**figure 29**).

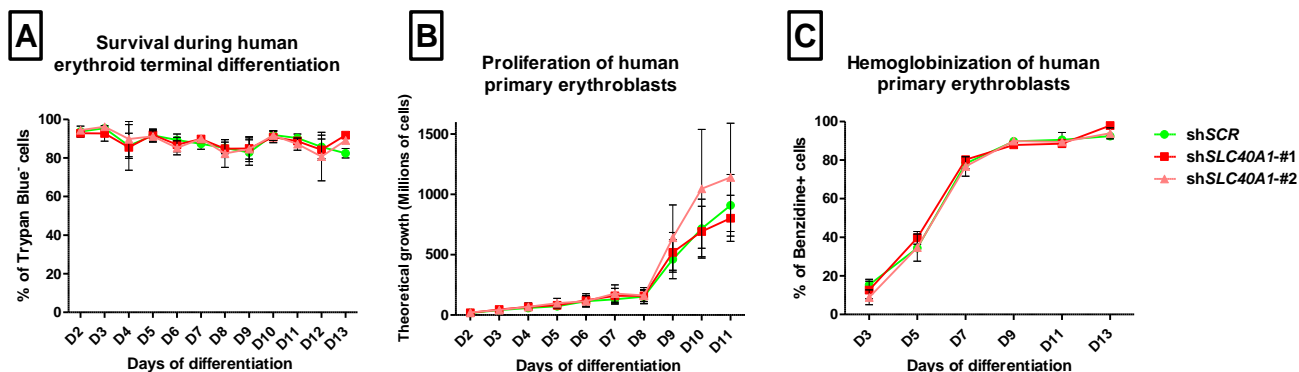
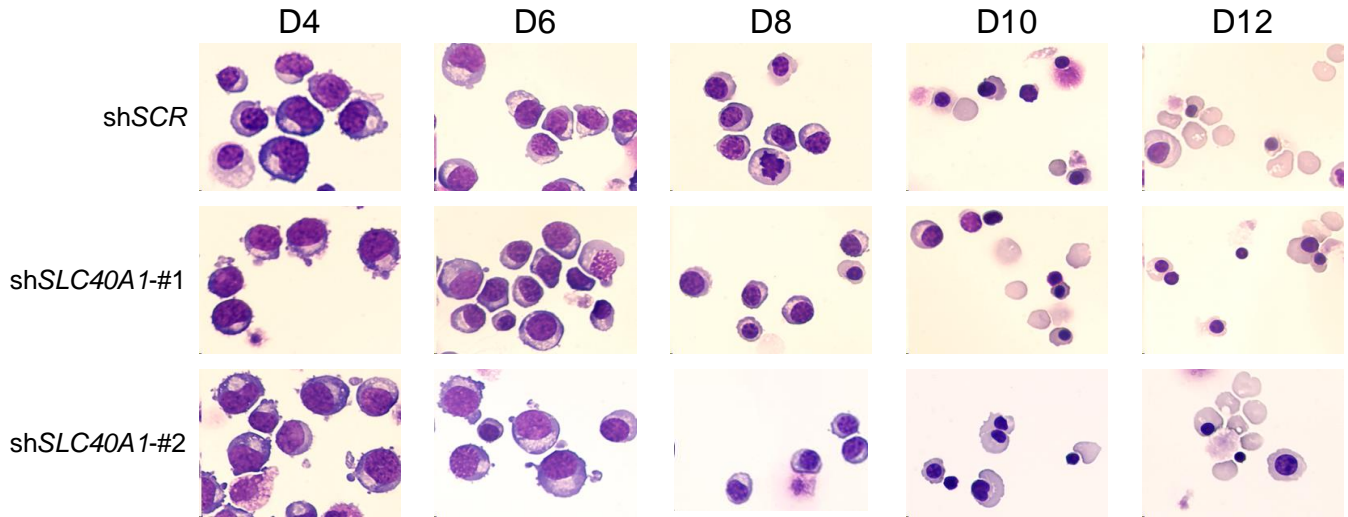


Figure 29 : Effet du *knockdown* de *SLC40A1* sur les érythroblastes humains primaires.

A) La survie des érythroblastes shSCR (vert), *shSLC40A1*-#1 (rouge) et *shSLC40A1*-#2 (rouge pâle) a été mesurée par exclusion au bleu Trypan. B) Leur prolifération théorique a été calculée à partir des facteurs de croissance entre deux comptages et C) leur pourcentage d'hémoglobinisaiton a été calculé par coloration à la benzidine. Les barres d'erreurs représentent la *standard error of the mean*. Test statistique : 2-way ANOVA, non significative pour la variable shRNA pour les trois graphiques.

D'un point de vue morphologique, un léger retard a parfois été observé en tout début de différenciation avec les shRNA ciblant *SLC40A1*, mais cela n'était pas systématique (**figure 30**). De plus, lors du reste de la différenciation, ce léger retard n'était retrouvé qu'avec le *shSLC40A1*-#2. D'autres comptages sont en cours.



Morphological analysis of human primary erythroblasts

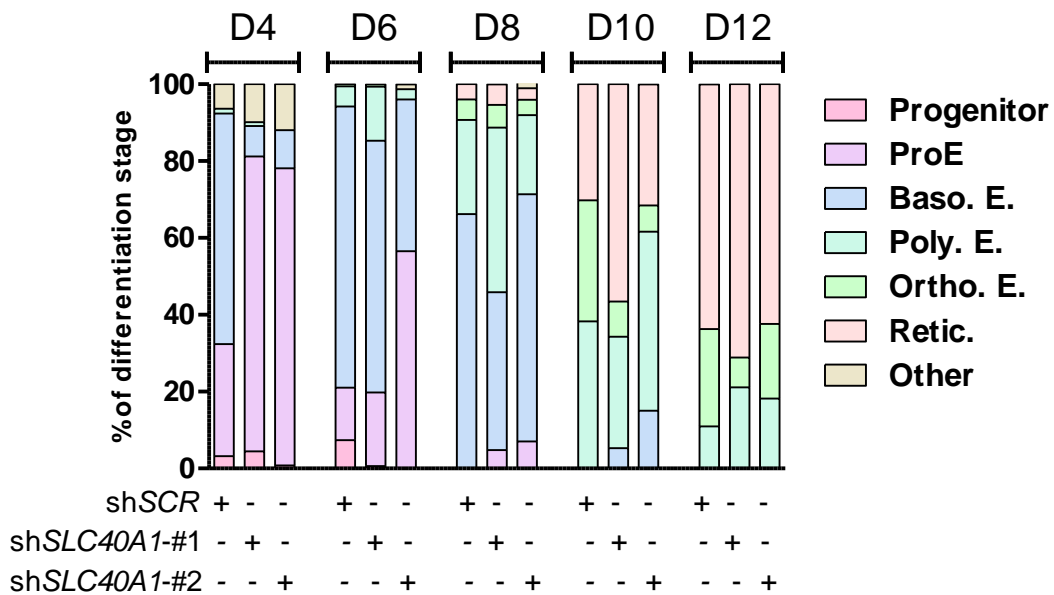


Figure 30 : Morphologie des érythroblastes humains primaires *knockdown SLC40A1* au cours de la différenciation.

Tous les deux jours, des érythroblastes ont été prélevés, mis sur lame, et colorés par coloration MGG. Les photos ont été prises avec un microscope EVOS. Haut : champs représentatifs. Le shRNA utilisé est indiqué sur la gauche, les jours de prélèvement en haut. Bas : Proportion des différents stades de différenciation pour l'expérience correspondante. **ProE** : proérythroblaste. **Baso. E.** : érythroblaste basophile. **Poly. E.** : érythroblaste polychromatophile. **Ortho. E.** : érythroblaste acidophile. **Retic.** : réticulocyte. **Other** : autres types cellulaires (monocytaire, granulocytaire, ...).

Le suivi des marqueurs de cytométrie en flux permet d'estimer les proportions des différents stades de différenciation au sein de nos populations. Lors de la différenciation, la Bande3 est acquérite, tandis que l'Intégrine $\alpha 4$ est perdue. Ainsi, la population Bande3^{neg-low} Intégrine $\alpha 4$ ^{high} correspond aux précurseurs immatures, tandis que la population Bande3^{high}, Intégrine $\alpha 4$ ^{med-low} correspond aux précurseurs matures. Le suivi de ces marqueurs ne nous a pas permis de conclure sur un effet de l'absence de FPN sur la différenciation. Une légère accélération a parfois été observée, telle que dans cette expérience où après 10 jours de culture, la population mature représente 61.3% des érythroblastes dans la condition shSLC40A1-#1 contre 47.6% dans la condition contrôle (**figure 31**). Cependant, ces différences sont faibles et pas systématiquement retrouvées avec les deux shRNA et d'une expérience à l'autre.

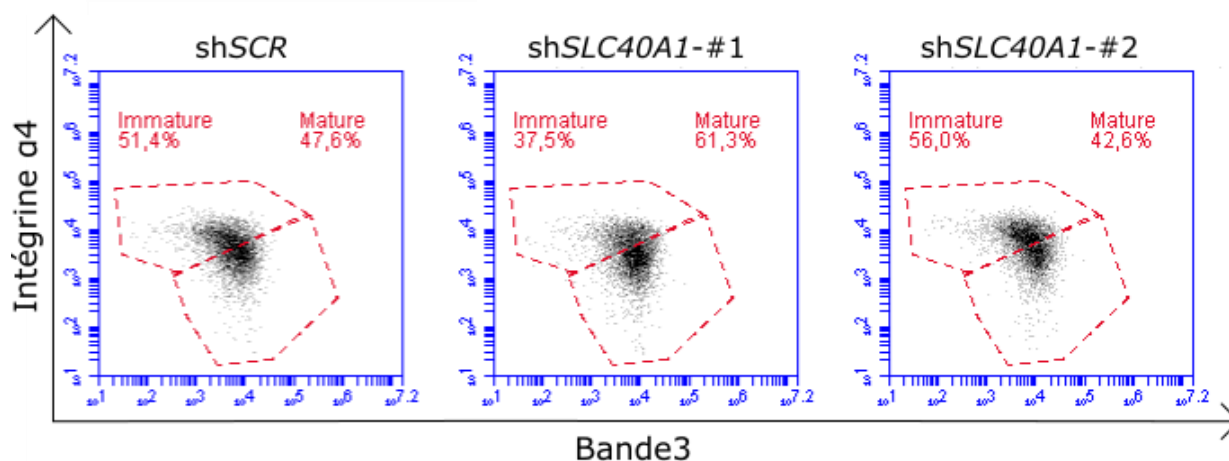


Figure 31 : Suivi des marqueurs Bande3 et Intégrine $\alpha 4$ dans les érythroblastes humains primaires *knockdown SLC40A1*.

Les érythroblastes humains primaires ont été marqués pour la Bande3 (abscisse) et l'intégrine $\alpha 4$ (ordonnée) en cytométrie en flux après 10 jours de culture. Les événements ont été *gated* sur la morphologie FSC/SSC (érythroblastes vivants) et GFP^{HIGH} (infectés).

En absence d'un phénotype dans les érythroblastes humains primaires, nous avons opté pour un modèle cellulaire dans lequel nous pourrions réaliser un *knockout* par CRISPR/CAS9. Cette technique permet d'éditer une séquence spécifique au sein de l'ADN génomique en utilisant un ARN guide complémentaire de celle-ci. Cet ARN guide va permettre le positionnement de l'endonucléase CAS9, et ainsi la réalisation d'une coupure double brin induisant des mutations par insertion ou délétion de nucléotides lors de la réparation. Un crible par PCR de la séquence ciblée permet d'isoler les clones génétiquement modifiés.

Les cellules MEDEP ont été sélectionnées car elles récapitulent très bien l'érythropoïèse murine, et peuvent être maintenues dans un état immature lors de la sélection des clones invalidés par CRISPR. Afin de générer des MEDEP invalidées pour *Slc40a1*, j'ai tout d'abord généré 3 gRNA différents (**figure 32A**). Après électroporation des MEDEP, permettant la transfection des plasmides encodant simultanément un gRNA et la CAS9, un crible a été effectué sur les sous-clones par analyse de fragment. L'inactivation de *Slc40a1* a ensuite été vérifiée par western blot (**figure 32B**). D'un point de vue fonctionnel, le *knockout* de *Slc40a1* a entraîné une diminution de l'expression de Tfr1 en surface des cellules non-induites en différenciation (**figure 32C**), cohérent avec une quantité de fer cellulaire accrue (pour rappel, [II.3.A. Mécanismes de régulation au niveau cellulaire](#)).

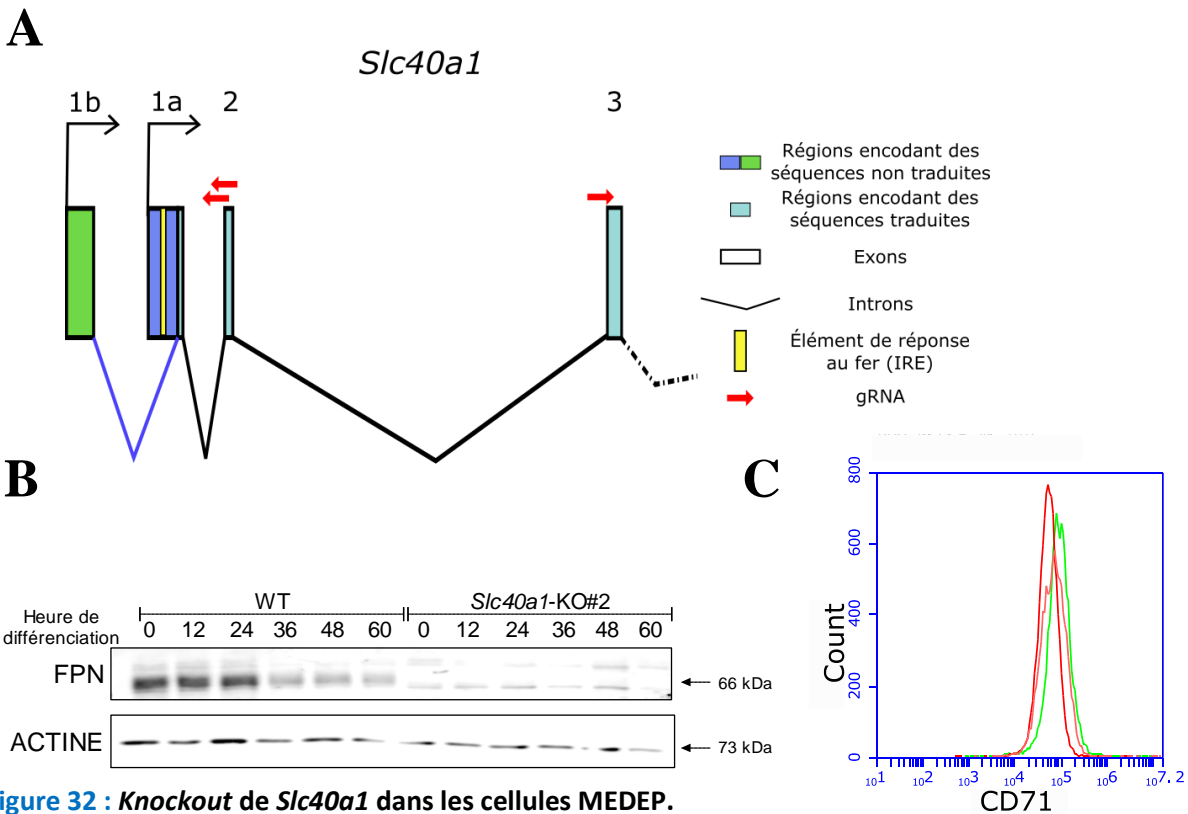


Figure 32 : Knockout de *Slc40a1* dans les cellules MEDEP.

(A) Représentation des promoteurs de *Slc40a1* et des guides RNA (gRNA) utilisés. (B) Western blot anti-Fpn dans les MEDEP WT et les MEDEP *Slc40a1*-KO2 au cours de la différenciation. L'actine est utilisée comme témoin de charge. (C) L'expression de CD71 (TFR1) a été mesurée par cytométrie en flux dans les MEDEP WT (vert), *Slc40a1*-KO1 (rouge), et *Slc40a1*-KO2 (rouge pâle) en *steady-state* (i.e. dont la différenciation n'a pas été induite).

L'invalidation de *Slc40a1* n'affecte pas la survie des MEDEP, ni leur prolifération (**figure 33**).

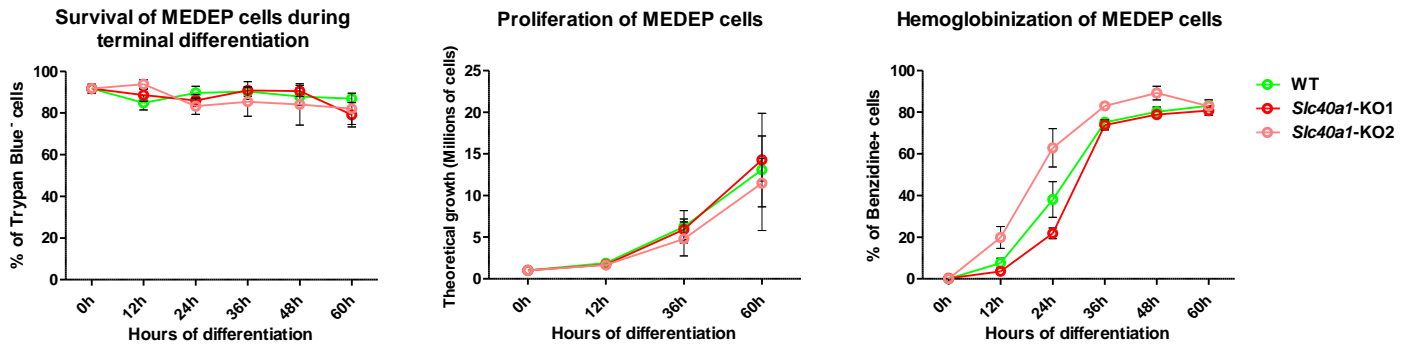


Figure 33 : Effet du *knockout* de *Slc40a1* sur les cellules MEDEP.

La survie des MEDEP WT (vert), *Slc40a1*-KO1 (rouge) et *Slc40a1*-KO2 (rouge pâle) a été mesurée par exclusion au bleu Trypan (gauche). Leur prolifération théorique a été calculée à partir des facteurs de croissance entre deux comptages (milieu) et leur pourcentage d'hémoglobinisation a été mesuré par coloration à la benzidine (droite). Les barres d'erreurs représentent la *standard error of the mean*. Test statistique : 2-way ANOVA, non significative pour la variable shRNA pour la survie et la prolifération des érythroblastes. Significative pour l'hémoglobinisation.

Selon les clones considérés, l'hémoglobinisation était retardée ou avancée. Par cytométrie en flux, on observe des cellules de plus grande taille dans le clone MEDEP *Slc40a1*^{KO#2} que dans les MEDEP WT (*résultats non présentés*) ; différence également bien visible sur les colorations à 0h et 24h de différenciation (**figure 34**). Cette différence de taille n'est pas retrouvée dans l'autre clone *Slc40a1*^{KO#1}, ce phénotype est donc inexplicable pour le moment, et potentiellement artefactuel pour ce clone.

