

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

**LES MACROPHAGES STIMULENT LA PRODUCTION DE  
PROÉRYTHROBLASTES ET LA DIFFÉRENTIATION ÉRYTHROCYTAIRE  
PAR CONTACT DIRECT EN ABSENCE D'EPO EXOGÈNE**

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

CHRISTOPHER WARBURTON

MARS 2017

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»



## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu la Professeure Tatiana Scorza pour m'avoir donné l'opportunité d'étudier dans son laboratoire. Son support à travers le changement de sujet, les innombrables Western Blot et PCR en quête de l'EPO non-existante et la mise en place de nouveaux protocoles m'a permis de rester sain d'esprit. Sa bonne humeur, sa patience et sa tolérance de mes escapades hors du laboratoire m'ont toujours poussé à continuer à chercher, penser, comprendre et se réjouir des découvertes inusitées qui sont parties intégrante de la science. Grace à elle, j'ai approfondi mon amour pour la science sous toutes ses facettes. Je tiens également à remercier Hugo Roméro, sans qui je n'aurais pu commencer, ni finir cette maitrise. Toujours là pour aider, c'est aussi grâce à lui que les dernières années sont remplies d'expériences inoubliables. Mille fois merci pour toute ton aide. Merci à Jaime « Señor » Sanchez-Dardon, pour tes connaissances approfondies dans le laboratoire et les séances de détente au bureau le vendredi soir. Merci à Alexis Presse pour avoir résolu l'énigme du Western Blot. Merci à Denis Flipo pour son expertise au confocal et au cytomètre. Merci à Mikael Larose pour les projets les uns plus fou que les autres qui m'ont permis de sortir du laboratoire et prolonger ma maitrise. Merci à Aurélie Barbe pour son support, de m'avoir enduré pendant ma rédaction et de m'avoir aidé à débloquer le puzzle qui a mené à la création du schéma. Merci à Lisa Vander Plaetse pour le design du schéma. Merci à Internet pour m'avoir donné d'innombrables heures de procrastination où j'ai pu découvrir de nouvelles passions. Merci à tous ceux qui ont aidé au laboratoire et à l'UQAM.

Finalement, un immense merci à ma famille, Philippe, Marie et Peter, qui m'ont toujours supporté dans mes projets et qui ont inculqué en moi la curiosité et la soif du savoir dès un jeune âge.





## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	ix
RÉSUMÉ.....	xi
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	5
1.1 Érythropoïèse.....	5
1.2 Les îlots érythroblastiques.....	10
1.3 Le macrophage central.....	11
1.4 Liens d'adhésion intercellulaires entre cellules de l'îlot érythroblastique.....	13
1.5 L'érythropoïétine.....	15
1.6 Cytokines solubles.....	18
1.7 Validation expérimentale des effets pro-érythropoïétiques issus des macrophages.....	21
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....	23
DESCRIPTION DE L'IMPLICATION DE L'ÉTUDIANT DANS LES TRAVAUX ET LA RÉDACTION D'UN ARTICLE.....	25
CHAPITRE II	
ARTICLE: MACROPHAGES CONTRIBUTE TO ERYTHROPOIESIS IN ABSENCE OF EXOGENOUS EPO THROUGH SECRETION OF SOLUBLE FACTORS PROMOTING EARLY ERYTHROBLAST DEVELOPMENT.....	27
2.1 Abstract.....	29
2.2 Introduction.....	30
2.3 Material and Methods.....	32
2.3.1 <i>Animal procedures</i> .....	32
2.3.2 <i>In vitro</i> erythropoiesis model.....	32

2.3.3 BMDM supernatant conditioning.....	32
2.3.4 <i>In vitro</i> erythropoiesis and confocal imaging.....	33
2.3.5 FACS analysis of erythroid populations .....	33
2.3.6 Assessment of EPO mRNA by PCR.....	33
2.3.7 Western blot for EPO detection .....	34
2.3.8 EPO ELISA .....	34
2.3.9 Statistical Analysis.....	35
2.4 Results.....	37
BMDM stimulate erythroblast proliferation in synergy with EPO .....	37
BMDM stimulate Lineage- cell differentiation in absence of EPO .....	43
BMDM conditioned medium promotes proerythroblastic cell proliferation and island formation but inhibits late stage erythropoiesis.....	51
BMDM conditioned medium enhances early stage erythroid differentiation in non-adherent bone marrow cell suspensions.....	55
<i>In vivo</i> depletion of macrophages with clodronate liposomes abrogates early erythroblast formation in mouse bone marrow .....	61
BMDM do not express EPO .....	68
CHAPITRE III	
DISCUSSION .....	75
CHAPITRE IV	
DISCUSSION .....	81
CHAPITRE V	
CONCLUSION.....	93
CHAPITRE VI	
PERSPECTIVES.....	95
ANNEXE A .....	97
DESCRIPTION DE L'IMPLICATION DE L'ÉTUDIANT DANS LES TRAVAUX ET LA RÉDACTION D'UN ARTICLE.....	97
ANNEXE B.....	99
RESEARCH ARTICLE : OSTEOCLASTS ARE REQUIRED FOR HEMATOPOIETIC STEM AND PROGENITOR CELL MOBILIZATION BUT NOT FOR STRESS ERTYRHOPOIESIS IN <i>PLASMODIUM CHABAUDI ADAMI</i> MURINE MALARIA .....	99

BIBLIOGRAPHIE ..... 115



## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

BFU-E	<i>Burst forming unit-erythroid</i>
BMDM	<i>Bone marrow derived macrophages</i>
CFU-E	<i>Colony forming unit-erythroid</i>
EDM	<i>Erythroid differentiation medium</i>
EMP	<i>Erythroblast-macrophage protein</i>
EryA	<i>Érythroblaste basophile</i>
EryB	<i>Érythroblaste polychromatophile</i>
EryC	<i>Érythroblaste orthochromatophile</i>
FACS	<i>Fluorescence assisted cell sorting</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
HSC	<i>Hematopoietic stem cell</i>
IGF-1	<i>Insulin growth factor-1</i>
IL-6	<i>Interleukin 6</i>
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
INF $\gamma$	<i>Interferon gamma</i>
kDa	<i>Kilo-Dalton</i>
Lin-	<i>Lineage negative</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	<i>Phycoérythrine</i>
ProE	<i>Proérythroblaste</i>
PS	<i>Phosphatidylserine</i>
ROS	<i>Reactive oxygen Species</i>
SCF	<i>Stem-cell factor</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis</i>



## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Figure 1.1 Génération des cellules sanguines et immunitaires (hématopoïèse) à partir des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse. ....	6
Figure 1.2 Morphologie de la lignée érythrocytaire.....	7
Figure 1.3 Différentiation érythrocytaire chez la souris. ....	9
Figure 1.4 Identification des sous-populations érythrocytaires par cytofluorométrie. ....	10
Figure 1.5 Interactions directes entre le macrophage central et les érythroblastes en différenciation.....	13
Figure 1.6 Facteurs solubles régulateurs de l'érythropoïèse.....	20
Figure 2.1 Efficiency of Lineage <sup>-</sup> cell enrichment by negative selection. ....	37
Figure 2.2 Erythroblast gating strategy.....	39
Figure 2.3 Macrophages enhance EPO-dependent proliferation and differentiation of lineage negative cells into early basophilic erythroblasts.....	41
Figure 2.4 Macrophages promote the differentiation of lineage negative cells into early proerythroblasts and late basophilic erythroblasts in absence of EPO. ....	45
Figure 2.5 Histological confirmation of erythropoiesis by macrophages. ....	47
Figure 2.6 Confocal imaging confirmation of enhanced erythroid differentiation by macrophages. ....	49
Figure 2.7 Analysis of macrophage conditioned media effects on lineage negative cells by confocal imaging. ....	51
Figure 2.8 BMDM conditioned media inhibits late stage erythroblasts. ....	53
Figure 2.9 Macrophage conditioned medium stimulates the proerythroblast stage in bone marrow suspensions. ....	57



Figure 2.10 Erythroid development and survival of bone marrow precursors is enhanced by macrophage conditioned medium. ....	59
Figure 2.11 Clodronate significantly depletes bone marrow macrophages. ....	61
Figure 2.12 Bone marrow erythropoiesis is impaired in clodronate-treated mice. ..	63
Figure 2.13 Proerythroblasts are decreased in the bone marrow of Clodronate-treated mice. ....	65
Figure 2.14 Clodronate treatment causes a rapid decrease of circulating reticulocytes. ....	67
Supplementary Figure 1. Macrophage conditioned medium stimulates erythroblastic island formation. ....	69
Supplementary Figure 2 : Liposomes do not target Ter119 <sup>+</sup> cells. ....	70
Supplementary Figure 3: Plasmatic EPO levels are not changed by macrophage depletion after 7 days. ....	71
Supplementary Figure 4: EPO could not be detected by PCR in BMDM lysates. ..	72
Supplementary Figure 5: EPO is not detected by Western Blot in BMDM lysates. ..	73
Figure 4.1 Interactions pouvant soutenir la production locale d'EPO dans le microenvironnement des îlots érythroblastiques en condition homéostatique. ....	91

## RÉSUMÉ

L'érythropoïèse est principalement régulée par l'hormone rénale érythropoïétine (EPO), qui stimule la prolifération et la différenciation des précurseurs érythropoïétiques à travers des effets anti-apoptotiques et antioxydants. Sous des conditions homéostatiques, les érythroblastes de la moelle osseuse s'organisent en îlots autour d'un macrophage central, qui supporte l'échange de fer nécessaire à la synthèse d'hémoglobine ainsi que la phagocytose de noyaux extrudés. Le fait que la déplétion expérimentale *in vivo* de macrophages cause une déficience rapide de l'érythropoïèse nous a mené à émettre l'hypothèse que les macrophages peuvent être une source d'EPO *in situ*, ou produisent des analogues fonctionnels à l'EPO. Afin de valider cette hypothèse, la contribution des facteurs solubles dérivés des macrophages de la moelle osseuse ainsi que l'impact d'interaction cellulaire directe avec des précurseurs hématopoïétiques ont été étudiés *in vitro* dans des conditions de culture sans EPO. Des cellules lignées négative de la moelle osseuse, enrichies par sélection négative, ont été mises en culture en présence de milieu conditionné par les macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM), ou en contact direct avec ceux-ci, dans un milieu contenant de l'insuline humaine, de l'holotransferrine et d'albumine bovine dé-ionisée mais exempte d'EPO. L'impact de la déplétion *in vivo* des macrophages sur l'érythropoïèse a été étudié en injectant des liposomes de Clodronate dans des souris Balb/c. Les populations érythrocytaires ont été analysés *ex vivo* par FACS en utilisant des anticorps anti-CD71 et Ter119, ou par coloration May-Grünwald et Giemsa.

Nos résultats démontrent que le milieu conditionné de BMDM promeut la différenciation des stades précoces érythrocytaires (proérythroblastes) et diminue la prolifération des stades tardifs érythrocytaires. La déplétion des macrophages pendant une semaine cause un arrêt complet de l'érythropoïèse dans la moelle osseuse sans toutefois induire une production compensatoire d'EPO par le rein. L'EPO n'a pu être détectée par PCR, Western Blot ou ELISA dans les surnageant et les lysats de BMDM en condition de culture normoxique et hypoxique. Ces résultats démontrent qu'en condition expérimentale sans ajout d'EPO exogène, les macrophages de la moelle osseuse stimulent les phases précoces de différenciation érythrocytaire.



## INTRODUCTION

Les globules rouges sont les cellules les plus nombreuses du corps humain et sont responsable d'un apport d'oxygène constant et suffisant aux diverses parties du corps. Leur cycle de vie relativement court exige un taux de renouvellement élevé et le corps doit produire plus de 200 milliards de globules rouges par jour en condition homéostatique (Dzierzak & Philipsen 2013). Chez l'adulte, l'érythropoïèse se déroule majoritairement dans la moelle osseuse et dans la rate dans un processus étroitement régulé.

L'érythropoïèse est un processus complexe de différenciation et production de globules rouges sous la régulation étroite de l'érythropoïétine (EPO), qui se déroule dans le microenvironnement spécialisé de l'îlot érythroblastique (Bunn 2013). Découverts par Marcel Bessis en 1958, les îlots érythroblastiques sont composés d'un macrophage central entouré de précurseurs hématopoïétiques en cours de différenciation (Bessis & Breton-Gorius 1962). Le rôle exact des macrophages est matière à débat depuis leur découverte, mais il est clair que ces cellules sont essentielles à la maturation des érythroblastes et leur énucléation (Socolovsky 2013; Giger & Kalfa 2015; Chasis & Mohandas 2008). Une de leurs fonctions est l'exportation de ferritine, qui est utilisée par les érythroblastes dans la synthèse d'hémoglobine. Ainsi, les macrophages agissent comme une source de fer où leur ferritine est libérée par acidification et protéolyse dans les endosomes érythroblastiques lors de l'endocytose (Leimberg et al. 2008). Les macrophages sont également responsables de l'élimination par phagocytose des noyaux pyknotiques pendant l'énucléation (Koury & Bondurant 1990). Les macrophages complètent l'énucléation et la différenciation terminale des érythroblastes (Fujimi et al. 2008) et

leur présence est essentiel à la digestion des noyaux extrudés (Kawane et al. 2001). Les interactions cellulaires directes entre les macrophages et les précurseurs semblent essentiels à la différenciation érythrocytaire puisque des molécules d'adhésion tel que l'Erythroblast Macrophage Protein (EMP) promeuvent la survie et l'énucléation des érythroblastes. D'autres protéines tel que l'intégrine VLA-4 et les molécules d'adhésions VCAM-1 et ICAM 4 sont impliquées dans le contact cellulaire, mais leurs fonctions exactes ne sont pas connues (Dzierzak & Philipsen 2013). De plus, l'interaction de FasL, exprimée par les érythroblastes tardifs avec Fas, exprimé par les érythroblastes précoces mène à la dégradation du facteur de transcription GATA-1, qui inhibe ainsi l'expansion et la différenciation des érythroblastes précoces (De Maria, Zeuner, et al. 1999; De Maria, Testa, et al. 1999). Il est intéressant de noter que la régulation négative de l'érythropoïèse implique aussi des cytokines solubles produites par les macrophages et les précurseurs érythroblastiques dans la matrice de l'îlot (IL-6, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ )(Zermati et al. 2000; Zamai et al. 2000).