Figure 34 : Morphologie des MEDEP au cours de la différenciation.

Toutes les 12h, des cellules MEDEP des différentes cultures ont été prélevées, mises sur lame, et colorées par coloration MGG. Les photos ont été prises avec un microscope EVOS. Gauche : WT. Milieu : clone *Slc40a1*-KO1. Droite : clone *Slc40a1*-KO2. Les temps de prélèvement sont indiqués sur la gauche.

De même que pour la différenciation humaine, la différenciation murine peut être suivie par cytométrie en flux en se basant sur l'évolution de marqueurs de surface : CD117 est exprimé par les proérythroblastes et perdu au stade érythroblaste basophile, tandis que le Ter119 est acquis. CD44 et CD71 sont eux perdus progressivement entre les stades érythroblaste basophile et réticulocyte. Les stades de différenciation peuvent être identifiés en suivant ces marqueurs ainsi que la taille des cellules déterminée par le *forward scatter* (FSC). Un léger retard de perte du CD44 est observé pour le clone *Slc40a1*^{KO#1} (Intensité moyenne de fluorescence (MFI) : 9 163, rouge pâle) à partir de 36h, mais ne l'est pas pour le clone *Slc40a1*^{KO#2} (rouge, MFI : 3 350, WT en vert, MFI : 3 035, **figure 35**). De même pour CD117 à 12h (MFI *Slc40a1*-KO2 : 23 074, WT :13 281, *Slc40a1*-KO2 : 15 104) – ce qui pourrait suggérer que ce clone a une différenciation retardée.

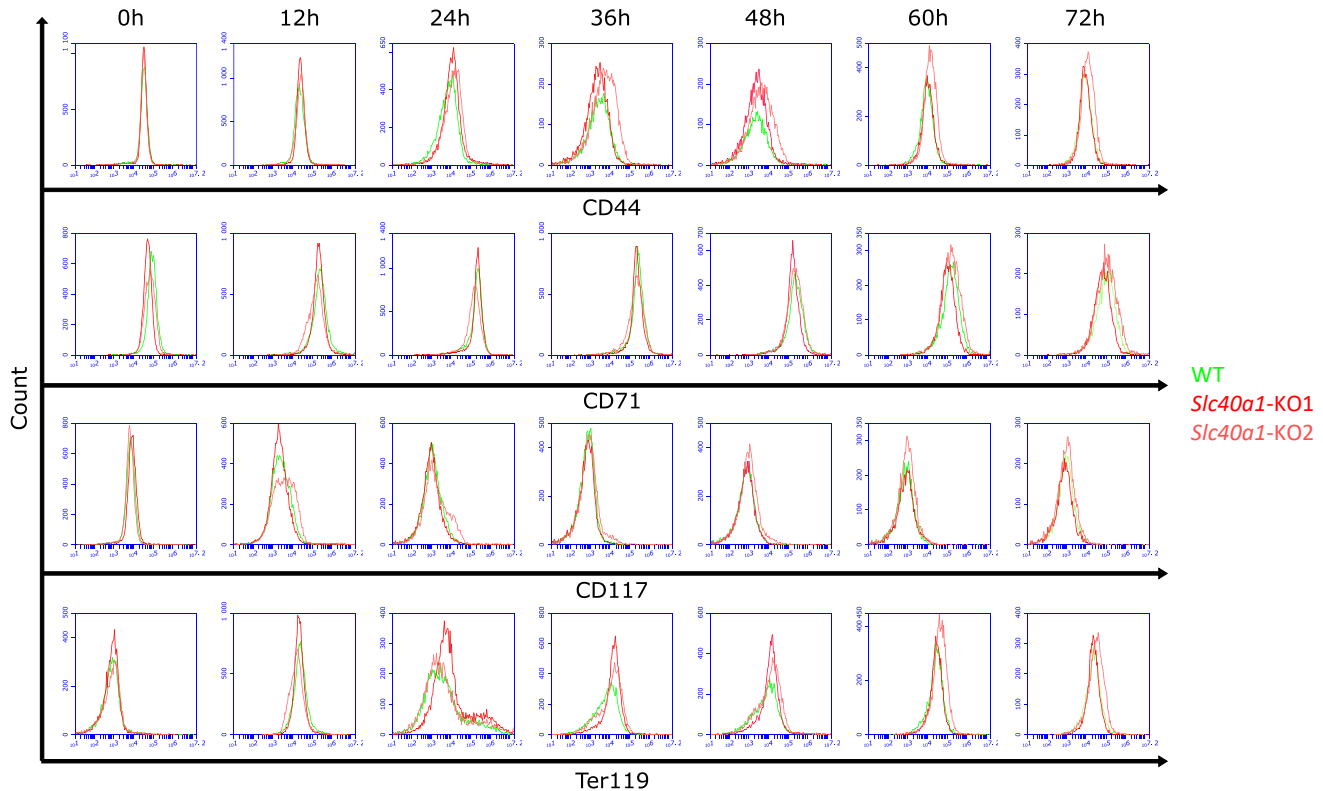


Figure 35 : Évolution des marqueurs de surface lors de la différenciation des MEDEP *Slc40a1*-KO.

La présence de CD44 (première ligne), CD71 (seconde ligne), CD117 (troisième ligne), et Ter119 (dernière ligne) à la surface des MEDEP en cours de différenciation a été suivie par cytométrie en flux. Les histogrammes représentent la superposition des clones WT et *Slc40a1*-KO à un temps donné. Les temps de différenciation sont indiqués en haut. MEDEP WT : vert. *Slc40a1*-KO1 : rouge. *Slc40a1*-KO2 : rouge pâle.

Du fait de l'import conséquent de fer dans les érythroblastes pour la synthèse d'hémoglobine, nous avons émis l'hypothèse que le rôle de la FPN au cours de la différenciation consiste en la régulation du stress oxydatif – en permettant l'export des atomes de fer

surnuméraires. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé la sonde DiHydroÉthidium (**DHE**) dont la longueur d'onde d'émission est dépendante de son excitation – *id est* de la présence de ROS qui l'oxydent. En incubant pendant 5h les érythroblastes humains primaires knockdown ou non pour *SLC40A1* avec 200µM de FeNTA (mélange de FeCl3 et d'acide nitrilotriacétique permettant de surcharger les cellules en fer), puis avec du DHE, on peut observer un stress oxydant accru dans les érythroblastes basophiles knockdown *SLC40A1* comparé au contrôle (**figure 36**). Cette différence est perdue avec la différenciation, jusqu'à être inexistante au stade acidophile. Ces résultats ne sont pas reproductibles dans les cellules MEDEP CRISPR *Slc40a1* (*résultats non montrés*).

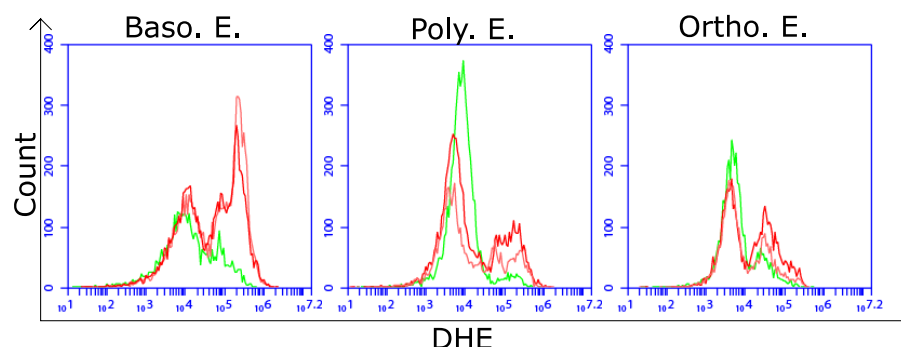


Figure 36 : La FPN prévient le stress oxydant dans les érythroblastes basophiles.

L'intensité de fluorescence de la DHE (correspondant au niveau de stress oxydant cellulaire) a été mesurée par cytométrie en flux dans les érythroblastes humains primaires aux stades érythroblaste basophile (Baso. E.), érythroblaste polychromatophile (Poly. E.), et érythroblaste acidophile (Ortho. E.) incubés 5h avec 200µM de FeNTA. Les histogrammes représentent la superposition des érythroblastes infectés avec un shRNA contrôle (vert), le sh*SLC40A1*-#1 (rouge) ou sh*SLC40A1*-#2 (rouge pâle).

Nous nous sommes par la suite intéressés à la quantité de fer présente dans les érythroblastes au cours de leur différenciation. Du fait de la difficulté technique de mesurer le fer dans les cellules, il n'y a – pour l'instant – pas de quantité de référence dans la littérature. Nous avons mis au point en collaboration avec le Dr Katell PEOC'H une technique de mesure du fer dans les érythroblastes basée sur l'*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* (Spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif ; **ICP-MS**). Cette technique permet de détecter les métaux, et nos expériences préliminaires nous ont permis d'observer une augmentation de la quantité de fer contenue dans les érythroblastes dès le 5^{ème} jour de culture (correspondant à la transition basophile-2 – érythroblaste polychromatophile) qui sera quasiment multipliée par 3 à la fin de la différenciation (**figure 37**). De plus, nous avons eu l'occasion de mesurer le contenu en fer dans un échantillon knockdown *SLC40A1* *versus* un échantillon contrôle, et avons pu constater une accumulation de fer plus

importante en absence de FPN (22.7 μ g/L/Million de cellules versus 17.63 μ g/L/Million de cellules). Ces résultats sont encourageants, mais d'autres réplicats sont nécessaires.

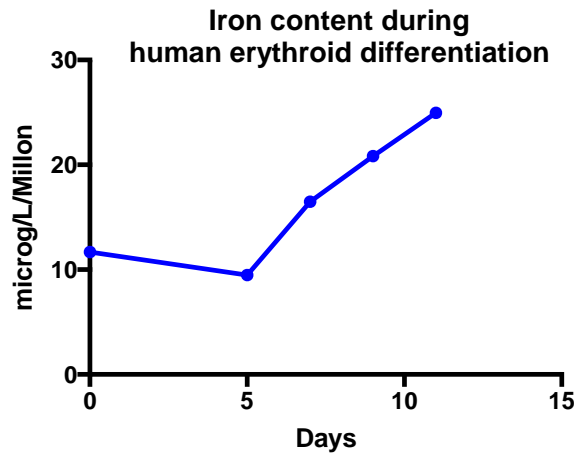


Figure 37 : Contenu martial des érythroblastes humains au cours de la différenciation terminale.

La quantité cellulaire de fer dans les érythroblastes humains primaires a été mesurée par ICP-MS, et rapportée sur le nombre de cellules contenues dans l'échantillon (μ g/L/Million de cellules). Plusieurs points ont été mesurés au cours de la différenciation érythroïde (jour 0, 5, 7, 9, et 11). N=1.

D. Conclusions & perspectives

Dans ce manuscrit, nous avons établi que le gène *SLC40A1*, encodant la FPN1, était une cible de la signalisation en aval de TFR2 dans les érythroblastes humains. L'analyse transcriptomique des conditions *knockdown TFR2* montre une augmentation d'expression de *SLC40A1* comparée aux conditions contrôles.

Ce gène encode différentes populations d'ARNm générés par des promoteurs alternatifs. Les amorces que j'ai mises au point permettent de discriminer la population canonique (contenant un IRE, issue du promoteur 1) des populations alternatives (issues des promoteurs 2 et 3, et ne contenant pas d'IRE). J'ai pu établir le profil d'expression de ces populations au cours de la différenciation érythroïde, et les variations d'expression de *SLC40A1* en prenant en compte toutes ces populations sont en accord avec les données de transcriptomique générées par l'équipe de Narla Mohandas⁸⁹.

L'expression de *SLC40A1* n'a pas été retrouvée significativement augmentée dans les divers clones issus des lignées érythroleucémiques humaines UT-7 et K562 *knocked down* pour *TFR2*. Cependant, dans les UT-7, nous avons observé de manière reproductible que l'expression

des protéines régulées par le système IRE/IRP (TFR1, FtH1, FtL) sont traduites comme si les cellules étaient en permanence carencées en fer (*résultats non montrés*), et conformément à cela, IRP2 est peu dégradée. La supplémentation en fer avec du FeNTA ou la carence en fer induite avec du Déférasirox/Déféroxamine n'induit que très peu de changement d'expression de ces protéines dans ces cellules. *SLC40A1* comportant un élément IRE dans la 5' UTR de la population majoritaire, l'état « carencé » des cellules pourrait expliquer que l'on n'observe pas d'augmentation d'expression en absence de TFR2. En effet, pour deux *shTFR2* sur trois, l'expression des ARNm de *SLC40A1* ne contenant pas d'IRE est augmentée. Cela suggère que l'absence d'augmentation de la population canonique dans le *knockdown* comparée au contrôle pourrait être due au fait que les ARNm de *SLC40A1* sont déjà stabilisés par le système IRE/IRP dans les contrôles. Dans les K562, l'absence de contrôle de l'expression de *SLC40A1* par TFR2 pourrait s'expliquer par la présence de la protéine de fusion BCR-ABL, responsable de la dérégulation de nombreuses voies de signalisation. Parmi ces voies de signalisation dérégulées, pourrait se trouver la voie de signalisation en aval de TFR2. Finalement, ces deux lignées étant immortalisées, elles accumulent de très nombreuses mutations avec leur maintien en culture, et il est probable que les sous-clones établis après infection par vecteurs lentiviral aient pu accumuler différentes mutations – ce qui peut également expliquer nos résultats divergeants selon les sous-clones étudiés.

L'analyse transcriptomique ne nous a pas permis de retrouver GDF15 dans la liste des gènes dont l'expression est dérégulée, malgré le fait que nous avons précédemment montré que GDF15 soit un gène cible de TFR2 dans les érythroblastes humains primaires¹⁶⁷. Cela peut s'expliquer par le fait que les UT-7 expriment GDF15 en plus faible quantité que les cellules primaires. De plus, comme mentionné dans le paragraphe précédent, les K562 exprimant la protéine de fusion BCR-ABL. Il est donc possible que la signalisation en amont de GDF15 soit dérégulée dans ces cellules.

Le *knockdown* de *TFR2* dans les érythroblastes humains primaires entraîne un retard de différenciation érythroïde comme l'a publié mon équipe en 2010¹⁶⁷. Dans mes mains, ce retard s'apparente plus à une dys-érythropoïèse avec une différenciation bloquée, l'effet est donc plus sévère (**figure 38**).

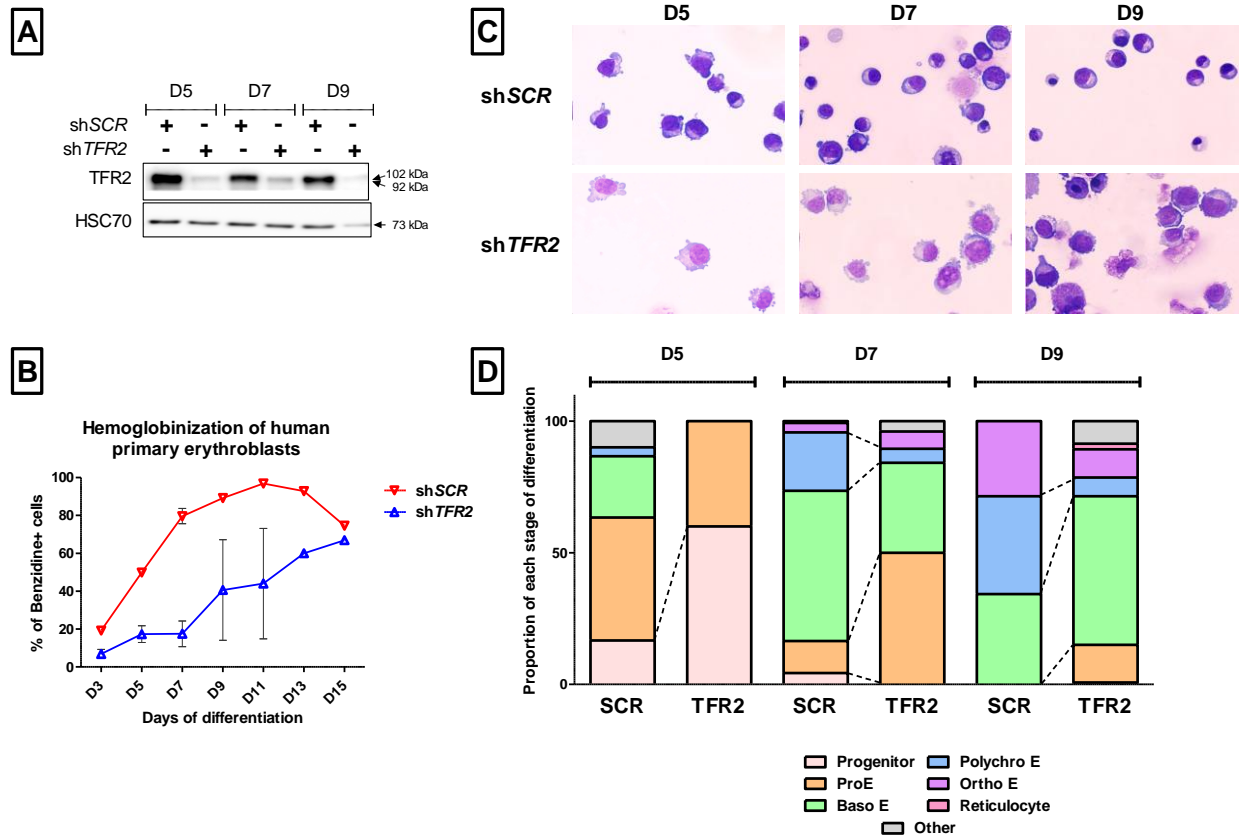


Figure 38 : Phénotype des érythroblastes humains primaires *knocked down* pour *TFR2*.

Les shRNA ciblant *TFR2* utilisés dans cette étude sont très efficaces comme en témoigne le western blot anti-TFR2 (haut, gauche). HSC70 est montrée en tant que contrôle de charge. Ce *knockdown* a pour effet un retard d'hémoglobinisation comme le démontre le comptage après coloration en benzidine (gauche, bas). Conjointement, ce retard est observable morphologiquement (partie droite). La morphologie des érythroblastes sh*TFR2* est anormale (en haut : champs représentatifs à D5, D7 et D9, en bas : comptage associé de cette expérience représentative). Il est à noter que le protocole utilisé dans ces expériences offre une synchronisation de la différenciation moindre comparé à celui qui a été utilisé pour l'étude de *SLC40A1* et de *CDC42BPA* (suite de ce manuscrit).

Le *knockdown* de *TFR2* entraîne également l'abolition de l'expression de GDF15¹⁶⁷. Pour rappel, GDF15 est en mesure d'inhiber la synthèse d'hepcidine, lorsque sa production est exacerbée chez les patients β -thalassémiques. En condition normale, la production de GDF15 augmente avec la différenciation érythroïde (figure 25). En 2009, Lakhali et collaborateurs ont établi une corrélation entre la production de GDF15 et la déprivation en fer²⁷⁹. Lors de cette étude, les auteurs ont pu noter une augmentation de la production de GDF15 suite à la surexpression de FPN dans les cellules HeLa. Dans le cas d'un *knockdown* de *TFR2*, FPN est surexprimée comme nous l'avons

vu, on s'attendrait donc à une production exacerbée de GDF15 si on se base sur les résultats de Lakhali et collaborateurs. La régulation de GDF15 reste donc à être mieux caractérisée.