Les macrophages centraux semblent sécréter des cytokines solubles qui agissent comme des analogues fonctionnels de l'EPO *in vivo* (Gordon et al. 1980), mais leur identité demeure nébuleuse. Il a été démontré que les macrophages promeuvent la prolifération des BFU-E et des CFU-E via la *burst promoting activity* (BPA) (Sawada et al. 1989). Les macrophages hépatiques humains et les monocytes sécrètent de l'EPO pendant le développement fœtale (Ohls 1994), mais seulement trois études rapportent la production d'ARNm d'EPO chez les macrophages de la moelle osseuse et de la rate adulte (Rich et al. 1982; Rich et al. 1988; Luo et al. 2016). Le rôle précis de l'EPO produite par les macrophages dans la moelle osseuse adulte demeure flou (Manwani & Bieker 2008), car l'activité pro-érythropoïétique des macrophages a toujours été étudiée *in vitro* avec du milieu de culture supplémenté d'EPO, masquant potentiellement l'activité intrinsèque et EPO-indépendante des macrophages.

L'EPO est une glycoprotéine de 30-34 kDa produite par les fibroblastes peritubulaires du cortex rénale (Bachmann et al. 1993; Maxwell et al. 1993). C'est l'hormone principale régulatrice de l'érythropoïèse : une corrélation inverse prononcée est observée entre la production de globules rouges matures et les concentrations d'EPO plasmatiques. Les taux basaux d'EPO de 10 mU/ml en conditions homéostatiques peuvent monter dramatiquement jusqu'à 10.000 mU/ml sous stress hypoxique (Jelkmann 1992; Adamson 1968). Le récepteur à l'EPO active des cascades de signalisation menant à l'expression de facteurs anti-apoptotiques et de prolifération des érythroblastes via la voie PI3-Kinase/AKT (Bakker et al. 2004; Dijkers et al. 2000).

Les résultats de notre laboratoire montrent que la déplétion de macrophages exacerbe l'anémie des souris infectées par *Plasmodium chabaudi adami*, en partie par un délai important dans la production de globules rouges par la moelle osseuse et la rate (Roméro H et Warburton C; article en préparation). Ramos et al. (2013) ont rapporté que les macrophages contribuent également aux pathologies *Polycythemia Vera* et *β-Thalassémie*, caractérisées par une érythropoïèse exacerbée ou anormale. Ces auteurs ont cependant minimisé l'impact des macrophages sur l'érythropoïèse homéostatique, mais leurs résultats supplémentaires démontrent une diminution significative de précurseurs érythrocytaires de la moelle osseuse et du foie, et une augmentation de production d'EPO par le rein des souris sans macrophages. En se basant sur ces résultats, nous émettons l'hypothèse que les macrophages contribuent à l'érythropoïèse homéostatique en produisant de l'EPO ou des analogues à l'EPO, et que leur absence provoque une réponse compensatoire d'EPO rapide par les reins. Afin d'adresser cette hypothèse, nous avons étudié l'impact *in vitro* des macrophages sur le développement des globules rouges à partir de cellules lignée négatives (qui contiennent entre autres des cellules souches) en absence d'EPO. De façon concomitante, nous avons étudié l'effet d'une déplétion rapide des macrophages sur l'érythropoïèse et la réponse systémique du corps face à cette déplétion.



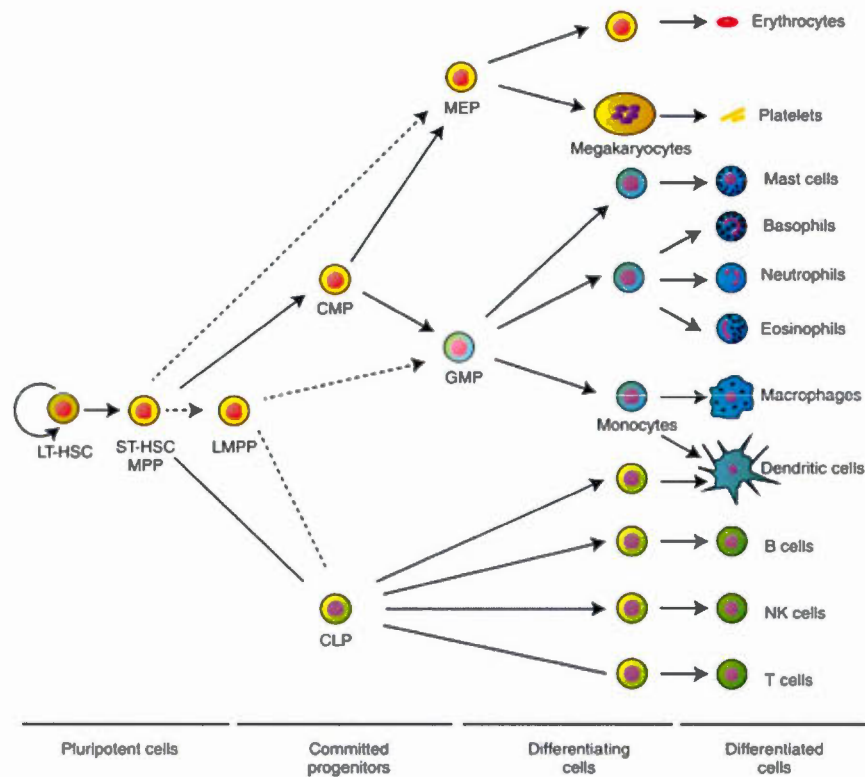
## CHAPITRE I

### ÉTAT DES CONNAISSANCES

#### 1.1 Érythropoïèse

La différenciation des cellules souches hématopoïétiques (HSC) en globules rouges matures se fait en trois stades majeurs. Le premier stade consiste en la différenciation des cellules souches auto-renouvelantes (*Long Term Hematopoietic Stem Cell* :LT-HSC) en cellules souches hématopoïétiques pluripotentes (*Short Term HSC* : ST-HSC ou *Multipotential Progenitor Cell* : MPP), puis en progéniteurs commun myéloïdes (*Common Myeloid Progenitor* : CMP), et ensuite en précurseurs érythrocytaires-megacaryocytes (*Megakaryocyte-Erythroid Precursor* : MEP)(Dzierzak & Philipsen 2013) (Figure 1.1).