Une nette augmentation d'expression de *SLC40A1* est observée avec le *knockdown* de *TFR2* (KD *TFR2*) aux stades érythroblaste basophile et érythroblaste polychromatophile. Les deux types d'ARNm *SLC40A1* sont concernés par cette augmentation. L'augmentation d'expression des populations Non-IRE à ces stades pourrait en partie être imputée au retard de différenciation, mais cela n'est pas suffisant pour expliquer une telle différence. Dans le cas de la population canonique, cette augmentation ne peut pas être imputée au retard de différenciation puisque l'on s'attendrait alors à une quantité diminuée d'ARNm contenant un IRE (cf. **figure 23**, l'expression de la population canonique augmente avec la différenciation). Il s'agit d'ailleurs de la population pour laquelle l'augmentation est la plus nette (jusqu'à 120 fois plus élevée). Cela peut s'expliquer par le fait que la levée d'inhibition de la transcription de cette population provoque un *fold change* d'autant plus important puisqu'elle est normalement exprimée minoritairement à ces stades. Cependant, il est également envisageable que seule la transcription du promoteur 1 soit sous le contrôle de la signalisation en aval de *TFR2*. Bien que cette possibilité ne soit pas la plus évidente, une transcription accrue du promoteur 1 peut également entraîner une transcription accrue des promoteurs 2 et 3 en favorisant l'accès à la polymérase. Pour mettre en évidence un contrôle transcriptionnel de *TFR2* sur ces différentes populations, les érythroblastes KD *TFR2* ont été incubés avec de l'Actinomycine D qui inhibe la transcription – le rationnel étant que s'il s'agit d'un contrôle transcriptionnel, et non de stabilité de l'ARNm, la quantité d'ARNm diminuera au même rythme que dans la condition contrôle. Les résultats obtenus sont trop variables pour être interprétables pour le moment (*résultats non montrés*).

L'augmentation d'expression de *SLC40A1* dans les conditions *knockdown* par rapport à la condition contrôle est progressivement perdue avec la différenciation. Pour ce qui est de la population canonique, celle-ci est de plus en plus exprimée au cours de la différenciation. Or, le *knockdown* de *TFR2* entraîne un blocage de différenciation. Ce blocage pourrait atténuer la différence entre les conditions *knocked down* et la condition contrôle qui continue de différencier. Il est probable, de plus, que l'efficacité du shRNA soit moindre avec le temps.

Dans les conditions normales, on observe une augmentation de la population canonique avec la différenciation. Le contenu cellulaire en ARNm en fin de différenciation étant élevé (cf.

figure 23), on pourrait s'attendre à une expression accrue de FPN au niveau protéique. Pourtant, la quantité de FPN n'est accrue qu'au stade réticulocyte, non aux stades érythroblaste polychromatophile et érythroblaste acidophile (**figure 26**). Cela sous-entend qu'une régulation supplémentaire de la traduction de *SLC40A1* s'opère. Il est à noter qu'en fin de différenciation, la corrélation protéine-ARNm est médiocre, comme le montre la comparaison de nos données protéomiques et celles transcriptomiques de l'équipe de Narla Mohandas^{30,89}. Il est intéressant de noter que la FPN est bien présente chez les globules rouges (**figure 26**). Les GRs demeurant en moyenne 120 jours dans la circulation, et étant anucléés, cela présuppose que FPN n'est pas dégradée par l'hépcidine présente dans la circulation. Cette hypothèse a été confirmée chez la souris par Zhang et collaborateurs, qui ont montré que la Fpn exprimée par les globules rouges murins n'est pas dégradée en présence de l'hépcidine¹⁷⁸, son export de fer étant juste inhibé par changement conformationnel¹²⁵.

La répression de *SLC40A1* par TFR2 est potentiellement tissu-spécifique. Dans leur modèle murin *Tfr2*^{-/-}, Roetto et collaborateurs observent également une augmentation de Fpn1 dans les hépatocytes²³⁴ (bien que celle-ci peut très certainement être imputée à la surcharge martiale), tandis que Rishi et collaborateurs observent au contraire une diminution de Fpn1 dans leur modèle *Tfr2*^{-/-} macrophage-spécifique²⁰⁷. Cette régulation différentielle pourrait être pertinente en conditions physiologique et pathophysiologique dans le contexte d'un îlot érythroblastique. Cela peut également être intéressant si l'on considère les macrophages du système réticulo-endothélial, responsables du recyclage des globules rouges sénescents.

Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle de la FPN au cours de la différenciation, afin de comprendre quel serait le rôle de l'augmentation de FPN lorsque la signalisation en aval de TFR2 est diminuée.

Pour cela, nous avons utilisé différents shRNA ciblant *SLC40A1* dans les érythroblastes humains primaires. Le *knockdown* de *SLC40A1* dans les érythroblastes n'a pas entraîné de différence significative sur la survie, la prolifération, l'hémoglobinisation, ou sur la morphologie. Une légère accélération de l'acquisition de la Bande3 a été notée, mais n'est pas corrélée aux autres éléments de suivi. L'efficacité du KD dans les cellules primaires et de l'infection ont été vérifiées respectivement par qPCR et sur l'expression de la GFP encodée dans le plasmide délivrant le shRNA. Les deux shRNA utilisés dans cette étude ont été sélectionnés en se basant sur leur

efficacité dans les K562 ; en effet, les K562 expriment suffisamment de FPN en surface pour obtenir un faible marquage en cytométrie en flux – qui disparaît avec les deux shRNA sélectionnés pour cette étude (**figure 39**).

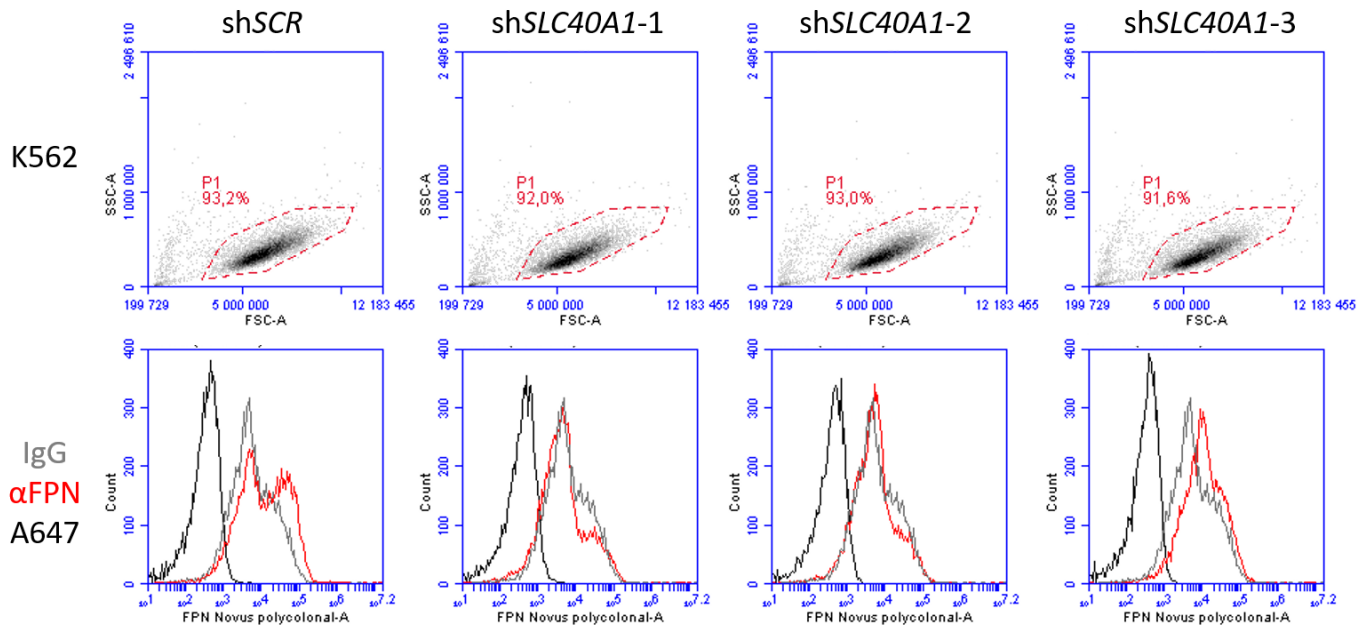


Figure 39 : Marquage de FPN en cytométrie en flux dans les cellules K562 *knockdown* SLC40A1.

Les K562 semblent exprimer plus de FPN en surface que les érythroblastes humains primaires. En haut : *Side scatter/Forward scatter* avec *gate* correspondant aux cellules vivantes. Bas : intensité de fluorescence *gated* sur P1 du contrôle (IgG, gris), de l’anticorps anti-FPN polyclonal commercial NOVUS (rouge), et de l’anticorps secondaire seul (AlexaFluor A647, noir). Un faible marquage de FPN est détectable avec le shSCR. Ce faible marquage est totalement perdu avec les shRNA shSLC40A1-1 et shSLC40A1-2, mais demeure partiellement avec le shSLC40A1-3 – les deux premiers shRNA ont été sélectionnés pour cette étude.

Ce marquage ne peut être fait dans les érythroblastes, l’expression en surface est sûrement trop faible. L’expression de TFR1 est, de plus, diminuée en début de différenciation, ce qui est cohérent avec une accumulation de fer suite à une absence de FPN (*résultats non montrés*). Nos données préliminaires obtenues par *Inductively-coupled plasma mass spectrometry* abondent également dans ce sens. Il serait néanmoins intéressant de quantifier l’efficacité du *knockdown* avec les anticorps mis au point par Ross et collaborateurs²⁷⁸.

Afin de s’affranchir de l’effet d’un niveau résiduel d’expression de Fpn, nous avons opté pour l’inactivation de *Slc40a1* par CRISPR/CAS9 dans la lignée murine MEDEP. L’électroporation des MEDEP a permis la transfection de plasmides contenant la CAS9 et un des

gRNA. La différenciation des clones MEDEP obtenus n'a pas révélée de différence significative sur la différenciation des cellules MEDEP en absence de Fpn1. Les deux clones utilisés dans cette étude ont des profils d'hémoglobinisation différents du WT, mais un clone hémoglobinise précocement, tandis que l'autre présente une hémoglobinisation retardée. Il n'est donc pas possible de conclure quant à l'effet de l'inactivation de *Slc40a1* sur l'hémoglobinisation dans les faits. En cytométrie en flux, le premier clone semble un peu retardé, ce qui n'est pas le cas du second. Il est possible qu'une délétion/insertion se soit produite à un autre endroit du génome dans l'un de ces deux clones, ce qui nous empêche de réconcilier leur phénotype. Il est, de plus, possible qu'un des deux produise une Fpn tronquée tandis qu'elle n'est pas traduite dans l'autre (engendrant, par exemple, un gain de fonction *versus* une perte de fonction). Il semble cependant raisonnable de penser que l'expression de Fpn est bien affectée dans les deux clones puisqu'outre l'absence de bande correspondant à la Fpn en western blot, le niveau basal de Tfr1 (CD71) est diminué dans les deux clones par rapport au WT avant initiation de la différenciation (cet effet n'est donc pas dû à une cinétique de différenciation affectée). D'autres clones *Slc40a1 knockout* sont actuellement évalués, et leur profil correspond plus au clone 1. L'hypothèse du clone *Slc40a1-KO#2* ayant subi une modification en dehors du locus de *Slc40a1* est privilégiée.

En condition non-stressée, l'absence/diminution de FPN n'a pas semblé affecter la différenciation. Il est cependant possible que le rôle de FPN soit important uniquement en condition de stress. La FPN permettant l'export de fer, nous avons émis l'hypothèse qu'en son absence, le fer pourrait s'accumuler dans la cellule et entraîner la production d'espèces réactives de l'oxygène. Pour tester cette possibilité, nous avons exposés des érythroblastes basophiles, des érythroblastes polychromatophiles et des érythroblastes acidophiles à du FeNTA (entraînant une surcharge en fer). L'utilisation de la sonde dihydroéthidium nous a permis de mesurer le niveau de stress oxydatif dans les érythroblastes KD *SLC40A1* et érythroblastes contrôles. On observe alors une intensité de fluorescence significativement plus élevée dans les érythroblastes basophiles KD *SLC40A1*. Elle tend également à être plus élevée dans les érythroblastes polychromatophiles, cependant cette augmentation n'est pas significative. Il n'y a pas de différence d'intensité (et donc de stress oxydant) entre le KD et le contrôle au stade érythroblaste acidophile. La FPN est donc importante pour la gestion du stress oxydant au début de la différenciation ; en accord avec son expression au niveau protéique. Son pic d'expression observé par spectrométrie de masse entre les

stades proérythroblaste et érythroblaste acidophile se trouve au stade érythroblaste basophile-1, il est donc logique que son rôle soit prépondérant à ce stade.

Le rôle de FPN comme régulateur du niveau intracellulaire de stress oxydatif a été confirmé par l'étude de Zhang et collaborateurs¹⁷⁸. Il a été montré que l'infection par le parasite *Plasmodium*, qui provoque la malaria, engendre du stress oxydatif²⁸⁰. Zhang et collaborateurs mettent en évidence que la Fpn pourrait limiter la sévérité de l'infection par le *Plasmodium*. Ils observent chez leurs souris invalidées conditionnellement dans la lignée érythroïde pour *Slc40a1* une parasitémie plus élevée à la suite de l'infection par *Plasmodium yoelli*, une souche de *Plasmodium* infectant préférentiellement les réticulocytes. Cet effet est également retrouvé de façon plus modérée avec la souche *Plasmodium chabaudi* qui infecte les globules rouges matures uniquement. En étudiant des enfants parasités par *Plasmodium falciparum*, les auteurs ont également pu observer que la parasitémie était moindre chez les patients présentant une FPN mutée (1 homozygote et 12 hétérozygotes). La mutation de FPN Q248H est relativement fréquente en Afrique sub-saharienne, et rend résistante la FPN à la dégradation induite par l'hepcidine. Cependant, plus récemment Muriuki et collaborateurs n'ont pas observé d'effet protecteur de la mutation Q248H contre la malaria dans une cohorte de 18 000 enfants²⁸¹. Il est donc probable que l'effet observé par Zhang et collaborateurs soit dû à des fluctuations d'échantillonnages, leur cohorte étant très restreinte en nombre. De ce fait, il est probable que l'utilisation d'un activateur de FPN chez les patients atteints de malaria ne soit pas efficace – il est plus intéressant dans ce cadre de cibler les récepteurs du parasite, tel que TFR1 qui a été établi comme récepteur de *Plasmodium vivax*²⁸². Du fait de sa forte homologie extracellulaire avec TFR1, TFR2 pourrait être un autre récepteur du parasite. Il serait intéressant d'établir si l'infection par *Plasmodium vivax* ou *falciparum*, deux principales souches affectant l'Homme, sont en mesure d'infecter efficacement des réticulocytes humains shTFR2, voire même des globules rouges issus du sang de patients atteints d'hémochromatose de type 3.

Lors de leur étude, Zhang et collaborateurs ont pu observer une, et une augmentation du niveau de ferritine dans les érythrocytes murins *Slc40a1*^{KO}¹⁷⁸. Avec les érythroblastes shTFR2 dans lesquelles la FPN est augmentée, nous avons pu observer une tendance à la diminution de FTH1, ce qui est en accord avec leur observation. La FTL était cependant constante – le ratio FTL/FTH1 étant variable d'un type cellulaire à un autre, il serait intéressant de caractériser

l'évolution du ratio FTL/FTH1 au cours de la différenciation terminale ainsi que le rôle physiologique de cette évolution.

Très récemment, un nouveau type de mort cellulaire baptisée « ferroptose » a été identifié. Due à l'accumulation d'acides gras insaturés oxydés suite à la réaction de Fenton, ce type de mort cellulaire n'a pas encore d'explication physiologique. Cependant, dans un contexte pathologique, la ferroptose est impliquée dans l'aggravation des symptômes des hémochromatoses²⁸³, et dans certaines pathologies cérébrales telles que la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson^{284,285}. La FPN, en évacuant le fer, prévient la réaction de Fenton. Les globules murins invalidés pour *Slc40a1* étant plus sujets à l'hémolyse, il est possible que celle-ci soit en parti dû à l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène. Il serait intéressant de caractériser le statut de la FPN lors de ce type de mort cellulaire – en particulier puisque les mutations de *TFR2* provoquent l'hémochromatose de type 3 et que TFR2 a été impliqué dans la maladie de Parkinson et dans la maladie d'Alzheimer (cf. III.5.C. Alzheimer et parkinson).

Le rôle de la FPN au cours de la différenciation semblant crucial en condition de stress, on peut se demander quel est le rôle de l'augmentation de FPN en absence de TFR2 dans les érythroblastes. En condition physiologique, TFR2 est diminué lorsque la saturation en transferrine diminue. Comme mentionné précédemment, une diminution importante de TFR2 entraîne un retard/un blocage de différenciation (*shTFR2*). L'augmentation de FPN en absence de TFR2 pourrait permettre le relargage du fer confiné dans les érythroblastes aux autres érythroblastes et au reste de l'organisme. Ce rôle altruiste des érythroblastes est inattendu car, jusque-là, l'accumulation de fer pour la synthèse d'hémoglobine était pensée prioritaire. En tant qu'organe le plus consommateur en fer (et donc celui qui en contient le plus), l'érythron pourrait être considéré comme une réserve de fer annexe qui pourrait être mobilisée en cas de carence sévère. Avec ce modèle, une baisse de saturation de la transferrine ne permettant pas la stabilisation de TFR2 en surface, la différenciation des érythroblastes serait défavorisée tandis qu'une partie du fer qu'ils avaient accumulé serait redistribuée au reste de l'organisme, permettant le rétablissement de la saturation en transferrine. Le contrôle qu'exerce TFR2 sur la FPN le place donc d'autant plus à l'intersection entre métabolisme du fer et érythropoïèse, agissant à la fois comme senseur et effecteur.

Il est intéressant de noter que la population de *SLC40A1* la plus augmentée en absence de TFR2 est celle ne contenant pas d'IRE. En condition physiologique, la signalisation de TFR2 diminue lorsque la saturation de la transferrine baisse, ce qui va induire une déprivation de l'érythroblaste. Cette déprivation va bloquer la traduction de la population avec IRE – l'augmentation de la population Non-IRE que l'on observe pourrait alors permettre l'expression de la FPN en dépit de l'état carencé de la cellule.

Les patients atteints d'hémochromatose héréditaire de type 3 présentent des mutations dans le gène *TFR2*. L'étude des populations de transcrits de *SLC40A1* présents chez ces patients nous permettrait de confirmer nos résultats. Nous avons commencé à optimiser un protocole de mesure d'efflux du fer dans les érythroblastes en utilisant du ^{59}Fe , et comptons confirmer que l'augmentation d'expression de *SLC40A1* aboutit à l'expression en surface d'une FPN fonctionnelle par ce biais. La sensibilité au stress oxydant et à l'induction de la ferroptose des érythroblastes de ces patients sera comparée à des érythroblastes normaux et à des érythroblastes *knocked down* pour *SLC40A1* ; de même, le contenu en fer de chacune de ces conditions sera mesuré par ICP-MS. L'étude de l'érythropoïèse de ces patients nous permettra également de confirmer l'effet de l'absence de TFR2 sur la différenciation terminale.