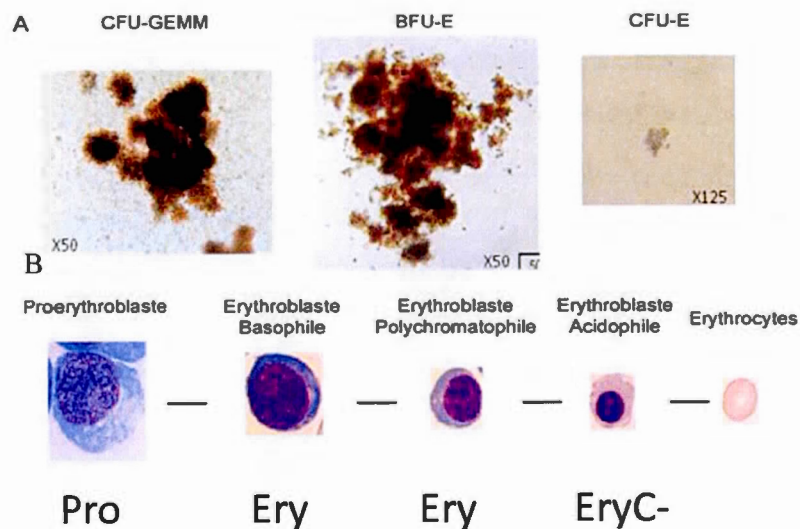




**Figure 1.1 Génération des cellules sanguines et immunitaires (hématopoïèse) à partir des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse.**

Cellules souches hématopoïétiques à longue durée (Long Term Hematopoietic Stem Cell, LT-HSC), cellules souches hématopoïétiques à courte durée (Short Term HSC, ST-HSC), Cellules progéniteur pluripotentielle (Multipotential Progenitor Cell, MPP), progéniteurs commun myéloïdes (Common Myeloid Progenitor, CMP), précurseurs érythrocytaires-megacaryocytes (Megakaryocyte-Erythroid Precursor, MEP). Figure tirée de Dzierzak et Philipsen 2013

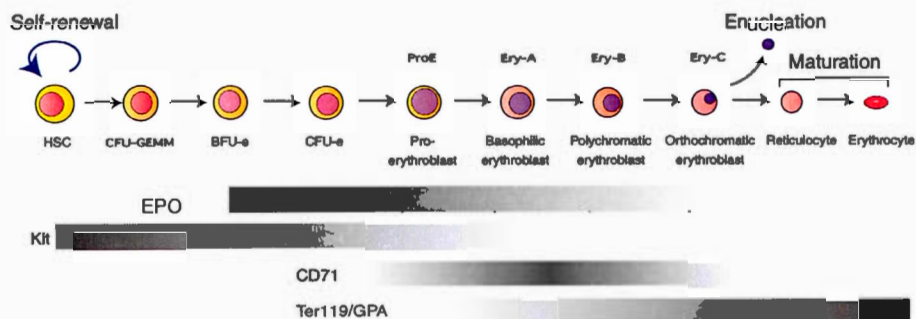
Les MEP se différencient ensuite en unités d'éclosion érythrocytaire (*Burst Forming Unit Erythroid* : BFU-E), puis en unités de formation des colonies érythrocytaires (*Colony Forming Unit Erythroid* : CFU-E) Les BFU-E donnent de grandes colonies en milieu semi-solide, tandis que les CFU-E sont de plus petites colonies (Figure 1.2 A). Ces derniers expriment le récepteur à l'EPO puisqu'elles forment des colonies érythrocytaires qu'en présence de cette protéine (Adamson et al. 1978).



**Figure 1.2 Morphologie de la lignée érythrocytaire.**

(A) Apparence des différentes colonies des premiers stades de développement érythrocytaire sur milieu semi-solide. (B) Apparences des stades tardifs colorés au May-Grünwald-Giemsa. Figure tirée de Chambellan et al. 2012.

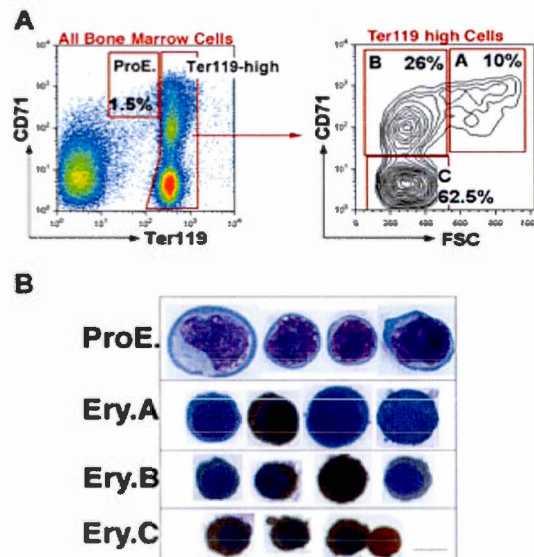
Le deuxième stade de développement érythrocytaire se caractérise par des cellules morphologiquement identifiables. Les cellules deviennent progressivement plus petites et accumulent de l'hémoglobine dans le cytoplasme, changeant de basophiles à acidophiles (orthochromatophiles). Leur chromatine se condense graduellement jusqu'à l'extrusion du noyau, moment auquel les cellules deviennent des réticulocytes. Les CFU-E se transforment en pro-érythroblastes (ProE), des grosses cellules d'environ 20  $\mu\text{m}$  avec un gros noyau et un cytoplasme basophile. Les ProE se différencient ensuite en érythroblastes basophiles (EryA) légèrement plus petits, avec un début de condensation de chromatine dans le noyau. Les EryA se différencient ensuite en érythroblastes polychromatophiles (EryB) qui sont des cellules plus petites et avec un noyau plus condensé, et en voie de devenir acidophile. Les EryB se différencient en EryC (orthochromatophile), des petites cellules au noyau condensé et au cytoplasme acidophile (Gifford et al. 2006) (Figure 1.2 B). Finalement, le dernier stade de différenciation se déroule lorsque le réticulocyte démantèle sa machinerie ribosomale, expulse ses organelles et prend la forme de disque biconcave typique d'un érythrocyte mature (Gifford et al. 2006).



**Figure 1.3** Différentiation érythrocytaire chez la souris.

Les bandes noires représentent les marqueurs de surface qui identifient les sous-populations érythrocytaires et leur réponse à l'EPO. Le marqueur Kit est le récepteur du Stem Cell Factor (SCF), et induit un signal suite à une tyrosine kinase qui active plusieurs voies dont la kinase PI-3, la kinase Src et le PLC- $\gamma$ . CD71 est le récepteur de transferrine et module l'assimilation des complexes de transferrine et de fer; il est hautement exprimé sur la surface des cellules de la lignée érythrocytaire (Marsee et al. 2010). Ter119/GPA est exprimée sur les cellules érythrocytaires (de proérythroblaste à érythrocyte mature) est associée à la glycophorin A de surface (Kina et al. 2000). Figure tirée de Dzierzak et Philipsen 2013.

Lors de la différenciation érythrocytaire, les cellules expriment à leurs surfaces des marqueurs distincts qui permettent leur identification (Figure 1.3). Les deux marqueurs utilisés pour caractériser leur phénotype sont le récepteur de la transferrine (CD71) et la glycophorin A (GPA), reconnue par l'anticorps Ter119. À l'aide des deux marqueurs et de la taille des cellules, il est possible de différencier les populations d'érythroblastes et de suivre les étapes de différenciation par cytométrie (Figure 1.4).



**Figure 1.4** Identification des sous-populations érythrocytaires par cytofluorométrie.

(A) Stratégie de ciblage des érythroblastes de la moelle osseuse marqués par les anticorps anti-CD71 et anti-Ter119. Les cellules à haute expression de Ter119 sont analysées en fonction de leur expression de CD71 et de leur taille (Forward Scatter, FSC). (B) Les sous-populations ont été colorées avec du diaminobenzidine et Giemsa afin de corroborer le triage par cytométrie. Figure tirée de (Liu et al. 2006).