La synthèse d'hémoglobine étant un processus très consommateur en fer, l'érythron est le plus grand consommateur de l'organisme. TFR2 jouant un rôle de senseur de la concentration sérique en fer, il est un régulateur clef de cette consommation puisqu'il pourrait réguler le taux d'érythropoïèse en fonction des stocks disponibles. La FPN étant le seul exportateur de fer de l'organisme, son rôle est central dans l'homéostasie du fer. L'adaptation de l'expression de FPN en fonction de l'activation de la signalisation en aval de TFR2 était inattendue. La surexpression que l'on observe en absence de TFR2 (mimant une faible saturation de la transferrine) pourrait permettre le relargage du fer emmagasiné en cas d'anémie sévère. Cela laisse entrevoir l'érythron non pas uniquement comme un consommateur de fer, mais également comme un tissu de stockage de secours.

VI. Discussion

Propos sur l'érythropoïèse et le fer

Le transport d'oxygène assuré par les globules rouges est indispensable au bon fonctionnement de l'organisme. Il repose sur la présence d'hème dans l'hémoglobine, permettant la fixation réversible de molécules de dioxygène aux atomes de fer, élément à la biodisponibilité réduite. Les régulations associées à l'homéostasie du fer sont nombreuses, et permettent le maintien de la quantité circulante de fer à des niveaux ni trop faibles, ni trop élevés – les premiers ne permettant pas aux cellules d'internaliser le fer dont elles ont besoin, les seconds entraînant des dommages cellulaires puis tissulaires importants du fait de la toxicité du fer libre.

L'érythropoïèse étant le processus le plus consommateur en fer de l'organisme, il affecte grandement l'homéostasie du fer – et inversement, comme nous l'entrevoyons dans ce manuscrit, la différenciation érythroïde s'adapte aux stocks de fer disponible. Nous nous sommes principalement intéressés à TFR2 car il est impliqué à la fois dans l'homéostasie du fer et dans l'érythropoïèse, ce qui le rend susceptible d'être un des principaux adaptateurs entre ces processus.

A. L'internalisation du fer au cours de l'érythropoïèse

Le TFR1 est le principal importateur de fer, et son expression peut majoritairement être imputée aux érythroblastes en cours de différenciation (80%). L'affinité de TFR1 pour la transferrine étant 27 fois supérieure à celle de TFR2, et étant plus fortement exprimé (1 000 fois plus de copies par érythroblaste en moyenne), il est vraisemblable que l'importation de fer dans les érythroblastes se fasse majoritairement par TFR1. Une contribution de TFR2 à cet import a été néanmoins suggérée. Comme expliqué dans l'introduction, Khalil et collaborateurs décrivent une voie d'importation du fer basée sur TFR2 et *via* des contacts lysosome-mitochondrie dans les érythroblastes humains²²⁷. Mastroberardino et collaborateurs avaient également décrit un apport de transferrine à la mitochondrie dans les neurones dopaminergiques dépendant de TFR2²¹⁵. Nos immunoprécipitations de TFR2 nous ont permis d'identifier plusieurs partenaires mitochondriaux, ce qui abonde en ce sens. De plus, l'équipe de J. L. Miller a suggéré que leurs travaux montrent la présence de TFR2 dans des lysosomes associés aux mitochondries dès le début de l'hémoglobinisation^{286,287} (abstracts de l'*American Society of hematology*, 2009 et 2010, non

publiés). Comme TFR2 peut participer à l'établissement du contact avec la mitochondrie en s'associant avec MFN-2²²⁷, il est possible d'envisager une voie d'importation du fer indépendante de TFR1. L'équipe de J.L. Miller a néanmoins observé que la transferrine co-localisait d'abord avec TFR1 avant d'être retrouvée dans le compartiment TFR2 positif. Il est donc possible que TFR2 ne soit pas responsable de l'import à proprement parler, mais du trafic de la transferrine, puisque la liaison de la transferrine à TFR2 va l'orienter vers une internalisation dans le lysosome²²³ pour recyclage, comme TFR1 pour lequel il s'agit de la voie d'internalisation canonique. Il est donc envisageable que dans les cellules érythroïdes, le TFR2 puisse participer à l'établissement de contacts lysosome-mitochondrie, permettant l'acheminement de la transferrine importée par TFR1 directement dans la mitochondrie.

Dans la première partie de ce manuscrit, j'ai pu mettre en évidence que MRCK α contrôle l'expression en surface des récepteurs à la transferrine, sûrement en régulant leur internalisation et/ou recyclage. Les deux récepteurs étant *a priori* nécessaires à l'internalisation (TFR1) et l'utilisation du fer en vue de la synthèse d'hémoglobine (TFR1/TFR2), il est probable qu'en absence de MRCK α , les érythroblastes soient déficitaires en fer, ce qui pourrait affecter leur hémoglobinisation. Un dosage du fer contenu dans les érythroblastes *shSCR versus shCDC42BPA* par *Inductively-Coupled Plasma – Mass Spectrometry* nous permettrait de tester l'hypothèse que ces derniers soient déprivés en fer du fait de la down-régulation des récepteurs à la transferrine. Il est intéressant de noter qu'un délai d'acquisition de la glycophorine A est attribué à une érythropoïèse s'effectuant en condition martiale appauvrie (« *iron-restricted erythropoiesis* »)²²⁵, délai que j'observe avec le *knockdown* de *CDC42BPA*. Le retard de différenciation observé avec les shRNA ciblant *CDC42BPA* et les clones CRISPR MEDEP *Cdc42bpa*^{-/-} peut également entraîner ce retard d'hémoglobinisation et ce délai d'acquisition de la GPA. Cependant, l'hypothèse inverse peut être formulée – l'absence de stocks nécessaires de fer pour la synthèse d'hémoglobine pourrait retarder la différenciation. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en supplémentant en fer les érythroblastes en absence de MRCK α , avec du FeNTA par exemple, puis suivre leur cinétique de différenciation et hémoglobinisation. Si l'hémoglobinisation est tout de même retardée en présence de FeNTA, celle-ci est uniquement due au retard, et non à une internalisation de fer réduite. Les conditions martiales appauvries ont été utilisées dans certaines études pour améliorer la condition de modèles murins β -thalassémiques, notamment avec des injections de transferrine non saturée en fer qui miment la carence martiale²⁸⁸. On observe alors un taux de réticulocyte et

un niveau d'Epo diminués, et une augmentation de la production d'hepcidine et d'hémoglobine. Les conditions martiales appauvries pourraient donc être bénéfiques aux patients atteints de β -thalassémies²⁸⁹. MRCK α régulant l'expression des récepteurs à la transferrine, son inhibition pourrait également mimer la carence martiale – ce qui en fait une cible intéressante pour de potentielles thérapies. De plus, la diminution de l'expression de TFR2 en surface suite à l'inhibition de MRCK α favoriserait également l'expression de la FPN, et limiterait donc le stress oxydatif qui favorise la formation des agrégats de chaîne α ¹⁸⁷. Il est cependant à noter que dans un modèle murin invalidé pour *Tfr2*, la transcription d'*Erfe* était augmentée²⁴⁸ – s'il s'agit d'un contrôle transcriptionnel de *Tfr2* sur *Erfe*, et non d'une régulation systémique, la diminution de TFR2 en surface pourrait être problématique puisqu'une partie du phénotype de surcharge martiale des patients atteints de β -thalassémie peut être imputée à ERFE¹⁸⁶. Il existe un inhibiteur spécifique des MRCK, le BDP5290²⁹⁰, cependant il existe trois isoformes (α , β , et γ) dont deux sont exprimées ubiquitairement²⁷⁶. De plus, les kinases de la famille des DMPK présentant d'importantes homologies²⁷⁶, le BDP5290 pourrait inhiber les ROCK à plus forte dose. Finalement, la difficulté première d'un tel traitement serait de cibler spécifiquement l'érythron – bien que la forte prolifération de ce dernier pourrait favoriser l'effet localisé de l'inhibiteur sur ce tissu.

B. Une signalisation en aval de TFR2

a. La transferrine comme molécule « signal »

TFR1 et TFR2 ont tous deux comme ligand la Transferrine. Celle-ci se compose de deux lobes dits « N-terminal » et « C-terminal », pouvant chacun lier un atome de fer. La transferrine est appelée holo-transferrine (**Holo-Tf**) lorsque ces deux sites de liaison sont saturés. TFR1 a une forte affinité pour l'Holo-Tf, 23 fois supérieure à son affinité pour la transferrine non saturée (Apo-transferrine, **Apo-Tf**)²⁹¹. Cette affinité est cependant réduite lorsque la transferrine n'est que partiellement saturée : le TFR1 n'est que 5 fois plus affiné pour la transferrine dont uniquement le lobe C-terminal est saturé (**C-Tf**), et 6 fois pour la transferrine saturée en N-terminal (**N-Tf**) par rapport à l'Apo-Tf²⁹¹. L'internalisation du TFR1 se faisant de façon non-induite (« recyclage constant »), il est probable que les trois types de Tf chargées soient internalisées – cependant, l'Holo-Tf sera la principale espèce internalisée du fait de son affinité. Il est intéressant de noter qu'à ce jour, aucune étude de l'affinité de TFR2 pour la transferrine mono-saturée (N-Tf ou C-Tf) n'a été réalisée, les données présentes dans la littérature ayant vraisemblablement été obtenues avec

de l'holo-Tf^{198,292}. Celles-ci montrent une affinité de TFR2 pour l'Holo-Tf 27 fois inférieure à celle de TFR1. Le TFR2 semble avoir une affinité extrêmement faible pour l'Apo-Tf.

La saturation de la transferrine chez un adulte est comprise entre 20 et 40%, et tous les types de transferrines circulent²⁹³, avec en moyenne 1,5 fois plus de N-Tf que de C-Tf^{294,295}. Ce dernier élément est surprenant puisque plusieurs études suggèrent que le fer se lie préférentiellement au lobe C puis au lobe N^{296,297}. Récemment, Parrow et collaborateurs ont décrit que leur modèle murin invalidé pour le lobe N-ter de la Tf ne présentait pas les mêmes paramètres hématologiques que leur modèle invalidé pour le lobe C-ter²⁹⁸. Dans les deux modèles, les souris ont une anémie microcytaire – témoignant du manque de fer disponible pour la production d'hème. Cependant, le mutant pour le lobe C-ter a plus de globules rouges, tandis que le mutant N-ter a un nombre de GRs normal, malgré un niveau d'EPO circulante élevé. Cela pourrait suggérer que les érythroblastes sont moins sensibles à l'EPO circulante, et ainsi que la saturation du lobe N-ter de la Tf ait un rôle dans la régulation de la sensibilité à l'EPO. Les deux modèles ont une surcharge martiale hépatique, et le niveau d'hepcidine circulante normalisé au contenu martial hépatique est effondré comparé aux souris WT. Ce phénotype est d'autant plus prononcé dans le mutant N-ter, ce qui pourrait suggérer que la N-Tf est plus efficace que la C-Tf dans l'up-régulation de l'hepcidine. Le fait que la réponse à l'EPO et la production d'hepcidine soit affectée dans ces mutants suggère que l'occupation différentielle des lobes de la transferrine affecte TFR2 – partenaire d'EPOR¹⁶⁷ et senseur hépatique en amont de la production d'hepcidine²⁵². La N-Tf étant la plus présente dans le sérum humain, il est possible qu'elle assure un rôle de signalisation par rapport à TFR2 – indiquant au senseur que les stocks de fer ne sont pas totalement épuisés, et donc que l'import de fer supplémentaire dans l'organisme n'est pas nécessaire tout en favorisant la production d'érythroblastes en facilitant la réponse à l'EPO. Dans les deux cas, une stabilisation de TFR2 par N-Tf équivalente à l'Holo-Tf ou supérieure à la C-Tf pourrait expliquer ces observations.

b. La signalisation en aval du TFR2 érythroïde – un « switch » de différenciation ?

Bien que certaines études aient montré que TFR2 ait un rôle d'importateur de fer^{292,215,227}, de nombreuses caractéristiques se prêtent plus à un rôle de senseur du fer ; telle que son affinité pour l'holo-transferrine inférieure à celle de TFR1¹⁴⁵ ou le fait que Tfr2 ne soit pas en mesure de

pallier l'absence de Tfr1 dans les souris *Tfrc*^{-/-} 232. TFR2 est, de plus, stabilisé en surface avec la fixation de son ligand^{146,204,219,221,222}, et il est clair que le TFR2 hépatique régule la production d'hepcidine *via* une signalisation en aval^{252,299}. Les phénotypes différentiels observés avec les souris mutées pour la transferrine en N-terminal ou C-terminal étant plutôt attribuables à TFR2 qu'à TFR1 – et plus exactement à l'existence d'une signalisation en aval de TFR2 – abondent également en ce sens. Le TFR2 érythroïde pourrait donc également être en mesure de transduire un signal.

TFR2 possède dans son domaine intracellulaire 7 résidus phosphorylables (4 sérines (Ser15, Ser18, Ser19, Ser64), 2 thréonines (Thr21, Thr47) et 1 tyrosine (Tyr23)), pouvant potentiellement servir de site d'amarrage pour des adaptateurs de signalisation, des kinases, etc. ... Deux de ces résidus (Tyr23 et Ser64) sont retrouvés phosphorylés dans des études phospho-protéomiques portant sur des tumeurs^{300,301}. Comme mentionné dans l'introduction, TFR2 génère deux variants : un variant α qui est celui auquel nous nous sommes intéressés, ainsi qu'un variant β . Notre équipe a montré que le TFR2 α génère deux isoformes : une forme longue de 102kDa, et une forme courte de 92kDa (données non publiées, Maud VIEILLEVOYE). Cette seconde isoforme est issue d'un codon alternatif d'initiation de la traduction, et a un domaine intra-cytoplasmique raccourci – seule la Ser64 demeure dans cette isoforme parmi les résidus phosphorylables. Il est de plus intéressant de noter que le motif d'internalisation YQVR est également absent. Cette forme courte est majoritaire en début de différenciation, puis une inversion du ratio isoforme longue/isoforme courte s'effectue (**figure 40**). Parallèlement à cela, la production de GDF15 augmente avec la différenciation – production abolie avec le knockdown de *TFR2*¹⁶⁷. L'isoforme courte de TFR2 peut former des hétérodimères avec la forme longue (données non publiées, Maud VIEILLEVOYE). L'absence de TFR2 menant à une différenciation inefficace, nous pouvons émettre l'hypothèse que :

- 1) Il existe une signalisation en aval de la forme longue de TFR2 permettant la production de GDF15 et assurant une différenciation efficace ; potentiellement en agissant comme un point de contrôle de la différenciation finale puisque cette signalisation devient prépondérante lors du début de l'hémoglobinisaton, lorsque le fer est absolument nécessaire à la synthèse d'hémoglobine.

- 2) La forme courte de TFR2 pourrait agir comme un dominant négatif de cette signalisation, potentiellement *via* la formation d'hétérodimères isoforme longue-isoforme courte qui ne signaleraient pas ou peu.

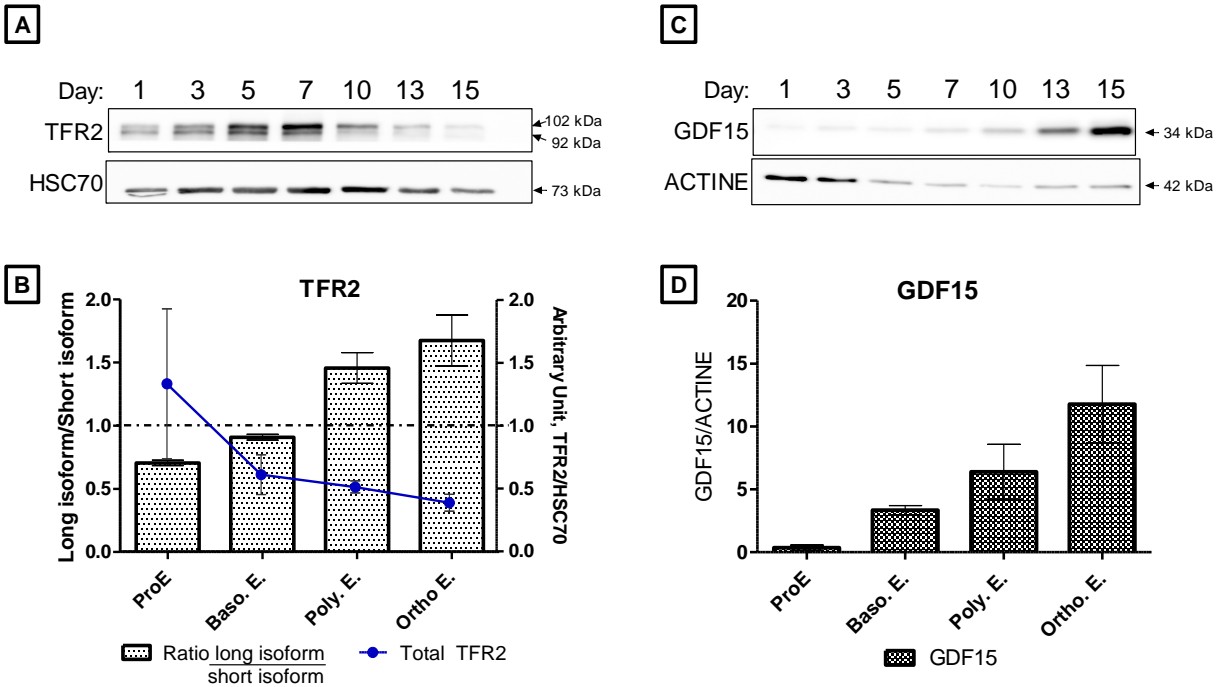


Figure 40 : Expression de GDF15 et des isoformes de TFR2 au cours de la différenciation.

Le ratio isoforme longue de TFR2/isoforme courte s'inverse au cours de la différenciation. En haut, à gauche : western blot représentatif de l'expression des deux isoformes de TFR2 au cours de la différenciation. HSC70 est montré comme témoin de charge. En bas, à gauche : quantification du ratio isoforme longue/isoforme courte de TFR2.

L'expression de GDF15 augmente avec la différenciation. En haut, droite : western blot représentatif de l'expression de GDF15 au cours de la différenciation. L'actine est montrée comme témoin de charge. En bas, droite : quantification de GDF15. **ProE** : proérythroblaste. **Baso. E.** : érythroblaste basophile. **Poly. E.** : érythroblaste polychromatophile. **Ortho. E.** : érythroblaste acidophile.

Outre son hypothétique rôle de « dominant négatif » sur la signalisation TFR2-dépendante, la forme courte de TFR2 pourrait avoir un autre rôle en début de différenciation. En effet, TFR2 facilite le transport d'EPOR à la surface comme l'a montré notre équipe en 2010¹⁶⁷. Ainsi, il est envisageable que le rôle de l'isoforme courte de TFR2 consiste en une protéine escorte pour EPOR – ce qui expliquerait sa prépondérance pendant les stades immatures et sa persistance au stade érythroblaste polychromatophile. Ainsi, l'évolution du ratio isoforme longue/isoforme courte de TFR2 au cours de la différenciation pourrait s'apparenter à un switch de signalisation des précurseurs immatures en précurseurs matures. Nous possédons au laboratoire un plasmide

encodant un *TFR2* mutant ne pouvant générer que la forme longue de TFR2 (M54A). La surexpression de cette forme dans les érythroblastes immatures permettrait de vérifier notre hypothèse : si la signalisation en aval de TFR2 facilite la différenciation, on s'attendrait alors à une différenciation accélérée.

Le *knockdown* de *CDC42BPA* entraîne une expression diminuée de TFR2 et une expression accrue d'EPOR en surface, ainsi qu'un retard de différenciation. Nous avons montré précédemment que le *knockdown* de TFR2 entraîne un retard de différenciation¹⁶⁷ – le retard que nous observons pourrait donc être dû à la présence diminuée de TFR2 en surface, et donc à sa signalisation réduite. Mais il est également possible que ce retard soit le fruit d'une signalisation en aval d'EPOR accrue (favorisant prolifération et survie), maintenant les érythroblastes à un stade immature plus longtemps ; voire à une combinaison d'une signalisation TFR2 diminuée et une signalisation d'EPOR accrue. L'activation des différents intermédiaires de signalisation en aval d'EPOR sera explorée prochainement dans les UT-7/EPO et les érythroblastes humains primaires *knocked down* pour *CDC42BPA*, ainsi que dans les MEDEP *Cdc42bpa*^{-/-}.

Bibliographie

1. Palis, J. Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Front. Physiol.* **5**, 3 (2014).
2. Hoggatt, J. & Pelus, L. M. Mobilization of hematopoietic stem cells from the bone marrow niche to the blood compartment. *Stem Cell Res. Ther.* **2**, 13 (2011).
3. Laplane, L. & Solary, E. Towards a classification of stem cells. *eLife* **8**,.
4. Haan, G. de & Lazare, S. S. Aging of hematopoietic stem cells. *Blood* **131**, 479–487 (2018).
5. Yamamoto, R. *et al.* Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell* **154**, 1112–1126 (2013).
6. Notta, F. *et al.* Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science* **351**, aab2116 (2016).
7. Pellin, D. *et al.* A comprehensive single cell transcriptional landscape of human hematopoietic progenitors. *Nat. Commun.* **10**, 2395 (2019).
8. Baron, M. H., Isern, J. & Fraser, S. T. The embryonic origins of erythropoiesis in mammals. *Blood* **119**, 4828–4837 (2012).
9. Tavian, M. & Péault, B. Embryonic development of the human hematopoietic system. *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 243–250 (2005).
10. Yoder, M. C. Inducing definitive hematopoiesis in a dish. *Nat. Biotechnol.* **32**, 539–541 (2014).
11. Nandakumar, S. K., Ulirsch, J. C. & Sankaran, V. G. Advances in understanding erythropoiesis: evolving perspectives. *Br. J. Haematol.* **173**, 206–218 (2016).
12. Li, J. *et al.* Isolation and transcriptome analyses of human erythroid progenitors: BFU-E and CFU-E. *Blood* **124**, 3636–3645 (2014).
13. Malleret, B. *et al.* Significant Biochemical, Biophysical and Metabolic Diversity in Circulating Human Cord Blood Reticulocytes. *PLoS ONE* **8**, (2013).

14. Hu, J. *et al.* Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. *Blood* **121**, 3246–3253 (2013).
15. Cook, J. D., Marsaglia, G., Eschbach, J. W., Funk, D. D. & Finch, C. A. Ferrokinetics: a biologic model for plasma iron exchange in man. *J. Clin. Invest.* **49**, 197–205 (1970).
16. Garcia-Santos, D., Schranzhofer, M., Bergeron, R., Sheftel, A. D. & Ponka, P. Extracellular glycine is necessary for optimal hemoglobinization of erythroid cells. *Haematologica* **102**, 1314–1323 (2017).
17. Chiabrando, D. *et al.* The mitochondrial heme exporter FLVCR1b mediates erythroid differentiation. *J. Clin. Invest.* **122**, 4569–4579 (2012).
18. Keel, S. B. *et al.* A Heme Export Protein Is Required for Red Blood Cell Differentiation and Iron Homeostasis. *Science* **319**, 825–828 (2008).
19. Mercurio, S. *et al.* The heme exporter Flvcr1 regulates expansion and differentiation of committed erythroid progenitors by controlling intracellular heme accumulation. *Haematologica* **100**, 720–729 (2015).
20. Garcia-Santos, D. *et al.* Heme oxygenase 1 is expressed in murine erythroid cells where it controls the level of regulatory heme. *Blood* **123**, 2269–2277 (2014).
21. Jorgensen, J. M., Crespo-Bellido, M. & Dewey, K. G. Variation in hemoglobin across the life cycle and between males and females. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2019) doi:10.1111/nyas.14096.
22. Wong, P. *et al.* Gene induction and repression during terminal erythropoiesis are mediated by distinct epigenetic changes. *Blood* **118**, e128–e138 (2011).
23. Popova, E. *et al.* Chromatin condensation in terminally differentiating mouse erythroblasts does not involve special architectural proteins but depends on histone deacetylation. *Chromosome Res.* **17**, 47–64 (2009).
24. Ji, P., Yeh, V., Ramirez, T., Murata-Hori, M. & Lodish, H. F. Histone deacetylase 2 is required for chromatin condensation and subsequent enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts. *Haematologica* **95**, 2013–2021 (2010).

25. Jayapal, S. R. *et al.* Down-regulation of Myc Is Essential for Terminal Erythroid Maturation. *J. Biol. Chem.* **285**, 40252–40265 (2010).
26. Zermati, Y. *et al.* Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J. Exp. Med.* **193**, 247–254 (2001).
27. Dechat, T., Adam, S. A., Taimen, P., Shimi, T. & Goldman, R. D. Nuclear Lamins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a000547 (2010).
28. Krauss, S. W. *et al.* Nuclear substructure reorganization during late-stage erythropoiesis is selective and does not involve caspase cleavage of major nuclear substructural proteins. *Blood* **106**, 2200–2205 (2005).
29. Zhao, B. *et al.* Nuclear Condensation during Mouse Erythropoiesis Requires Caspase-3-Mediated Nuclear Opening. *Dev. Cell* **36**, 498–510 (2016).
30. Gautier, E.-F. *et al.* Comprehensive Proteomic Analysis of Human Erythropoiesis. *Cell Rep.* **16**, 1470–1484 (2016).
31. Thom, C. S. *et al.* Trim58 degrades Dynein and regulates terminal erythropoiesis. *Dev. Cell* **30**, 688–700 (2014).
32. Koury, S. T., Koury, M. J. & Bondurant, M. C. Cytoskeletal distribution and function during the maturation and enucleation of mammalian erythroblasts. *J. Cell Biol.* **109**, 3005–3013 (1989).
33. Konstantinidis, D. G. *et al.* Signaling and cytoskeletal requirements in erythroblast enucleation. *Blood* **119**, 6118–6127 (2012).
34. Ji, P. New insights into the mechanisms of mammalian erythroid chromatin condensation and enucleation. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **316**, 159–182 (2015).
35. Ubukawa, K. *et al.* Enucleation of human erythroblasts involves non-muscle myosin IIB. *Blood* **119**, 1036–1044 (2012).
36. Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R. S. & Horwitz, A. R. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 778–790 (2009).

37. Keerthivasan, G., Small, S., Liu, H., Wickrema, A. & Crispino, J. D. Vesicle trafficking plays a novel role in erythroblast enucleation. *Blood* **116**, 3331–3340 (2010).
38. Yoshida, H. *et al.* Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature* **437**, 754–758 (2005).
39. Chasis, J. A., Prenant, M., Leung, A. & Mohandas, N. Membrane assembly and remodeling during reticulocyte maturation. *Blood* **74**, 1112–1120 (1989).
40. Griffiths, R. E. *et al.* The ins and outs of human reticulocyte maturation. *Autophagy* **8**, 1150–1151 (2012).
41. Ovchynnikova, E., Aglialoro, F., von Lindern, M. & van den Akker, E. The Shape Shifting Story of Reticulocyte Maturation. *Front. Physiol.* **9**, (2018).
42. Moura, P. L. *et al.* Non-muscle Myosin II drives vesicle loss during human reticulocyte maturation. *Haematologica* (2018) doi:10.3324/haematol.2018.199083.
43. Liu, J., Mohandas, N. & An, X. Membrane assembly during erythropoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* **18**, 133–138 (2011).
44. van den Akker, E., Satchwell, T. J., Williamson, R. C. & Toye, A. M. Band 3 multiprotein complexes in the red cell membrane; of mice and men. *Blood Cells. Mol. Dis.* **45**, 1–8 (2010).
45. Liu, J., Guo, X., Mohandas, N., Chasis, J. A. & An, X. Membrane remodeling during reticulocyte maturation. *Blood* **115**, 2021–2027 (2010).
46. Manno, S., Takakuwa, Y. & Mohandas, N. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **280**, 7581–7587 (2005).
47. Korsgren, C., Peters, L. L. & Lux, S. E. Protein 4.2 Binds to the Carboxyl-terminal EF-hands of Erythroid α -Spectrin in a Calcium- and Calmodulin-dependent Manner. *J. Biol. Chem.* **285**, 4757–4770 (2010).
48. Smith, A. S. *et al.* Myosin IIA interacts with the spectrin-actin membrane skeleton to control red blood cell membrane curvature and deformability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E4377–E4385 (2018).

49. Gautier, E.-F. *et al.* Absolute proteome quantification of highly purified populations of circulating reticulocytes and mature erythrocytes. *Blood Adv.* **2**, 2646–2657 (2018).
50. Liu, S. C., Derick, L. H. & Palek, J. Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton. *J. Cell Biol.* **104**, 527–536 (1987).
51. Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* **14**, e1002533 (2016).
52. Walder, J. A. *et al.* The interaction of hemoglobin with the cytoplasmic domain of band 3 of the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* **259**, 10238–10246 (1984).
53. Snyder, L. M. *et al.* Irreversible spectrin-haemoglobin crosslinking in vivo: a marker for red cell senescence. *Br. J. Haematol.* **53**, 379–384 (1983).
54. Fortier, N. *et al.* The relationship between in vivo generated hemoglobin skeletal protein complex and increased red cell membrane rigidity. *Blood* **71**, 1427–1431 (1988).
55. Ogawa, M. *et al.* Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med.* **174**, 63–71 (1991).
56. Heinrich, M. C. *et al.* Constitutive expression of steel factor gene by human stromal cells. *Blood* **82**, 771–783 (1993).
57. Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R. & Lodish, H. F. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* **83**, 59–67 (1995).
58. Lacombe, C. *et al.* Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J. Clin. Invest.* **81**, 620–623 (1988).
59. Storti, F. *et al.* A novel distal upstream hypoxia response element regulating oxygen-dependent erythropoietin gene expression. *Haematologica* **99**, e45–e48 (2014).
60. Witthuhn, B. A. *et al.* JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* **74**, 227–236 (1993).
61. Richmond, T. D., Chohan, M. & Barber, D. L. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol.* **15**, 146–155 (2005).

62. Socolovsky, M. *et al.* Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood* **98**, 3261–3273 (2001).
63. Sarna, M. K. *et al.* Differential regulation of SOCS genes in normal and transformed erythroid cells. *Oncogene* **22**, 3221–3230 (2003).
64. Hom, J., Dulmovits, B. M., Mohandas, N. & Blanc, L. The erythroblastic island as an emerging paradigm in the anemia of inflammation. *Immunol. Res.* **63**, 75–89 (2015).
65. Yokoyama, T., Etoh, T., Kitagawa, H., Tsukahara, S. & Kannan, Y. Migration of erythroblastic islands toward the sinusoid as erythroid maturation proceeds in rat bone marrow. *J. Vet. Med. Sci.* **65**, 449–452 (2003).
66. Soni, S. *et al.* Absence of erythroblast macrophage protein (Emp) leads to failure of erythroblast nuclear extrusion. *J. Biol. Chem.* **281**, 20181–20189 (2006).
67. Hanspal, M. & Hanspal, J. S. The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation: a 30-kD heparin-binding protein is involved in this contact. *Blood* **84**, 3494–3504 (1994).
68. Hanspal, M., Smockova, Y. & Uong, Q. Molecular Identification and Functional Characterization of a Novel Protein That Mediates the Attachment of Erythroblasts to Macrophages. *Blood* **92**, 2940–2950 (1998).
69. Sadahira, Y., Yoshino, T. & Monobe, Y. Very late activation antigen 4-vascular cell adhesion molecule 1 interaction is involved in the formation of erythroblastic islands. *J. Exp. Med.* **181**, 411–415 (1995).
70. Fabriek, B. O. *et al.* The macrophage CD163 surface glycoprotein is an erythroblast adhesion receptor. *Blood* **109**, 5223–5229 (2007).
71. Kristiansen, M. *et al.* Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* **409**, 198–201 (2001).
72. Skutelsky, E. & Danon, D. On the expulsion of the erythroid nucleus and its phagocytosis. *Anat. Rec.* **173**, 123–126 (1972).

73. Rhodes, M. M., Kopsombut, P., Bondurant, M. C., Price, J. O. & Koury, M. J. Adherence to macrophages in erythroblastic islands enhances erythroblast proliferation and increases erythrocyte production by a different mechanism than erythropoietin. *Blood* **111**, 1700–1708 (2008).
74. Felli, N. *et al.* Multiple members of the TNF superfamily contribute to IFN-gamma-mediated inhibition of erythropoiesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 1464–1472 (2005).
75. De Maria, R. *et al.* Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* **401**, 489–493 (1999).
76. Ribeil, J.-A. *et al.* Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* **445**, 102–105 (2007).
77. Carlile, G. W., Smith, D. H. & Wiedmann, M. Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. *Blood* **103**, 4310–4316 (2004).
78. Boehm, D. *et al.* Caspase-3 Is Involved in the Signalling in Erythroid Differentiation by Targeting Late Progenitors. *PLoS ONE* **8**, (2013).
79. Gabet, A.-S. *et al.* Caspase-activated ROCK-1 allows erythroblast terminal maturation independently of cytokine-induced Rho signaling. *Cell Death Differ.* **18**, 678–689 (2011).
80. Peslak, S. A. *et al.* Sublethal radiation injury uncovers a functional transition during erythroid maturation. *Exp. Hematol.* **39**, 434–445 (2011).
81. De Maria, R. *et al.* Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood* **93**, 796–803 (1999).
82. Chow, A. *et al.* CD169⁺ macrophages provide a niche promoting erythropoiesis under homeostasis and stress. *Nat. Med.* **19**, 429–436 (2013).
83. Wontakal, S. N. *et al.* A Large Gene Network in Immature Erythroid Cells Is Controlled by the Myeloid and B Cell Transcriptional Regulator PU.1. *PLOS Genet.* **7**, e1001392 (2011).
84. Doré, L. C. & Crispino, J. D. Transcription factor networks in erythroid cell and megakaryocyte development. *Blood* **118**, 231–239 (2011).

85. Ferreira, R., Ohneda, K., Yamamoto, M. & Philipsen, S. GATA1 Function, a Paradigm for Transcription Factors in Hematopoiesis. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 1215–1227 (2005).
86. Nerlov, C., Querfurth, E., Kulesa, H. & Graf, T. GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. *Blood* **95**, 2543–2551 (2000).
87. Wontakal, S. N. *et al.* A core erythroid transcriptional network is repressed by a master regulator of myelo-lymphoid differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 3832–3837 (2012).
88. Kim, Y. W., Yun, W. J. & Kim, A. Erythroid activator NF-E2, TAL1 and KLF1 play roles in forming the LCR HSs in the human adult β -globin locus. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **75**, 45–52 (2016).
89. An, X. *et al.* Global transcriptome analyses of human and murine terminal erythroid differentiation. *Blood* **123**, 3466–3477 (2014).
90. Nakamura, T., Naguro, I. & Ichijo, H. Iron homeostasis and iron-regulated ROS in cell death, senescence and human diseases. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1863**, 1398–1409 (2019).
91. Chen, Y., Fan, Z., Yang, Y. & Gu, C. Iron metabolism and its contribution to cancer (Review). *Int. J. Oncol.* **54**, 1143–1154 (2019).
92. Evstatiev, R. & Gasche, C. Iron sensing and signalling. *Gut* **61**, 933–952 (2012).
93. McKie, A. T. *et al.* An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* **291**, 1755–1759 (2001).
94. Yanatori, I. & Kishi, F. DMT1 and iron transport. *Free Radic. Biol. Med.* **133**, 55–63 (2019).
95. Liu, X. & Theil, E. C. Ferritins: dynamic management of biological iron and oxygen chemistry. *Acc. Chem. Res.* **38**, 167–175 (2005).
96. Torti, F. M. & Torti, S. V. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* **99**, 3505–3516 (2002).
97. Mayle, K. M., Le, A. M. & Kamei, D. T. The Intracellular Trafficking Pathway of Transferrin. *Biochim. Biophys. Acta* **1820**, 264–281 (2012).
98. Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A. & Lodish, H. F. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 2258–2262 (1983).

99. Ciechanover, A., Schwartz, A. L., Dautry-Varsat, A. & Lodish, H. F. Kinetics of internalization and recycling of transferrin and the transferrin receptor in a human hepatoma cell line. Effect of lysosomotropic agents. *J. Biol. Chem.* **258**, 9681–9689 (1983).
100. Ohgami, R. S. *et al.* Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat. Genet.* **37**, 1264–1269 (2005).
101. Richardson, D. R. *et al.* Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 10775–10782 (2010).
102. Low, P. S., Waugh, S. M., Zinke, K. & Drenckhahn, D. The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. *Science* **227**, 531–533 (1985).
103. Burger, P., Hilarius-Stokman, P., Korte, D. de, Berg, T. K. van den & Bruggen, R. van. CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis. *Blood* **119**, 5512–5521 (2012).
104. Theurl, I. *et al.* On-demand erythrocyte disposal and iron recycling requires transient macrophages in the liver. *Nat. Med.* **22**, 945–951 (2016).
105. Truman-Rosentsvit, M. *et al.* Ferritin is secreted via 2 distinct nonclassical vesicular pathways. *Blood* **131**, 342–352 (2018).
106. Sibille, J. C., Kondo, H. & Aisen, P. Interactions between isolated hepatocytes and Kupffer cells in iron metabolism: a possible role for ferritin as an iron carrier protein. *Hepatology. Baltim. Md* **8**, 296–301 (1988).
107. Leimberg, J. M., Konijn, A. M. & Fibach, E. Macrophages promote development of human erythroid precursors in transferrin-free culture medium. *Hematol. Amst. Neth.* **10**, 73–76 (2005).
108. Li, L. *et al.* Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 3505–3510 (2010).
109. Ludwiczek, S., Aigner, E., Theurl, I. & Weiss, G. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood* **101**, 4148–4154 (2003).
110. Bessis, M. C. & Breton-Gorius, J. Iron Metabolism in the Bone Marrow as Seen by Electron Microscopy: A Critical Review. *Blood* **19**, 635–663 (1962).