## 1.2 Les îlots érythroblastiques

Les îlots érythroblastiques ont été décrits pour la première fois en 1958 par l'hématologue français Marcel Bessis. Ils sont composés d'un macrophage central lobé autour duquel se retrouvent les cellules du deuxième stade de maturation en cours de différenciation plus ou moins complétée. Après 20 ans de travaux sur le sujet, Bessis a conclu que les îlots représentent des « niches écologiques » nécessaires à la maturation des globules rouges (Bessis et al. 1978). Depuis, les recherches ont

avancé et les interactions entre macrophages et érythroblastes ont été mieux caractérisées.

Les ilots érythroblastiques sont retrouvés dans tous les tissus d'érythropoïèse définitive, soit la moelle osseuse, la rate et le foie. Ils sont aussi générés spontanément *in vitro* lors de culture de moelle osseuse de longue durée (Allen & Dexter 1982). Malgré leur distribution homogène à l'intérieur de la moelle osseuse (Mohandas et al. 1978), les ilots situés loin des sinusoides se composent d'érythroblastes moins matures (pro-érythroblastes) que les ilots adjacents aux sinusoides, qui ont plus d'érythroblastes orthochromatophiles (EryC) (Yokoyama et al. 2003). Cette observation suggère que les ilots migrent vers les sinusoides afin de relâcher les réticulocytes matures. Il est possible que les interactions entre macrophages et érythroblastes engendrent une cascade qui mène au relâchement de protéases qui facilitent le remodelage de la matrice extracellulaire. De plus, les érythroblastes peuvent potentiellement se détacher et se rattacher à plusieurs ilots, ce qui leur permettrait de se rendre de façon indépendante aux sinusoides (de Back et al. 2014).

### 1.3 Le macrophage central

Les macrophages centraux des ilots sont distinguables par l'expression de F4/80 et le glycosphingolipide Forssman, mais ils n'expriment pas le CD11b, une intégrine régulant l'adhésion et la migration cellulaire (Crocker & Gordon 1985). F4/80 est une glycoprotéine transmembranaire qui présente une homologie avec la famille des protéines G (Austyn & Gordon 1981). F4/80 est un marqueur spécifique des macrophages, et il est fortement exprimé par les macrophages centraux de l'îlot érythroblastique. L'antigène de Forssman est un glycosphingolipide qui permet de distinguer les macrophages centraux des monocytes et des macrophages pro-inflammatoires des tissus hématopoïétiques (Sadahira et al. 1991).

Depuis la découverte de l'îlot érythroblastique, le macrophage a été considéré comme ayant une fonction essentielle à l'érythropoïèse. Cependant, les interactions entre le macrophage central et les érythroblastes adjacents aux îlots qui ne rentrent pas directement en contact, n'ont pas été complètement élucidées.

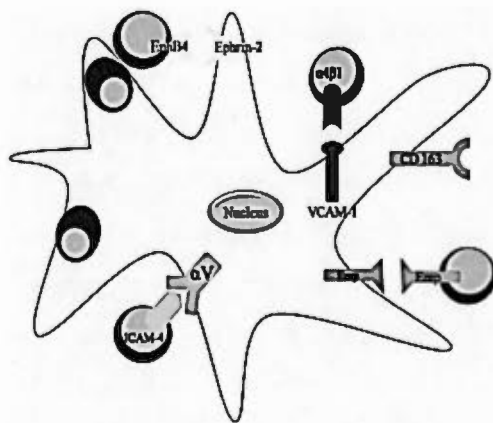
Par rapport à l'activité pro-érythropoïétique des macrophages, Marcel Bessis a été le premier à proposer leur implication directe dans la phagocytose des noyaux extrudés et dans le transfert de fer aux érythroblastes (Bessis & Breton-Gorius 1962). Les noyaux extrudés sont reconnus grâce à l'expression de phosphatidylsérine (PS) sur la membrane nucléaire. Une diminution de l'ATP et une augmentation de calcium inactive l'aminotranslocase, une enzyme responsable de la séquestration de la phosphatidylsérine à l'intérieur de la membrane cytoplasmique des érythroblastes, et active l'enzyme scramblase, responsable de la translocation des phospholipides entre les bicouches lipidiques de la membrane, et qui est normalement activée en condition de stress (Dolis et al. 1997; Yoshida et al. 2005). La phagocytose des noyaux est essentielle à l'érythropoïèse. De noyaux non-digérés s'accumulent à l'intérieur des macrophages de la rate fœtale chez les souris déficientes en DNase II (endonucléase présente dans les lysosomes de macrophage) en causant une anémie embryonnaire létale (Kawane et al. 2001).

En plus de leur fonction éliminatrice de noyaux, les macrophages produisent et libèrent de la ferritine, qui est ensuite internalisée par les érythroblastes. Une fois à l'intérieur de la cellule, le fer se détache de la ferritine en réponse à l'acidification et la protéolyse, et devient disponible pour la production d'hème (Li et al. 2010; Dautry-Varsat et al. 1983; Leimberg et al. 2008; Hentze et al. 2010). Il va sans dire que la présence des macrophages est essentielle pour le maintien de l'homéostasie du fer, parce que les macrophages sont grandement responsables du recyclage du fer dans la rate en phagocytant les érythrocytes sénescents (Hentze et al. 2010). Cependant, leur rôle dans le maintien de l'intégrité de l'îlot semble beaucoup plus complexe.



#### 1.4 Liens d'adhésion intercellulaires entre cellules de l'îlot érythroblastique

L'*Erythroblast Macrophage Protein* (EMP) est la première protéine à avoir été caractérisée, intervenante dans les interactions physiques entre érythroblastes et macrophages (Hanspal & Hanspal 1994). Exprimée à la surface des macrophages et des érythroblastes (Figure 1.5), l'EMP est essentielle à l'érythropoïèse (Hanspal et al. 1998).



**Figure 1.5 Interactions directes entre le macrophage central et les érythroblastes en différenciation.**

Les macrophages expriment le VCAM-1 et l'intégrine  $\alpha V$ , qui facilitent ses interactions avec les érythroblastes *via* les  $\alpha 4\beta 1$  et ICAM-4. De plus, les cellules érythrocytaires et les macrophages expriment l'EMP à leur surface, augmentant les interactions dans l'îlot (Figure tirée de Back et al. 2014).



Le domaine cytoplasmique d'EMP présente plusieurs sites de liaison de SH2 (*Src Homology 2*) et un site de liaison pour des domaines liant la phosphotyrosine, ce qui laisse croire à une fonction de signalisation. Les érythroblastes mis en culture en présence d'un anticorps bloquant EMP exhibent les mêmes caractéristiques que ceux retrouvés en absence de macrophages : une augmentation importante de l'apoptose ainsi qu'une diminution marquée de la prolifération, de la maturation et de l'énucléation érythrocytaire (Hanspal et al. 1998).

Il semble que la distribution d'actine est compromise en absence d'EMP. Chez les souris de type sauvages, l'EMP s'associe à la F-actine, concentrée dans des érythroblastes en énucléation. Donc, en plus d'être impliquée dans l'expulsion nucléaire, l'association EMP-actine agit potentiellement dans la régulation du cytosquelette chez les réticulocytes. Cette fonction a également des implications chez les macrophages, parce que les macrophages déficients en EMP démontrent des filaments d'actine plus condensés et moins organisés, ce qui les empêche de développer les extensions cytoplasmiques nécessaires à l'intégrité de l'îlot érythroblastique (Bala et al. 2006).