111. de Back, D. Z., Kostova, E. B., van Kraaij, M., van den Berg, T. K. & Van Bruggen, R. Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Front. Physiol.* **5**, (2014).
112. Leimberg, M. J., Prus, E., Konijn, A. M. & Fibach, E. Macrophages function as a ferritin iron source for cultured human erythroid precursors. *J. Cell. Biochem.* **103**, 1211–1218 (2008).
113. Wilkinson, N. & Pantopoulos, K. The IRP/IRE system in vivo: insights from mouse models. *Front. Pharmacol.* **5**, (2014).
114. Jiao, Q., Du, X., Wei, J., Li, Y. & Jiang, H. Oxidative Stress Regulated Iron Regulatory Protein IRP2 Through FBXL5-Mediated Ubiquitination-Proteasome Way in SH-SY5Y Cells. *Front. Neurosci.* **13**, 20 (2019).
115. Moroishi, T., Nishiyama, M., Takeda, Y., Iwai, K. & Nakayama, K. I. The FBXL5-IRP2 axis is integral to control of iron metabolism in vivo. *Cell Metab.* **14**, 339–351 (2011).
116. Zhang, D.-L., Hughes, R. M., Ollivierre-Wilson, H., Ghosh, M. C. & Rouault, T. A. A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and erythroid precursor cells to evade translational repression. *Cell Metab.* **9**, 461–473 (2009).
117. Cianetti, L. *et al.* Expression of alternative transcripts of ferroportin-1 during human erythroid differentiation. *Haematologica* **90**, 1595–1606 (2005).
118. Cmejla, R., Petrak, J. & Cmejlova, J. A novel iron responsive element in the 3'UTR of human MRCK α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 158–166 (2006).
119. Muckenthaler, M. U., Galy, B. & Hentze, M. W. Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu. Rev. Nutr.* **28**, 197–213 (2008).
120. Igarashi, K. & Sun, J. The heme-Bach1 pathway in the regulation of oxidative stress response and erythroid differentiation. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 107–118 (2006).
121. Jyrkkänen, H.-K. *et al.* Novel insights into the regulation of antioxidant-response-element-mediated gene expression by electrophiles: induction of the transcriptional repressor BACH1 by Nrf2. *Biochem. J.* **440**, 167–174 (2011).

122. Hintze, K. J., Katoh, Y., Igarashi, K. & Theil, E. C. Bach1 repression of ferritin and thioredoxin reductase1 is heme-sensitive in cells and in vitro and coordinates expression with heme oxygenase1, beta-globin, and NADP(H) quinone (oxido) reductase1. *J. Biol. Chem.* **282**, 34365–34371 (2007).
123. Marro, S. *et al.* Heme controls ferroportin1 (FPN1) transcription involving Bach1, Nrf2 and a MARE/ARE sequence motif at position -7007 of the FPN1 promoter. *Haematologica* **95**, 1261–1268 (2010).
124. Donovan, A. *et al.* The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab.* **1**, 191–200 (2005).
125. Aschemeyer, S. *et al.* Structure-function analysis of ferroportin defines the binding site and an alternative mechanism of action of hepcidin. *Blood* **131**, 899–910 (2018).
126. Nemeth, E. *et al.* Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* **306**, 2090–2093 (2004).
127. Nicolas, G. *et al.* The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J. Clin. Invest.* **110**, 1037–1044 (2002).
128. Kong, W.-N. *et al.* Sex differences in iron status and hepcidin expression in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **160**, 258–267 (2014).
129. Canali, S. *et al.* Endothelial cells produce bone morphogenetic protein 6 required for iron homeostasis in mice. *Blood* **129**, 405–414 (2017).
130. Canali, S., Wang, C.-Y., Zumbrennen-Bullough, K. B., Bayer, A. & Babitt, J. L. Bone morphogenetic protein 2 controls iron homeostasis in mice independent of Bmp6. *Am. J. Hematol.* **92**, 1204–1213 (2017).
131. Lim, P. J. *et al.* Nrf2 controls iron homeostasis in haemochromatosis and thalassaemia via Bmp6 and hepcidin. *Nat. Metab.* **1**, 519–531 (2019).
132. Andriopoulos, B. *et al.* BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat. Genet.* **41**, 482–487 (2009).

133. Babitt, J. L. *et al.* Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat. Genet.* **38**, 531–539 (2006).
134. Steinbicker, A. U. *et al.* Perturbation of hepcidin expression by BMP type I receptor deletion induces iron overload in mice. *Blood* **118**, 4224–4230 (2011).
135. Mayeur, C., Leyton, P. A., Kolodziej, S. A., Yu, B. & Bloch, K. D. BMP type II receptors have redundant roles in the regulation of hepatic hepcidin gene expression and iron metabolism. *Blood* **124**, 2116–2123 (2014).
136. Wang, R.-H. *et al.* A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab.* **2**, 399–409 (2005).
137. Zhang, A.-S., Yang, F., Wang, J., Tsukamoto, H. & Enns, C. A. Hemojuvelin-Neogenin Interaction Is Required for Bone Morphogenetic Protein-4-induced Hepcidin Expression. *J. Biol. Chem.* **284**, 22580–22589 (2009).
138. Zhao, N. *et al.* Neogenin Facilitates the Induction of Hepcidin Expression by Hemojuvelin in the Liver. *J. Biol. Chem.* **291**, 12322–12335 (2016).
139. Meynard, D. *et al.* Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat. Genet.* **41**, 478–481 (2009).
140. Silvestri, L., Pagani, A. & Camaschella, C. Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. *Blood* **111**, 924–931 (2008).
141. Wahedi, M. *et al.* Matriptase-2 suppresses hepcidin expression by cleaving multiple components of the hepcidin induction pathway. *J. Biol. Chem.* **292**, 18354–18371 (2017).
142. Enns, C. A., Ahmed, R. & Zhang, A.-S. Neogenin interacts with matriptase-2 to facilitate hemojuvelin cleavage. *J. Biol. Chem.* **287**, 35104–35117 (2012).
143. Silvestri, L. *et al.* The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab.* **8**, 502–511 (2008).
144. Rausa, M. *et al.* Identification of TMPRSS6 cleavage sites of hemojuvelin. *J. Cell. Mol. Med.* **19**, 879–888 (2015).

145. West, A. P. *et al.* Comparison of the Interactions of Transferrin Receptor and Transferrin Receptor 2 with Transferrin and the Hereditary Hemochromatosis Protein HFE. *J. Biol. Chem.* **275**, 38135–38138 (2000).
146. Johnson, M. B., Chen, J., Murchison, N., Green, F. A. & Enns, C. A. Transferrin receptor 2: evidence for ligand-induced stabilization and redirection to a recycling pathway. *Mol. Biol. Cell* **18**, 743–754 (2007).
147. Giannetti, A. M. & Björkman, P. J. HFE and transferrin directly compete for transferrin receptor in solution and at the cell surface. *J. Biol. Chem.* **279**, 25866–25875 (2004).
148. Goswami, T. & Andrews, N. C. Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *J. Biol. Chem.* **281**, 28494–28498 (2006).
149. Schmidt, P. J., Toran, P. T., Giannetti, A. M., Bjorkman, P. J. & Andrews, N. C. The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab.* **7**, 205–214 (2008).
150. Gao, J. *et al.* Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab.* **9**, 217–227 (2009).
151. Rishi, G., Crampton, E. M., Wallace, D. F. & Subramaniam, V. N. In Situ Proximity Ligation Assays Indicate That Hemochromatosis Proteins Hfe and Transferrin Receptor 2 (Tfr2) Do Not Interact. *PLoS ONE* **8**, (2013).
152. Schmidt, P. J. & Fleming, M. D. Transgenic HFE-dependent induction of hepcidin in mice does not require transferrin receptor-2. *Am. J. Hematol.* **87**, 588–595 (2012).
153. Corradini, E. *et al.* Iron regulation of hepcidin despite attenuated Smad1,5,8 signaling in mice without transferrin receptor 2 or Hfe. *Gastroenterology* **141**, 1907–1914 (2011).
154. Wallace, D. F. *et al.* Combined deletion of Hfe and transferrin receptor 2 in mice leads to marked dysregulation of hepcidin and iron overload. *Hepatology. Baltim. Md* **50**, 1992–2000 (2009).

155. Poli, M. *et al.* Transferrin receptor 2 and HFE regulate furin expression via mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/Erk) signaling. Implications for transferrin-dependent hepcidin regulation. *Haematologica* **95**, 1832–1840 (2010).
156. D’Alessio, F., Hentze, M. W. & Muckenthaler, M. U. The hemochromatosis proteins HFE, Tfr2, and HJV form a membrane-associated protein complex for hepcidin regulation. *J. Hepatol.* **57**, 1052–1060 (2012).
157. Schmidt, P. J., Andrews, N. C. & Fleming, M. D. Hepcidin induction by transgenic overexpression of Hfe does not require the Hfe cytoplasmic tail, but does require hemojuvelin. *Blood* **116**, 5679–5687 (2010).
158. Wrighting, D. M. & Andrews, N. C. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* **108**, 3204–3209 (2006).
159. Armitage, A. E. *et al.* Hepcidin regulation by innate immune and infectious stimuli. *Blood* **118**, 4129–4139 (2011).
160. Mayeur, C. *et al.* The type I BMP receptor Alk3 is required for the induction of hepatic hepcidin gene expression by interleukin-6. *Blood* **123**, 2261–2268 (2014).
161. Chung, B. *et al.* Oncostatin M is a potent inducer of hepcidin, the iron regulatory hormone. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **24**, 2093–2103 (2010).
162. Kautz, L. *et al.* IDENTIFICATION OF ERYTHROFERRONE AS AN ERYTHROID REGULATOR OF IRON METABOLISM. *Nat. Genet.* **46**, 678–684 (2014).
163. Arezes, J. *et al.* Erythroferrone inhibits the induction of hepcidin by BMP6. *Blood* **132**, 1473–1477 (2018).
164. Aschemeyer, S., Gabayan, V., Ganz, T., Nemeth, E. & Kautz, L. Erythroferrone and matriptase-2 independently regulate hepcidin expression. *Am. J. Hematol.* **92**, E61–E63 (2017).
165. Nai, A. *et al.* Limiting hepatic Bmp-Smad signaling by matriptase-2 is required for erythropoietin-mediated hepcidin suppression in mice. *Blood* **127**, 2327–2336 (2016).

166. Tanno, T. *et al.* High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat. Med.* **13**, 1096–1101 (2007).
167. Forejtníková, H. *et al.* Transferrin receptor 2 is a component of the erythropoietin receptor complex and is required for efficient erythropoiesis. *Blood* **116**, 5357–5367 (2010).
168. Tanno, T., Noel, P. & Miller, J. L. Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease. *Curr. Opin. Hematol.* **17**, 184–190 (2010).
169. Tanno, T. *et al.* Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood* **114**, 181–186 (2009).
170. Berra, E. *et al.* HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO J.* **22**, 4082–4090 (2003).
171. Finberg, K. E. Regulation of systemic iron homeostasis. *Curr. Opin. Hematol.* **20**, 208–214 (2013).
172. Maurer, E., Gütschow, M. & Stirnberg, M. Matriptase-2 (TMPRSS6) is directly up-regulated by hypoxia inducible factor-1: identification of a hypoxia-responsive element in the TMPRSS6 promoter region. *Biol. Chem.* **393**, 535–540 (2012).
173. Zhang, D.-L. & Rouault, T. A. How does hepcidin hinder ferroportin activity? *Blood* **131**, 840–842 (2018).
174. Zhang, D.-L. *et al.* Hepcidin regulates ferroportin expression and intracellular iron homeostasis of erythroblasts. *Blood* **118**, 2868–2877 (2011).
175. Cianetti, L., Gabbianelli, M. & Sposi, N. M. Ferroportin and erythroid cells: an update. *Adv. Hematol.* **2010**, (2010).
176. Ganz, T. Erythrocytes and erythroblasts give up iron. *Blood* **132**, 2004–2005 (2018).
177. Zhang, D.-L., Ghosh, M. C., Ollivierre, H., Li, Y. & Rouault, T. A. Ferroportin deficiency in erythroid cells causes serum iron deficiency and promotes hemolysis due to oxidative stress. *Blood* **132**, 2078–2087 (2018).
178. Zhang, D.-L. *et al.* Erythrocytic ferroportin reduces intracellular iron accumulation, hemolysis, and malaria risk. *Science* **359**, 1520–1523 (2018).

179. Porter, J. L. & Rawla, P. Hemochromatosis. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2019).
180. Brissot, P., Cavey, T., Ropert, M., Guggenbuhl, P. & Loréal, O. Genetic hemochromatosis: Pathophysiology, diagnostic and therapeutic management. *Presse Medicale Paris Fr. 1983* **46**, e288–e295 (2017).
181. Brissot, P., Ropert, M., Le Lan, C. & Loréal, O. Non-transferrin bound iron: A key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1820**, 403–410 (2012).
182. Ramakrishna, G. *et al.* From Cirrhosis to Hepatocellular Carcinoma: New Molecular Insights on Inflammation and Cellular Senescence. *Liver Cancer* **2**, 367–383 (2013).
183. Martin, M. G. & Arcasoy, M. O. Deferasirox versus deferoxamine. *Blood* **108**, 774–776 (2006).
184. Galanello, R. & Origa, R. Beta-thalassemia. *Orphanet J. Rare Dis.* **5**, 11 (2010).
185. Ribeil, J.-A. *et al.* Ineffective erythropoiesis in β -thalassemia. *ScientificWorldJournal* **2013**, 394295 (2013).
186. Kautz, L. *et al.* Erythroferrone contributes to hepcidin suppression and iron overload in a mouse model of β -thalassemia. *Blood* **126**, 2031–2037 (2015).
187. Moura, I. C. & Hermine, O. Erythroferrone: the missing link in β -thalassemia? *Blood* **126**, 1974–1975 (2015).
188. Du, X. *et al.* The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. *Science* **320**, 1088–1092 (2008).
189. Folgueras, A. R. *et al.* Membrane-bound serine protease matriptase-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis. *Blood* **112**, 2539–2545 (2008).
190. Finberg, K. E. *et al.* Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat. Genet.* **40**, 569–571 (2008).
191. Li, Q., Liang, F., Liang, W., Shi, W. & Han, Y. Prevalence of Anemia and Its Associated Risk Factors Among 6-Months-Old Infants in Beijing. *Front. Pediatr.* **7**, (2019).

192. Biasiotto, G. *et al.* Identification of New Mutations of the HFE, Hpcidin, and Transferrin Receptor 2 Genes by Denaturing HPLC Analysis of Individuals with Biochemical Indications of Iron Overload. *Clin. Chem.* **49**, 1981–1988 (2003).
193. Wallace, D. F. *et al.* Hemojuvelin (HJV)-associated hemochromatosis: analysis of HJV and HFE mutations and iron overload in three families. *Haematologica* **90**, 254–255 (2005).
194. Bardou-Jacquet, E. *et al.* Variable age of onset and clinical severity in transferrin receptor 2 related haemochromatosis: novel observations. *Br. J. Haematol.* **162**, 278–281 (2013).
195. Fleming, R. E. *et al.* Targeted mutagenesis of the murine transferrin receptor-2 gene produces hemochromatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 10653–10658 (2002).
196. Camaschella, C. *et al.* The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat. Genet.* **25**, 14–15 (2000).
197. Zhang, W., Lv, T., Huang, J. & Ou, X. Type 4B hereditary hemochromatosis associated with a novel mutation in the SLC40A1 gene: A case report and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* **96**, e8064 (2017).
198. Kawabata, H. *et al.* Molecular Cloning of Transferrin Receptor 2 A NEW MEMBER OF THE TRANSFERRIN RECEPTOR-LIKE FAMILY. *J. Biol. Chem.* **274**, 20826–20832 (1999).
199. Kawabata, H. Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radic. Biol. Med.* **133**, 46–54 (2019).
200. Glöckner, G. *et al.* Large-Scale Sequencing of Two Regions in Human Chromosome 7q22: Analysis of 650 kb of Genomic Sequence around the EPO and CUTL1 Loci Reveals 17 Genes. *Genome Res.* **8**, 1060–1073 (1998).
201. Kawabata, H. *et al.* Regulation of expression of murine transferrin receptor 2. *Blood* **98**, 1949–1954 (2001).
202. Matsuo, S. *et al.* Hepatocyte Nuclear Factor 4 α Controls Iron Metabolism and Regulates Transferrin Receptor 2 in Mouse Liver. *J. Biol. Chem.* **290**, 30855–30865 (2015).
203. Silvestri, L., Nai, A., Pagani, A. & Camaschella, C. The extrahepatic role of TFR2 in iron homeostasis. *Front. Pharmacol.* **5**, 93 (2014).

204. Robb, A. & Wessling-Resnick, M. Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin. *Blood* **104**, 4294–4299 (2004).
205. Takami, T. & Sakaida, I. Iron regulation by hepatocytes and free radicals. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **48**, 103–106 (2011).
206. Kawabata, H. *et al.* Expression of transferrin receptor 2 in normal and neoplastic hematopoietic cells. *Blood* **98**, 2714–2719 (2001).
207. Rishi, G., Secondes, E. S., Wallace, D. F. & Subramaniam, V. N. Normal systemic iron homeostasis in mice with macrophage-specific deletion of transferrin receptor 2. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **310**, G171–G180 (2016).
208. Acikyol, B. *et al.* Brain transcriptome perturbations in the transferrin receptor 2 mutant mouse support the case for brain changes in iron loading disorders, including effects relating to long-term depression and long-term potentiation. *Neuroscience* **235**, 119–128 (2013).
209. Pellegrino, R. M. *et al.* Transferrin Receptor 2 Dependent Alterations of Brain Iron Metabolism Affect Anxiety Circuits in the Mouse. *Sci. Rep.* **6**, 30725 (2016).
210. Hänninen, M. M. *et al.* Expression of iron-related genes in human brain and brain tumors. *BMC Neurosci.* **10**, 36 (2009).
211. Griffiths, W. J. H. & Cox, T. M. Co-localization of the mammalian hemochromatosis gene product (HFE) and a newly identified transferrin receptor (TfR2) in intestinal tissue and cells. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **51**, 613–624 (2003).
212. Calzolari, A. *et al.* TfR2 expression in human colon carcinomas. *Blood Cells. Mol. Dis.* **43**, 243–249 (2009).
213. Boero, M. *et al.* A comparative study of myocardial molecular phenotypes of two *tfr2* β null mice: role in ischemia/reperfusion. *BioFactors Oxf. Engl.* **41**, 360–371 (2015).
214. Collawn, J. F. *et al.* Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis. *Cell* **63**, 1061–1072 (1990).