Des interactions ont été identifiées entre la molécule d'adhésion intégrine  $\alpha 4\beta 1$ , exprimée sur les érythroblastes, et son récepteur VCAM-1, exprimé sur les macrophages (Figure 1.5). Des anticorps monoclonaux dirigés vers un ou l'autre de ses récepteurs perturbent l'intégrité de l'îlot érythroblastique (Sadahira et al. 1995).

Le développement des HSC dépend de leurs interactions avec le microenvironnement hématopoïétique et les protéines de la matrice extracellulaire, notamment la fibronectine. L'intégrine VLA-4 est un récepteur spécifique de la fibronectine chez les HSC. La VLA-4 est exprimée par toutes les HSC du foie fœtal. L'application d'anticorps VLA-4 *in utero* chez des souris induit l'anémie sans affecter le développement des cellules de lignées non-érythrocytaires. Ceci laisse croire que VLA-4 joue un rôle critique dans l'érythropoïèse (Hamamura et al. 1996).

L'isoforme de la molécule d'adhésion intercellulaire 4 (*intercellular adhesion molecule 4*, ICAM-4) spécifique aux cellules érythrocytaires, interagit avec l'intégrine  $\alpha V$  sur les macrophages (Figure 1.5) (Manwani & Bieker 2008; Spring 2001). En bloquant le récepteur  $\alpha V$  avec des peptides synthétiques, une diminution de 70% des îlots érythroblastiques reconstitués a été constatée *in vitro*; chez des souris déficientes en ICAM-4 une diminution de 50% de formation des îlots dans la moelle osseuse a été constatée (Lee et al. 2006). De plus, une forme sécrétée de ICAM-4 pourrait potentiellement réguler l'érythropoïèse terminale par compétition avec la forme membranaire d'ICAM-4 pour  $\alpha V$  sur les macrophages centraux, inhibant ainsi l'interaction entre érythroblastes et macrophages (Lee et al. 2003).

Un autre récepteur membranaire connu pour interagir avec les érythroblastes est le CD163 (Figure 1.5)(Fabriek et al. 2007). Cette protéine est un éboueur des complexes hémoglobine-haptoglobine (Kristiansen et al. 2001). CD163 contient aussi un motif d'adhésion érythroblastique qui facilite l'expansion et la survie de ces derniers lors de l'association entre macrophages et érythroblastes (Fabriek et al. 2007).

### 1.5 L'érythropoïétine

L'érythropoïétine (EPO) est une glycoprotéine d'environ 30 à 34 kDa produite par les fibroblastes interstitiels péri-tubulaires du cortex rénal (Bachmann et al. 1993; Maxwell et al. 1993). L'EPO est le principal facteur responsable du contrôle de l'érythropoïèse. Il y a une forte corrélation inverse entre la production de globules rouges et les concentrations d'EPO. Dans des conditions non anémiques, le taux basal d'EPO est de 10 mU/ml, tandis qu'en situation d'hypoxie causée par une perte de globules rouges, les taux concentrations d'EPO peuvent drastiquement augmenter à 10 000 mU/ml (Jelkmann 1992; Adamson 1968).

Le récepteur à l'EPO (EPOR) est exprimé sur les précurseurs érythrocytaires, et cette expression se maximise chez les CFU-E et les ProE. La phosphorylation des résidus multiples de tyrosine a lieu suite à la liaison de l'EPO à EPOR (Wilson & Jolliffe 1999), générant de sites d'assemblage, d'activation et de propagation des signaux mitogènes en activant les voies STAT5, PI3-Kinase/AKT et Ras/MAPK (Richmond et al. 2005). Ces voies sont impliquées dans l'expression de la protéine anti-apoptotique bcl-xl (Socolovsky et al. 1999). La voie d'activation PI3-Kinase/AKT est également responsable de la rétention cytoplasmique et de la phosphorylation du facteur de transcription FoxO3, appartenant à une famille de facteurs de transcription Forkhead de classe O (FoxO1, FoxO3, FoxO4 et FoxO6). Ces facteurs sont impliqués dans le contrôle de l'apoptose, de l'activation du système immunitaire, de la fertilité et de la modulation du métabolisme (Brunet et al. 1999; Kashii et al. 2000; Maiese et al. 2009).

FoxO3 est transféré dans le noyau une fois phosphorylé, où il induit l'expression de la protéine antiproliférative BTG1, et des BIM et TRAIL, des facteurs anti-apoptotiques. L'activation de la voie PI3-Kinase/AKT par l'EPO inhibe donc FoxO3 et par conséquent est responsable de la prolifération des érythroblastes (Bakker et al. 2004; Dijkers et al. 2000). Cependant, l'activation de FoxO3 semble nécessaire pour la régulation de la maturation, du cycle cellulaire et de la durée de vie des cellules érythrocytaires. En effet, l'absence de FoxO3 bloque le cycle cellulaire chez les érythroblastes tardifs. De plus, FoxO3 est impliqué dans la défense contre le stress oxydant, car il induit l'expression d'enzymes telles que la catalase, le superoxyde dismutase 2 (SOD2) et la glutathion peroxydase. Des niveaux élevés d'espèces réactives d'oxygène (ROS) sont retrouvés chez les érythroblastes déficients en FoxO3, ce qui se traduit par une diminution de l'espérance de vie des érythrocytes générés. Le traitement des érythroblastes déficients en FoxO3 avec un antioxydant comme le N-acétylcystéine (NAC) améliore la maturation et la durée de vie des érythrocytes. Cette information nous indique que la résistance au stress oxydatif est

primordiale pour la maturation érythrocytaire car les érythroblastes accumulent de l'hémoglobine, une molécule très oxydante (Marinkovic et al. 2007). De plus, les souris qui sur-expriment l'EPO produisent plus d'érythrocytes, mais ces derniers entrent en sénescence précocement (Bogdanova et al. 2007). Cela suggère que la surexpression de l'EPO retarde l'action de FoxO3 et que les érythrocytes produits seraient moins bien équipés en systèmes antioxydants.

Au cours de la différenciation érythrocytaire, il y a une activation successive des facteurs de transcription GATA-1 et FoxO3, impliqués dans la maturation des érythroblastes à des stades différents. GATA-1 est une protéine de la famille des GATA qui se lie aux séquences d'ADN (A/T) GATA (A/G) à l'aide de motifs doigt de zinc spécifique. GATA-1 est exprimée chez les cellules primitives et érythrocytaires définitives, les mégacaryocytes, les éosinophiles, les mastocytes et les cellules de Sertoli des testicules. GATA-1 est essentiel à l'érythropoïèse puisque des cellules souches embryonnaires des souris chimériques déficientes en GATA-1 sont capables de générer tous les tissus sauf les globules rouges matures. Chez les souris chimériques, les cellules érythrocytaires déficientes en GATA-1 ne se différencient pas au-delà du stade érythroblaste, et meurent par apoptose (Ferreira et al. 2005).