215. Mastroberardino, P. G. *et al.* A novel transferrin/TfR2-mediated mitochondrial iron transport system is disrupted in Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **34**, 417–431 (2009).
216. Zhao, N. & Enns, C. A. N-linked glycosylation is required for transferrin-induced stabilization of transferrin receptor 2, but not for transferrin binding or trafficking to the cell surface. *Biochemistry* **52**, 3310–3319 (2013).
217. Dubljevic, V., Sali, A. & Goding, J. W. A conserved RGD (Arg-Gly-Asp) motif in the transferrin receptor is required for binding to transferrin. *Biochem. J.* **341**, 11–14 (1999).
218. Kleven, M. D., Jue, S. & Enns, C. A. The Transferrin Receptors, TfR1 and TfR2 Bind Transferrin through Differing Mechanisms. *Biochemistry* **57**, 1552–1559 (2018).
219. Pagani, A. *et al.* Regulation of cell surface transferrin receptor-2 by iron-dependent cleavage and release of a soluble form. *Haematologica* **100**, 458–465 (2015).
220. Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31–39 (2000).
221. Johnson, M. B. & Enns, C. A. Diferric transferrin regulates transferrin receptor 2 protein stability. *Blood* **104**, 4287–4293 (2004).
222. Chen, J. & Enns, C. A. The Cytoplasmic domain of transferrin receptor 2 dictates its stability and response to holo-transferrin in Hep3B cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 6201–6209 (2007).
223. Chen, J., Wang, J., Meyers, K. R. & Enns, C. A. Transferrin-directed internalization and cycling of transferrin receptor 2. *Traffic Cph. Den.* **10**, 1488–1501 (2009).
224. Chen, J. & Enns, C. A. CD81 promotes both the degradation of transferrin receptor 2 (TfR2) and the TfR2-mediated maintenance of hepcidin expression. *J. Biol. Chem.* **290**, 7841–7850 (2015).
225. Khalil, S. *et al.* Iron modulation of erythropoiesis is associated with Scribble-mediated control of the erythropoietin receptor. *J. Exp. Med.* **215**, 661–679 (2018).
226. Zhao, T. *et al.* Central role of mitofusin 2 in autophagosome-lysosome fusion in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* **287**, 23615–23625 (2012).

227. Khalil, S. *et al.* A specialized pathway for erythroid iron delivery through lysosomal trafficking of transferrin receptor 2. *Blood Adv.* **1**, 1181–1194 (2017).
228. Calzolari, A. *et al.* TfR2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. *J. Cell Sci.* **119**, 4486–4498 (2006).
229. Calzolari, A. *et al.* Transferrin receptor 2 is frequently and highly expressed in glioblastomas. *Transl. Oncol.* **3**, 123–134 (2010).
230. Rauner, M. *et al.* Transferrin receptor 2 controls bone mass and pathological bone formation via BMP and Wnt signaling. *Nat. Metab.* **1**, 111–124 (2019).
231. Latour, C. *et al.* Differing impact of the deletion of hemochromatosis-associated molecules HFE and transferrin receptor-2 on the iron phenotype of mice lacking bone morphogenetic protein 6 or hemojuvelin. *Hepatology* **63**, 126–137 (2016).
232. Levy, J. E., Jin, O., Fujiwara, Y., Kuo, F. & Andrews, N. C. Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nat. Genet.* **21**, 396–399 (1999).
233. Robb, A. D., Ericsson, M. & Wessling-Resnick, M. Transferrin receptor 2 mediates a biphasic pattern of transferrin uptake associated with ligand delivery to multivesicular bodies. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **287**, C1769–C1775 (2004).
234. Roetto, A. *et al.* Comparison of 3 Tfr2-deficient murine models suggests distinct functions for Tfr2-alpha and Tfr2-beta isoforms in different tissues. *Blood* **115**, 3382–3389 (2010).
235. Nai, A. *et al.* The erythroid function of transferrin receptor 2 revealed by Tmprss6 inactivation in different models of transferrin receptor 2 knockout mice. *Haematologica* **99**, 1016–1021 (2014).
236. Fleming, R. E., Feng, Q. & Britton, R. S. Knockout mouse models of iron homeostasis. *Annu. Rev. Nutr.* **31**, 117–137 (2011).
237. Xiao, W. *et al.* Iron overload increases osteoclastogenesis and aggravates the effects of ovariectomy on bone mass. *J. Endocrinol.* **226**, 121–134 (2015).

238. Gunton, J. E., Gates, F., Fulcher, G. R. & Clifton-Bligh, P. B. Bone Mineral Density in Postmenopausal Women Heterozygous for the C282Y HFE Mutation. *J. Osteoporos.* **2016**, 5638273 (2016).
239. Valenti, L. *et al.* Association between iron overload and osteoporosis in patients with hereditary hemochromatosis. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA* **20**, 549–555 (2009).
240. Lakhal-Littleton, S. *et al.* Cardiac ferroportin regulates cellular iron homeostasis and is important for cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 3164–3169 (2015).
241. Pfefferbaum, A., Adalsteinsson, E., Rohlfing, T. & Sullivan, E. V. MRI estimates of brain iron concentration in normal aging: comparison of field-dependent (FDRI) and phase (SWI) methods. *NeuroImage* **47**, 493–500 (2009).
242. Wang, Y., Wu, Y., Li, T., Wang, X. & Zhu, C. Iron Metabolism and Brain Development in Premature Infants. *Front. Physiol.* **10**, 463 (2019).
243. Soranzo, N. *et al.* A genome-wide meta-analysis identifies 22 loci associated with eight hematological parameters in the HaemGen consortium. *Nat. Genet.* **41**, 1182–1190 (2009).
244. Auer, P. L. *et al.* Rare and low-frequency coding variants in CXCR2 and other genes are associated with hematological traits. *Nat. Genet.* **46**, 629–634 (2014).
245. Ganesh, S. K. *et al.* Multiple loci influence erythrocyte phenotypes in the CHARGE Consortium. *Nat. Genet.* **41**, 1191–1198 (2009).
246. Lee, P., Hsu, M.-H., Welser-Alves, J. & Peng, H. Severe Microcytic Anemia but Increased Erythropoiesis in Mice Lacking Hfe or Tfr2 and Tmprss6. *Blood Cells Mol Dis* 173–178 (2012).
247. DF, W. *et al.* A critical role for murine transferrin receptor 2 in erythropoiesis during iron restriction. *Br J Haematol* 891–901 (2015).
248. Nai, A. *et al.* The second transferrin receptor regulates red blood cell production in mice. *Blood* **125**, 1170–1179 (2015).

249. Abram, C. L., Roberge, G. L., Hu, Y. & Lowell, C. A. Comparative analysis of the efficiency and specificity of myeloid-Cre deleting strains using ROSA-EYFP reporter mice. *J. Immunol. Methods* **408**, 89–100 (2014).
250. Rishi, G., Secondes, E. S., Wallace, D. F. & Subramaniam, V. N. Hematopoietic deletion of Transferrin Receptor 2 in mice leads to a block in erythroid differentiation during iron-deficient anemia. *Am. J. Hematol.* n/a-n/a (2016) doi:10.1002/ajh.24417.
251. Ravasi, G. *et al.* Transferrin receptor 2 mutations in patients with juvenile hemochromatosis phenotype. *Am. J. Hematol.* **90**, E226–E227 (2015).
252. Kawabata, H. *et al.* Expression of hepcidin is down-regulated in Tfr2 mutant mice manifesting a phenotype of hereditary hemochromatosis. *Blood* **105**, 376–381 (2005).
253. Majore, S. *et al.* Homozygous p.M172K mutation of the TFR2 gene in an Italian family with type 3 hereditary hemochromatosis and early onset iron overload. *Haematologica* **91**, ECR33 (2006).
254. Roetto, A. *et al.* New mutations inactivating transferrin receptor 2 in hemochromatosis type 3. *Blood* **97**, 2555–2560 (2001).
255. Calzolari, A. *et al.* Transferrin receptor 2 is frequently expressed in human cancer cell lines. *Blood Cells. Mol. Dis.* **39**, 82–91 (2007).
256. Smilevska, T. *et al.* Transferrin receptor-1 and 2 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Res.* **30**, 183–189 (2006).
257. Sakurai, K. *et al.* Immunohistochemical demonstration of transferrin receptor 1 and 2 in human hepatocellular carcinoma tissue. *Hepatology*. **61**, 426–430 (2014).
258. Di Savino, A. *et al.* Clinical significance of TFR2 and EPOR expression in bone marrow cells in myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* **176**, 491–495 (2017).
259. Nakamaki, T. *et al.* Elevated levels of transferrin receptor 2 mRNA, not transferrin receptor 1 mRNA, are associated with increased survival in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **125**, 42–49 (2004).

260. Artuso, I. *et al.* Transferrin Receptor 2 is a potential novel therapeutic target for beta-thalassemia: evidence from a murine model. *Blood* blood-2018-05-852277 (2018) doi:10.1182/blood-2018-05-852277.
261. Richard, F. *et al.* Oral ferroportin inhibitor VIT-2763: first-in-human, Phase 1 study in healthy volunteers. *Am. J. Hematol.* (2019) doi:10.1002/ajh.25670.
262. Crespo, Â. C. *et al.* Genetic and biochemical markers in patients with Alzheimer's disease support a concerted systemic iron homeostasis dysregulation. *Neurobiol. Aging* **35**, 777–785 (2014).
263. Rhodes, S. L. *et al.* Pooled analysis of iron-related genes in Parkinson's disease: association with transferrin. *Neurobiol. Dis.* **62**, 172–178 (2014).
264. Gannon, F. H. *et al.* Bone morphogenetic protein 2/4 in early fibromatous lesions of fibrodysplasia ossificans progressiva. *Hum. Pathol.* **28**, 339–343 (1997).
265. Hiroyama, T. *et al.* Establishment of mouse embryonic stem cell-derived erythroid progenitor cell lines able to produce functional red blood cells. *PLoS One* **3**, e1544 (2008).
266. Mayeux, P., Billat, C. & Jacquot, R. The erythropoietin receptor of rat erythroid progenitor lens. Characterization and affinity cross-linkage. *J. Biol. Chem.* **262**, 13985–13990 (1987).
267. Ganz, T. & Nemeth, E. Iron Metabolism: Interactions with Normal and Disordered Erythropoiesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a011668 (2012).
268. Leung, T., Chen, X. Q., Tan, I., Manser, E. & Lim, L. Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 130–140 (1998).
269. Chan, W. *et al.* Myosin II Regulatory Light Chain Is Required for Trafficking of Bile Salt Export Protein to the Apical Membrane in Madin-Darby Canine Kidney Cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 23741–23747 (2005).
270. Chandrasekar, I. *et al.* Nonmuscle Myosin II is a Critical Regulator of Clathrin Mediated Endocytosis. *Traffic Cph. Den.* **15**, 418–432 (2014).

271. Cmejla, R. *et al.* Human MRCK α is regulated by cellular iron levels and interferes with transferrin iron uptake. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **395**, 163–167 (2010).
272. Chen, K. *et al.* Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 17413–17418 (2009).
273. Wilkinson, S., Paterson, H. F. & Marshall, C. J. Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nat. Cell Biol.* **7**, 255–261 (2005).
274. Liu, A. P., Aguet, F., Danuser, G. & Schmid, S. L. Local clustering of transferrin receptors promotes clathrin-coated pit initiation. *J. Cell Biol.* **191**, 1381–1393 (2010).
275. Verdier, F. *et al.* Proteasomes regulate the duration of erythropoietin receptor activation by controlling down-regulation of cell surface receptors. *J. Biol. Chem.* **275**, 18375–18381 (2000).
276. Zhao, Z. & Manser, E. Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinases (MRCK), the ROCK-like effectors of Cdc42 and Rac1. *Small GTPases* **6**, 81–88 (2015).
277. Gagliardi, P. A. *et al.* MRCK α is activated by caspase cleavage to assemble an apical actin ring for epithelial cell extrusion. *J. Cell Biol.* **217**, 231–249 (2018).
278. Ross, S. L. *et al.* Identification of Antibody and Small Molecule Antagonists of Ferroportin-Hepcidin Interaction. *Front. Pharmacol.* **8**, 838 (2017).
279. Lakhal, S. *et al.* Regulation of growth differentiation factor 15 expression by intracellular iron. *Blood* **113**, 1555–1563 (2009).
280. Percário, S. *et al.* Oxidative Stress in Malaria. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 16346–16372 (2012).
281. Muriuki, J. M. *et al.* The ferroportin Q248H mutation protects from anemia, but not malaria or bacteremia. *Sci. Adv.* **5**, eaaw0109 (2019).
282. Gruszczyk, J. *et al.* Transferrin receptor 1 is a reticulocyte-specific receptor for Plasmodium vivax. *Science* **359**, 48–55 (2018).
283. Wang, H. *et al.* Characterization of ferroptosis in murine models of hemochromatosis. *Hepatology* **66**, 449–465 (2017).

284. Stockwell, B. R. *et al.* Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease. *Cell* **171**, 273–285 (2017).
285. Do Van, B. *et al.* Ferroptosis, a newly characterized form of cell death in Parkinson's disease that is regulated by PKC. *Neurobiol. Dis.* **94**, 169–178 (2016).
286. Noh, S.-J., Wu, Y.-P., Byrnes, C., Lee, Y. T. & Miller, J. L. Transferrin Receptor 2 Protein Is Expressed in Mitochondrial-Associated Lysosomes During Human Erythropoiesis. *Blood* **114**, 628–628 (2009).
287. Noh, S.-J., Byrnes, C., Lee, Y. T. & Miller, J. L. Molecular and Cellular Specialization of Iron Regulation In Human Erythroid Progenitor Cells Prior to Hemoglobin Production. *Blood* **116**, 4255–4255 (2010).
288. Li, H. *et al.* Transferrin therapy ameliorates disease in beta-thalassemic mice. *Nat. Med.* **16**, 177–182 (2010).
289. Ginzburg, Y. & Rivella, S. β -thalassemia: a model for elucidating the dynamic regulation of ineffective erythropoiesis and iron metabolism. *Blood* **118**, 4321–4330 (2011).
290. Unbekandt, M. *et al.* A novel small-molecule MRCK inhibitor blocks cancer cell invasion. *Cell Commun. Signal. CCS* **12**, 54 (2014).
291. Young, S. P., Bomford, A. & Williams, R. The effect of the iron saturation of transferrin on its binding and uptake by rabbit reticulocytes. *Biochem. J.* **219**, 505–510 (1984).
292. Kawabata, H. *et al.* Transferrin Receptor 2- α Supports Cell Growth Both in Iron-chelated Cultured Cells and in Vivo. *J. Biol. Chem.* **275**, 16618–16625 (2000).
293. Huebers, H., Josephson, B., Huebers, E., Csiba, E. & Finch, C. Uptake and release of iron from human transferrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 2572–2576 (1981).
294. Zak, O. & Aisen, P. Nonrandom distribution of iron in circulating human transferrin. *Blood* **68**, 157–161 (1986).
295. Williams, J. & Moreton, K. The distribution of iron between the metal-binding sites of transferrin human serum. *Biochem. J.* **185**, 483–488 (1980).

296. Pakdaman, R. & Chahine, J.-M. E. H. A Mechanism for Iron Uptake by Transferrin. *Eur. J. Biochem.* **236**, 922–931 (1996).
297. Eid, C., Hémadi, M., Ha-Duong, N.-T. & El Hage Chahine, J.-M. Iron uptake and transfer from ceruloplasmin to transferrin. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 1771–1781 (2014).
298. Parrow, N. L. *et al.* Lobe specificity of iron-binding to transferrin modulates murine erythropoiesis and iron homeostasis. *Blood* (2019) doi:10.1182/blood.2018893099.
299. Nemeth, E., Roetto, A., Garozzo, G., Ganz, T. & Camaschella, C. Hepcidin is decreased in TFR2 hemochromatosis. *Blood* **105**, 1803–1806 (2005).
300. Gu, T.-L. *et al.* Survey of tyrosine kinase signaling reveals ROS kinase fusions in human cholangiocarcinoma. *PloS One* **6**, e15640 (2011).
301. Mertins, P. *et al.* Ischemia in tumors induces early and sustained phosphorylation changes in stress kinase pathways but does not affect global protein levels. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **13**, 1690–1704 (2014).

ANNEXES

Notre équipe s'intéresse aux interactions entre les gamétocytes du parasite *Plasmodium falciparum* et les îlots érythroblastiques présents dans la moelle osseuse humaine. Lors de l'infection par le parasite, les gamétocytes sont séquestrés dans la moelle osseuse jusqu'à ce qu'ils soient matures, ce qui suggère que 1) soit les globules rouges parasités par les gamétocytes soient également séquestrés dans la moelle osseuse par un phénomène d'adhérence, 2) soit les gamétocytes sont en mesure d'infecter les érythroblastes présents dans la moelle osseuse. Nous avons pu démontrer que les globules rouges infectés par les gamétocytes de *P. falciparum* n'adhèrent pas aux cellules érythroïdes ([Annexe 5](#)), mais qu'ils sont en mesure d'infecter les précurseurs matures érythroïdes et de se développer au sein de ces derniers ([Annexe 4](#)).

Notre équipe s'intéresse également aux mécanismes moléculaires régulant la différenciation érythroïde terminale. Dans ce contexte, nous avons étudié le rôle de la sérine/thréonine kinase AMPK qui avait été précédemment impliquée dans le maintien de la survie et de l'intégrité des globules rouges murins. Nos travaux montrent que l'inhibition de AMPK induit un ralentissement de la prolifération cellulaire, tandis que l'activation d'AMPK dans les précurseurs matures conduit à la mort cellulaire ([Annexe 6](#)). Ces résultats ont mis en évidence l'importance de la régulation fine de l'activation d'AMPK au cours de l'érythropoïèse.

ANNEXE 1

The serine/threonine kinase MRCK α , a novel partner of transferrin receptor type 2, is involved in erythropoiesis regulation.

Cyrielle RICHARD⁽¹⁾, Sophie VIRET⁽¹⁾, Maria-Lilia BRASSART⁽¹⁾, Carine LEFEVRE⁽¹⁾, Nabih AZAR⁽³⁾, Patrick MAYEUX^(1,2), Frédérique VERDIER⁽¹⁾.

(1) Cochin Institute, INSERM U1016-CNRS UMR8104-University of Paris Descartes – Labex Gr-EX, PARIS, France

(2) Proteomic platform of the University of Paris-Descartes (3P5), Paris, France.

(3) Hemobiology unit, Hospital La Pitié Salpêtrière, PARIS, France

Objective

The transferrin receptor type 2 (TFR2) is expressed during human adult erythropoiesis, and facilitates the export of the erythropoietin receptor (EPOR) to cell surface through their interaction. Previously known as an extracellular iron sensor in hepatocytes, its role during erythropoiesis remains to be clarified and its downstream signaling is still unknown.

In order to define the downstream signaling of TFR2, we aimed at identifying its protein partners.

Methods

- Cellular models: Human erythroleukemic cell line UT-7. Primary human erythroid progenitors obtained from CD34⁺ cells which have been isolated from G-CSF mobilized peripheral blood.

- Methods: TFR2 interacting partners were identified by mass spectrometry after immunoprecipitation of TFR2 in UT-7 cells.

Results

Among TFR2 interacting partners identified by mass spectrometry, we focused on the Serine/Threonine kinase MRCK α which has been described as promoting cytoskeletal reorganization. The stability of its mRNA has been shown to be regulated by the intracellular iron concentration (via an *Iron Responsive Element*), making MRCK α an interesting prospective partner for TFR2. Additionally, quantitative analysis of the human proteome during erythropoiesis shows TFR2 and MRCK α are tightly co-expressed throughout the differentiation. The expression of MRCK α is maximal at the basophil 1 stage, and the expression of both TFR2 and MRCK α decreases along terminal erythropoiesis.

The interaction between MRCK α and TFR2 was further validated by western blot after immunoprecipitation of TFR2, and reciprocally TFR2 was identified after immunoprecipitation of MRCK α in UT-7 cells. Then, their interaction was confirmed in human primary erythroblasts. We also show an interaction between MRCK α and EPOR (known interacting partner of TFR2), suggesting the existence of a TFR2-MRCK α -EPOR complex.

To understand the role of this interaction, human primary erythroblasts were transduced using lentiviral vectors with 2 shRNAs targeting *CDC42BPA* (encoding MRCK α).

The knock-down of *CDC42BPA* does not affect cellular viability, however proliferation tends to be increased. The kinetic of erythroid specific cell-surface markers during erythroid differentiation implies a delay in maturation in absence of MRCK α . Conjointly, monitoring of the hemoglobinization process which starts at the basophil 1 stage indicates a delayed maturation.

Conclusions

Our data show MRCK α negatively regulates the proliferation of erythroid cells and is involved in erythroblasts' maturation. MRCK α is associated with both TFR2 and EPOR. As TFR2 seems to act as an extracellular iron sensor and EPOR regulates erythropoiesis, we suggest the existence of an MRCK α -TFR2-EPOR complex able to adapt the rate of erythropoiesis to available circulating iron quantity.

Cet abstract a été sélectionné et présenté à l'oral lors du congrès de l'*European School of Hematology, Erythropoiesis Control and Ineffective Erythropoiesis : From Bench to Bedside*, qui s'est déroulé à Budapest, le 15-17 Mars 2019.

ANNEXE 2

La sérine/thréonine kinase MRCK α , nouveau partenaire du récepteur à la transferrine de type 2, est impliquée dans la régulation de l'érythropoïèse.

Cyrielle RICHARD ⁽¹⁾, Sophie VIRET ⁽¹⁾, Maria-Lilia BRASSART ⁽¹⁾, Carine LEFEVRE ⁽¹⁾, Nabih AZAR ⁽³⁾, Patrick MAYEUX ^(1,2), Frédérique VERDIER ⁽¹⁾.

(1) Institut Cochin, INSERM U1016-CNRS UMR8104-Université Paris Descartes – Labex Gr-EX, PARIS, France

(2) Plateforme de protéomique de l'Université Paris-Descartes (3P5), Paris, France.

(3) Service d'hémodiologie, Hôpital La Pitié Salpêtrière, PARIS, France

Introduction

Le récepteur à la transferrine de type 2 (TFR2) est exprimé au cours de l'érythropoïèse humaine, et s'associe au récepteur à l'érythropoïétine (EPOR) pour faciliter son transport à la surface. Connu dans l'hépatocyte pour son rôle de senseur de la concentration sérique en fer, le rôle de TFR2 dans l'érythropoïèse adulte humaine reste incompris, et sa signalisation en aval, inconnue. Afin de définir cette signalisation, nous avons cherché à identifier ses partenaires protéiques.

Matériels et méthodes

- Modèles cellulaires : Lignée érythroleucémique humaine UT-7. Progéniteurs/précurseurs érythroïdes obtenus à partir de cellules CD34⁺ issues de sangs mobilisés avec le G-CSF.

- Méthodes : Les partenaires de TFR2 ont été identifiés par spectrométrie de masse après immunoprécipitation avec un anticorps anti-TFR2 dans la lignée UT-7.

Résultats

Parmi les partenaires identifiés par spectrométrie de masse se trouve la sérine/thréonine kinase MRCK α , décrite comme régulant la réorganisation du cytosquelette. Il a été montré que la stabilité de son ARNm est régulée par la concentration intracellulaire en fer (via un élément IRE), en faisant un partenaire d'intérêt pour TFR2. De plus, l'étude du protéome au cours de l'érythropoïèse humaine révèle que TFR2 et MRCK α sont étroitement coexprimés tout au long de la différenciation érythroïde avec un maxima d'expression pour MRCK α au stade basophile 1. Leur expression s'atténue progressivement au cours de l'érythropoïèse humaine terminale.

La présence de MRCK α est effectivement validée dans les immunoprécipitations de TFR2 par Western Blot, et réciproquement TFR2 est identifié suite à l'immunoprécipitation de MRCK α dans les UT-7. Cette association est confirmée dans les érythroblastes humains primaires. De plus, nous avons mis en évidence une interaction entre MRCK α et EPOR (partenaire connu de TFR2), suggérant l'existence d'un complexe TFR2-MRCK α -EPOR.

Afin de comprendre le rôle de cette interaction, nous avons transduit les érythroblastes avec deux shRNA entraînant la diminution de l'expression du gène *CDC42BPA* (encodant MRCK α) au cours de l'érythropoïèse.

La diminution d'expression de MRCK α n'affecte pas la viabilité cellulaire mais tend à augmenter la prolifération des érythroblastes. La cinétique des marqueurs de surface spécifiques de la différenciation érythroïde indique un retard de maturation en absence de MRCK α . De même, le suivi du processus d'hémoglobinisaiton qui débute au stade basophile 1 montre un retard d'hémoglobinisaiton, et donc une différenciation ralentie.

Conclusion

Nos travaux montrent que MRCK α régule négativement la prolifération et est important pour la maturation des érythroblastes. Il est associé à TFR2 et à EPOR. TFR2 semblant avoir un rôle de senseur de fer et EPOR régulant l'érythropoïèse, nous proposons l'existence d'un complexe MRCK α -TFR2-EPOR qui permettrait d'adapter l'érythropoïèse à la quantité de fer circulant disponible.

Cet abstract a été sélectionné et présenté à l'oral lors du congrès du 39^{ème} congrès de la Société Française d'Hématologie, qui s'est déroulé à Paris, le 27-29 Mars 2019.

ANNEXE 3 :

LA SÉRINE/THRÉONINE KINASE MRCK α , NOUVEAU PARTENAIRE DU RÉCEPTEUR À LA TRANSFERRINE DE TYPE 2, EST IMPLIQUÉE DANS LA RÉGULATION DE L'ÉRYTHROPOÏÈSE.

Cyrielle RICHARD⁽¹⁾, Carine LEFEVRE⁽¹⁾, Sophie VIRET⁽¹⁾, Maria-Lilia BRASSART⁽¹⁾, El Hassan FAOUZI⁽¹⁾, Marjorie LEDUC^(1,2), Nabih AZAR⁽³⁾, Catherine LAVAZEC⁽¹⁾, Patrick MAYEUX^(1,2), Frédérique VERDIER⁽¹⁾.

(1) Institut Cochin, INSERM U1016-CNRS UMR8104-Université Paris Descartes – Labex Gr-EX, PARIS, France

(2) Plateforme de protéomique de l'Université Paris-Descartes (3P5), Paris, France.

(3) Service d'hémobiologie, Hôpital La Pitié Salpêtrière, PARIS, France

Introduction

Le récepteur à la transferrine de type 2 (TFR2) est exprimé au cours de l'érythropoïèse humaine, et s'associe au récepteur à l'érythropoïétine (EPOR) pour faciliter son transport à la surface. Connue dans l'hépatocyte pour son rôle de senseur de la concentration sérique en fer, le rôle de TFR2 dans l'érythropoïèse adulte humaine reste incompris, et sa signalisation en aval, inconnue. Afin de définir cette signalisation, nous avons cherché à identifier ses partenaires protéiques.

Modèles cellulaires :

Lignée érythroleucémique humaine UT-7/EPO. Lignée érythroïde murine MEDEP. Progéniteurs érythroïdes humains obtenus à partir de cellules CD34⁺ issues de sangs mobilisés par G-CSF.

Résultats

Après immunoprécipitation de TFR2, ses partenaires ont été identifiés par spectrométrie de masse. Parmi eux se trouve la sérine/thréonine kinase MRCK α , décrite comme régulant la réorganisation du cytosquelette. Il a été montré que la stabilité de son ARNm est régulée par la concentration intracellulaire en fer, en faisant un partenaire d'intérêt pour TFR2. De plus, l'étude du protéome au cours de l'érythropoïèse humaine révèle que TFR2 et MRCK α sont étroitement co-exprimés tout au long de la différenciation érythroïde, avec un maximum d'expression pour MRCK α au stade basophile 1. Leur expression s'atténue progressivement au cours de l'érythropoïèse humaine terminale.

La présence de MRCK α est retrouvée par Western Blot dans les immunoprécipitations de TFR2, et réciproquement TFR2 est identifié suite à l'immunoprécipitation de MRCK α dans les UT-7/EPO. Cette association est confirmée dans les érythroblastes humains primaires. De plus, nous avons mis en évidence une interaction entre MRCK α et EPOR (partenaire connu de TFR2), suggérant l'existence d'un complexe.

Afin de comprendre le rôle de cette interaction, nous avons transduit les érythroblastes humains primaires avec deux shRNA entraînant la diminution de l'expression du gène *CDC42BPA* (encodant MRCK α).

La diminution d'expression de MRCK α affecte l'expression en surface des récepteurs à la transferrine TFR1 et TFR2, ainsi que d'EPOR. MRCK α interagit avec TFR2 et EPOR exprimé en surface, mais n'est pas nécessaire à leur export. La cinétique des marqueurs de surface spécifiques de la différenciation érythroïde

ainsi que la morphologie des érythroblastes humains primaires indiquent un retard de maturation en absence de MRCK α . De même, le suivi de l'hémoglobinisation qui débute au stade basophile 1 montre un retard, et donc une différenciation ralentie. Ce retard de différenciation est retrouvé avec l'invalidation de *Cdc42bpa* par CRISPR/CAS9 dans la lignée érythroïde murine MEDEP.

Conclusion

Nos travaux montrent que MRCK α régule l'érythropoïèse humaine et murine, et s'associe à TFR2 et à EPOR dont il module l'expression en surface. TFR2 semblant avoir un rôle de senseur de fer et EPOR régulant l'érythropoïèse, nous proposons l'existence d'un complexe MRCK α -TFR2-EPOR qui permettrait d'adapter l'érythropoïèse à la quantité de fer circulant disponible.

Cet abstract a été sélectionné et présenté à l'oral lors du congrès du Club du Globule Rouge et du fer, qui s'est déroulé à Lyon, le 3-4 Octobre 2019.

ANNEXE 4 :

Malaria sexual parasites develop in human erythroblasts and affect erythropoiesis

Gaëlle Neveu^{1,2}, Cyrielle Richard^{1,2}, Prativa Behera³, Fiona Volpe^{1,2}, Florian Dupuy^{1,2}, Pradeep Annamalai Subramani⁴, Patrice Vallin¹, Muriel Andrieu¹, Aruna Mukti Minz³, Nabih Azar⁵, Rafael M. Martins⁶, Audrey Lorthiois^{1,2}, José-Juan Lopez-Rubio⁶, Dominique Mazier⁴, Sanghamitra Satpathi³, Samuel C. Wassmer⁷, Frédérique Verdier^{1,2#}, Catherine Lavazec^{1,2#*}.

¹ Inserm U1016, CNRS UMR8104, Université de Paris, Institut Cochin, Paris, France

² Laboratoire d'excellence GR-Ex, Paris, France

³ Department of Pathology, Ispat General Hospital, Rourkela, Odisha, India

⁴ Inserm U1135, CNRS ERL8255, Sorbonne Université, CIMI, Paris, France

⁵ Service d'hémodiologie, Hôpital La Pitié Salpêtrière, Paris, France

⁶ LPHI - Laboratory of Pathogen Host Interactions - UMR5235, CNRS, INSERM, Université de Montpellier, Montpellier, France

⁷ London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK

* Corresponding author: catherine.lavazec@inserm.fr

Equal contribution

SUMMARY

Plasmodium falciparum gametocytes, the only life stage responsible for malaria parasites transmission from humans to mosquitoes, are key targets for malaria elimination. Immature gametocytes develop in the human bone marrow parenchyma, where they accumulate around erythroblastic islands. The interactions between gametocytes and this hematopoietic niche have not been investigated and may affect erythropoiesis. We show that gametocytes can fully develop inside human erythroblasts *in vitro* and *in vivo*, leading to infectious mature gametocytes within reticulocytes. Strikingly, we found that infection by gametocytes and parasite-derived extracellular vesicles delay the erythroid differentiation, thereby allowing gametocyte maturation to coincide with the release of their host cell from the bone marrow. Taken together, our findings highlight new mechanisms that are pivotal for the maintenance of immature gametocytes in the bone marrow, and provide further insights on how *Plasmodium* parasites interfere with erythropoiesis and contribute to anemia in malaria infection.

Pour des raisons de droits d'éditeur, le manuscrit de cet article a été retiré.

ANNEXE 5 :

***Plasmodium falciparum* gametocyte-infected erythrocytes do not adhere to human primary erythroblasts**

Gaëlle Neveu^{1,2,3,4}, Florian Dupuy^{1,2,3,4}, Meriem Ladli^{1,2,3,4}, Daniela Barbieri^{1,2,3,4}, Bernina Naissant^{1,2,3,4}, Cyrielle Richard^{1,2,3,4}, Rafael M. Martins⁵, Jose-Juan Lopez-Rubio⁵, Anna Bachmann⁶, Frédérique Verdier^{1,2,3,4} & Catherine Lavazec^{1,2,3,4}

¹Inserm U1016, Institut Cochin, Paris, France.

²Cnrs, UMR8104, Paris, France.

³Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

⁴Laboratoire d'excellence GR-Ex, Paris, France.

⁵UMR IRD 224-CNRS 5290-University Montpellier, MIVEGEC, Montpellier, France.

⁶Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Hamburg, Germany.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.L. (email:

catherine.lavazec@inserm.fr)

ABSTRACT

Plasmodium falciparum gametocytes, the sexual stages responsible for malaria parasite transmission, develop in the human bone marrow parenchyma in proximity to the erythroblastic islands. Yet, mechanisms underlying gametocytes interactions with these islands are unknown. Here, we have investigated whether gametocyte-infected erythrocytes (GIE) adhere to erythroid precursors, and whether a putative adhesion may be mediated by a mechanism similar to the adhesion of erythrocytes infected with *P. falciparum* asexual stages to uninfected erythrocytes. Cell-cell adhesion assays with human primary erythroblasts or erythroid cell lines revealed that immature GIE do not specifically adhere to erythroid precursors. To determine whether adhesion may be dependent on binding of STEVOR proteins to Glycophorin C on the surface of erythroid cells, we used clonal lines and transgenic parasites that overexpress specific STEVOR proteins known to bind to Glycophorin C in asexual stages. Our results indicate that GIE overexpressing STEVOR do not specifically adhere to erythroblasts, in agreement with our observation that the STEVOR adhesive domain is not exposed at the surface of GIE.

DOI : 10.1038/s41598-018-36148-y

Pour des raisons de droits d'éditeur, le manuscrit de cet article a été retiré.

ANNEXE 6 :

Finely-tuned regulation of AMP-activated protein kinase is crucial for human adult erythropoiesis

Meriem Ladli^{1,2,3,4}, Cyrielle Richard^{1,2,3,4}, Lilia Cantero Aguilar^{1,2,3,4}, Sarah Ducamp^{1,2,3,4}, Sabrina Bondu^{1,2,3,4}, Pierre Sujobert^{1,2,3}, Jerome Tamburini^{1,2,3}, Catherine Lacombe^{1,2,3,4}, Nabih Azar⁵, Marc Foretz^{1,2,3,4}, Yael Zermati^{1,2,3,4}, Patrick Mayeux^{1,2,3,4}, Benoit Viollet^{1,2,3,4}, and Frederique Verdier^{1,2,3,4},

¹Institut Cochin, INSERM U1016;

²CNRS UMR 8104, Paris;

³Universite Paris Descartes, Sorbonne Paris Cite;

⁴Labex GREX and ⁵Service d'Hemobiologie, Hopital La Pitie Salpetriere, Paris, France

Corresponding author: frederique.verdier@inserm.fr

ABSTRACT

AMP-activated protein kinase (AMPK) is a heterotrimeric complex containing α , β , and γ subunits involved in maintaining integrity and survival of murine red blood cells. Indeed, *Ampk* $\alpha 1^{-/-}$, *Ampk* $\beta 1^{-/-}$ and *Ampk* $\gamma 1^{-/-}$ mice develop hemolytic anemia and the plasma membrane of their red blood cells shows elasticity defects. The membrane composition evolves continuously along erythropoiesis and during red blood cell maturation; defects due to the absence of *Ampk* could be initiated during erythropoiesis. We, therefore, studied the role of AMPK during human erythropoiesis. Our data show that AMPK activation had two distinct phases in primary erythroblasts. The phosphorylation of AMPK (Thr172) and its target acetyl CoA carboxylase (Ser79) was elevated in immature erythroblasts (glycophorin A low), then decreased conjointly with erythroid differentiation. In erythroblasts, knockdown of the $\alpha 1$ catalytic subunit by short hairpin RNA led to a decrease in cell proliferation and alterations in the expression of membrane proteins (band 3 and glycophorin A) associated with an increase in phosphorylation of adducin (Ser726). AMPK activation in mature erythroblasts (glycophorin A high), achieved through the use of direct activators (GSK621 and compound 991), induced cell cycle arrest in the S phase, the induction of autophagy and caspase-dependent apoptosis, whereas no such effects were observed in similarly treated immature erythroblasts. Thus, our work suggests that AMPK activation during the final stages of erythropoiesis is deleterious. As the use of direct AMPK activators is being considered as a treatment in several pathologies (diabetes, acute myeloid leukemia), this observation is pivotal. Our data highlighted the importance of the finely-tuned regulation of AMPK during human erythropoiesis.

DOI: 10.3324/haematol.2018.191403

Pour des raisons de droits d'éditeur, le manuscrit de cet article a été retiré.

Figures retirées

Figure 2 : Modèles revisités de la hiérarchie dans l'hématopoïèse humaine.

A: Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny, Notta et al., Science, 2016. DOI: 10.1126/science.aab2116

B: A comprehensive single cell transcriptional landscape of human hematopoietic progenitors, Pellin et al., nature communications, 2019. DOI: 10.1038/s41467-019-10291-0

Retirée à la page 21.

Figure 6 : Isolement et caractérisation d'érythroblastes humains (d'après de Hu et al., 2013¹⁴).

Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo, Hu et al, Blood, 2013. DOI: 10.1182/blood-2013-01-476390

Retirée à la page 29.

Figure 9 : Immunophénotype et morphologie des réticulocytes au cours de leur maturation (d'après Malleret et al., 2013¹³).

Significant Biochemical, Biophysical and Metabolic Diversity in Circulating Human Cord Blood Reticulocytes, Malleret et al, Plos ONE, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0076062

Retirée à la page 36.

Figure 22 : MRCK α est clivable par les caspases.

MRCK α is activated by caspase cleavage to assemble an apical actin ring for epithelial cell extrusion, Gagliardi et al, J. Cell Biology, 2018. DOI: 10.1083/jcb.201703044

Retirée à la page 119.

Articles retirés

Annexe 4 : Malaria sexual parasites develop in human erythroblasts and affect erythropoiesis

Soumis.

Pages 191-232.

Annexe 5 : Plasmodium falciparum gametocyte-infected erythrocytes do not adhere to human primary erythroblasts

Neveu et al., Scientific reports, 2018. DOI : 10.1038/s41598-018-36148-y

Pages 233-243.

Annexe 6 : Finely-tuned regulation of AMP-activated protein kinase is crucial for human adult erythropoiesis

Ladli et al., Hematologica, 2019. DOI: 10.3324/haematol.2018.191403

Pages 244-255.