Sur cette base, il a été suggéré que le GATA-1 est directement impliqué dans la survie des cellules. En effet, GATA-1 active la transcription du gène de l'EPOR (Chiba et al. 1993). De plus, un des gènes cibles du GATA-1 code pour la protéine anti-apoptotique Bcl-xl (Gregory et al. 1999). Une autre fonction possible de GATA-1 est la régulation de la progression du cycle cellulaire G1/S. Le contrôle du cycle cellulaire est d'une importance cruciale pour la lignée hématopoïétique puisque les précurseurs doivent proliférer afin de poursuivre la différenciation hématopoïétique et quitter le cycle cellulaire pour se différencier (Whyatt et al. 1997).

GATA-1 est aussi impliquée dans la reprogrammation des précurseurs hématopoïétiques puisqu'elle est capable de reprogrammer les myéloblastes et les

cellules CD34<sup>+</sup> en éosinophiles (Hirasawa 2002; Kulesa et al. 1995). De plus, l'expression forcée de GATA-1 redirige les précurseurs granulocyte-monocyte (GMP) à devenir des cellules érythrocytaires, éosinophiles et basophiles (Heyworth et al. 2002).

Chez les érythroblastes précoces (stades de CFU-E à EryA), l'EPO active GATA-1 et inhibe le FoxO3, permettant la prolifération et la différenciation. Néanmoins, chez les stades tardifs EryB et EryC, FoxO3 n'est plus inhibé par l'EPO puisque l'EPOR n'est plus exprimé, et cette expression induit la synthèse d'enzymes antioxydants qui renforcent la résistance aux ROS et la survie des érythroblastes. En effet, les érythroblastes synthétisent et accumulent une importante quantité d'hémoglobine au cours de leur maturation, et le fer contenu dans l'hémoglobine génère des ROS par la réaction de Fenton (Winterbourn 1990). L'expression de ces enzymes antioxydants est donc cruciale pour la survie des érythroblastes tardifs.

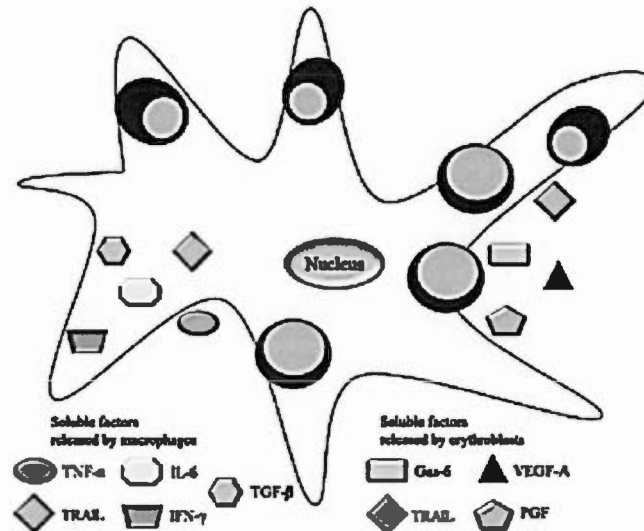
Il est intéressant de remarquer que l'EPO n'est pas essentielle pour la production des BFU-E, les cellules les plus précoces de la lignée érythrocytaire. L'EPO ne recrute donc pas les cellules dans la lignée érythrocytaire et ne régule pas leur destin cellulaire, mais plutôt soutient la croissance, la survie et la différenciation des CFU-E, les ProE et les érythroblastes basophiliques exprimant l'EPOR (Koury & Bondurant 1990; Spivak et al. 1991; Sawyer & Penta 1994).

## 1.6 Cytokines solubles

Comme mentionné plus haut, l'EPO est la principale hormone régulatrice de l'érythropoïèse et est produite principalement par les reins et secondairement par le foie (Jacobson et al. 1957). Cependant, il a été démontré que l'ARNm *Epo* et la protéine EPO sont exprimés par les précurseurs érythrocytaires (Stopka et al. 1998; Hermine et al. 1992).

De plus, les macrophages secrètent des facteurs solubles pro-érythropoïétiques (Gordon et al. 1980) et des recherches ont suggéré la production d'EPO (Rich et al. 1982) et l'expression d'ARNm *Epo* par les macrophages (Rich et al. 1988). Récemment, il a été rapporté que les ostéoblastes de la moelle osseuse, cellules reconnues par leur fonction formatrice de l'os, participent aussi au maintien de l'homéostasie de l'EPO dans la moelle osseuse (Rankin et al. 2012).

L'érythropoïèse n'est pas seulement régulée par l'EPO. Le macrophage central participe aussi en relâchant des cytokines solubles dans le milieu (Figure 1.6). Il est intéressant de constater que le TGF- $\beta$ , l'IL-6, le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  sont relâchés dans le milieu de l'îlot, et ces cytokines sont associées à l'inflammation chronique, qui inhibe l'érythropoïèse (Dzierzak & Philipsen 2013). Il a été démontré que les macrophages expriment le « insulin-growth factor 1 (IGF-1) » (Martinez et al. 2006; Wynes & Riches 2003), qui est étroitement impliqué dans l'érythropoïèse. L'IGF-1 soutient le développement des progéniteurs en milieu de culture semi-solide et peut maintenir la viabilité des ECFC (*erythroid colony-forming cells*) en diminuant l'apoptose. De plus, l'IGF-1 joue un rôle essentiel dans la prolifération et le passage au stade avancé de développement érythrocytaire. En présence d'EPO, l'IGF-1 augmente considérablement la synthèse d'hème et entraîne une légère prolifération cellulaire, mais augmente considérablement la condensation et l'énucléation des érythroblastes tardifs. Ainsi, l'EPO seule ne peut compléter la condensation nucléaire terminale indispensable à l'énucléation. L'IGF-1 augmente donc la maturation et la prolifération érythrocytaire (Muta et al. 1994). Remarquablement, les HSC des personnes atteintes de *Polycythemia vera*, un désordre myéloprolifératif caractérisé par un hémocrite très élevé sont 100 fois plus sensible à l'action de l'IGF-1, et de manière EPO-indépendante (Weinberg 1997).



**Figure 1.6** Facteurs solubles régulateurs de l'érythropoïèse.

Le macrophage central ainsi que les érythroblastes sécrètent des facteurs solubles lors de l'érythropoïèse. Ceux-ci sont composés de facteurs de régulation négatifs telle que le TNF- $\alpha$ , le TGF- $\beta$ , l'IL-6, et l'IFN- $\gamma$  exprimés par le macrophage central et les régulateurs positifs Gas-6, VEGF-A et PGF, relâchés par l'érythroblaste. TRAIL (TNF *Related Apoptosis Inducing Ligand*) est un régulateur négatif sécrété par les deux types cellulaires (selon de Back et al. 2014).

### 1.7 Validation expérimentale des effets pro-érythropoïétiques issus des macrophages

Plusieurs études ont adressé l'action pro-érythropoïétique des macrophages. Il est possible de réduire considérablement le nombre de macrophages *in vivo* en utilisant plusieurs techniques. Une des techniques utilise le Clodronate incorporé à l'intérieur d'un liposome (Liu et al. 2015; Ramos, Casu, Gardenghi, et al. 2013a; Jacobsen et al. 2014; Rooijen & Hendrikx 2010). Le Clodronate a une courte demi-vie une fois relâché en circulation, et ne passe pas la membrane lipidique des cellules (Rooijen & Hendrikx 2010). En se basant sur l'internalisation des liposomes, il est possible d'administrer la petite molécule hydrophile de Clodronate à l'intérieur du macrophage, qui s'accumule et cause l'apoptose. De plus, le Clodronate n'étant pas toxique pour les cellules à la concentration d'administration testée, les liposomes de Clodronate sont inertes et spécifiques aux cellules phagocytaires. Ainsi, il est possible de cibler la mort systémique des macrophages (Rooijen & Hendrikx 2010).





## HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Nous émettons l'hypothèse que les macrophages contribuent à l'érythropoïèse homéostatique en produisant de l'EPO ou des analogues fonctionnels à l'EPO, et que leur absence provoque une réponse compensatoire d'EPO rapide par les reins. Nous nous sommes basé sur l'étude de Ramos et al. (Ramos, Casu, Gardenghi, et al. 2013b) dans lequel une administration prolongée de Clodronate de liposome induit une anémie systémique, une perte quasi-totale des macrophages ainsi qu'une production élevée d'EPO plasmatique.

Afin de valider cette hypothèse, nous avons étudié *in vitro* l'effet du contact direct des macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM) et du surnageant conditionné des BMDM sur la différenciation des cellules lignées négatives (enrichies en HSC) en absence d'EPO. Nous avons aussi caractérisé l'impact d'une déplétion *in vivo* à court terme des macrophages sur l'érythropoïèse.

Les objectifs suivants ont été adressés :

- Validation d'un modèle *in vitro* pour étudier les propriétés pro-érythropoïétiques des macrophages ou des produits solubles sécrétés par ces cellules, quand ils sont en culture dans un milieu érythrocytaire complexe mais exempt de EPO.
- Évaluation de l'impact d'une déplétion à court terme de macrophages chez la souris sur la production des précurseurs érythrocytaires et érythroblastes dans la moelle osseuse.



## DESCRIPTION DE L'IMPLICATION DE L'ÉTUDIANT DANS LES TRAVAUX ET LA RÉDACTION D'UN ARTICLE

Cette étude a eu besoin d'un travail d'équipe entre Hugo Roméro, Tatiana Scorza, et moi-même. Les manipulations *in vivo* (injections, prélèvement sanguins) et un ELISA ont été effectués par Hugo Roméro. Tatiana Scorza a élaboré le patron de recherche, a effectué un ELISA, à aider à la révision de l'article. J'ai mis en place le modèle *in vitro* de culture, l'élaboration du protocole de microscopie confocale, les Western Blots, les PCR, l'acquisition et l'analyse des populations érythrocytaires par FACS ainsi que la rédaction de l'article.



## CHAPITRE II

ARTICLE: MACROPHAGES CONTRIBUTE TO ERYTHROPOIESIS IN  
ABSENCE OF EXOGENOUS EPO THROUGH SECRETION OF SOLUBLE  
FACTORS PROMOTING EARLY ERYTHROBLAST DEVELOPMENT.

En préparation pour PlosOne.



## 2.1 Abstract

Erythropoiesis is primarily regulated by the renal hormone erythropoietin (EPO), which stimulates the proliferation and differentiation of erythroid progenitors through its anti-apoptotic and antioxidant effects. Under homeostatic conditions, erythroblasts in the bone marrow organize in islands around a central macrophage, which supports iron exchange required for hemoglobin synthesis and eliminates extruded nuclei. The fact that *in vivo* depletion of macrophages in mice by clodronate rapidly results in deficient erythropoiesis led us to formulate the hypothesis that macrophages may be a source of EPO *in situ*, or may produce functional analogues of EPO. To address this hypothesis, the contribution of macrophage-derived soluble factors as well as cell-to-cell interactions in erythropoiesis *in vitro* under EPO-free conditions was studied. Lineage negative bone marrow cells enriched by negative selection were cultured in the presence of bone marrow derived macrophage (BMDM) conditioned medium, or in direct contact with BMDM, in a medium containing human insulin, holotransferrin, deionized BSA and no EPO. The impact of macrophage depletion on erythropoiesis was studied by clodronate liposome injection *in vivo*. Erythroid populations were studied using fluorochrome conjugated anti-CD71 and anti-Ter119 antibodies by FACS and confocal microscopy, or by histological May-Grünwald and Giemsa staining. Our results demonstrate that BMDM conditioned medium promotes the differentiation of early erythroid stages (pro-erythroblasts) and inhibits late stage erythroblasts. Macrophage depletion caused shutdown erythropoiesis in the bone marrow without inducing a compensatory EPO response from the kidney. EPO was not detected by PCR, Western Blot nor ELISA when evaluating BMDM conditioned supernatants or BMDM lysates obtained under normoxic or hypoxic culture conditions. These results suggest that macrophages stimulate production of proerythroblasts in absence of EPO.



## 2.2 Introduction

Erythropoiesis is a complex differentiation process taking place in the specialised microenvironment of the erythroblastic island, under the tight regulation of the hormone erythropoietin (EPO) (Bunn 2013). First described in 1958 by Marcel Bessis, erythropoietic islands are composed of a central macrophage surrounded by hematopoietic progenitor cells at varying stages of erythroid differentiation (Bessis & Breton-Gorius 1962). Interactions between macrophages and progenitor cells seem essential to erythroid cell differentiation, as adhesion molecules such as Erythroblast Macrophage Protein (EMP) promote erythroblast survival and enucleation. Others proteins, such as VLA-4 and VCAM-4 are implicated in cell-to-cell contact but their exact functions are unknown (Dzierzak & Philipsen 2013). Central macrophages secrete soluble pro-erythropoietic factors that act as functional analogs to EPO *in vivo* (Gordon et al. 1980), but remain mischaracterized. Human hepatic macrophages and monocytes secrete EPO during foetal development (Ohls 1994) but there are only three studies reporting EPO mRNA in bone marrow and splenic macrophages of mice (Rich et al. 1982; Rich et al. 1988; Luo et al. 2016). The precise role of macrophage-derived EPO in steady state erythropoiesis remains unclear (Manwani & Bieker 2008).

EPO is a 30-34 kDa glycoprotein produced by interstitial peritubular fibroblasts of the renal cortex (Bachmann et al. 1993; Maxwell et al. 1993). It is the main hormone controlling erythropoiesis: a strong inverse correlation is observed between RBC production and EPO concentrations. Basal EPO rates of 10 mU/ml under homeostatic conditions can rise drastically to 10.000 mU/ml under hypoxic stress (Jelkmann 1992; Adamson 1968). The EPO receptor (EPOR) is strongly expressed on erythroid CFU-E and ProE. Binding of EPO to its receptor activates signalling cascades leading to

expression of anti-apoptotic factors and proliferation of erythroblasts through PI3-Kinase/AKT (Bakker et al. 2004; Dijkers et al. 2000).

Data from our laboratory show that macrophage depletion rapidly alters bone marrow erythropoiesis in steady state conditions and exacerbates anemia in *Plasmodium chabaudi adami*-infected mice, (Romero H; article in preparation). Ramos et al. (2013) reported an important role for macrophages in stress erythropoiesis, being essential for the recovery from induced anemia by bleeding, but also contributing to Polycythemia vera and  $\beta$ -Thalassemia pathology (exacerbated erythropoiesis). Although these authors were interested in the pathological impact of macrophages, their supplementary data demonstrated significant drops in immature erythroid cells in the bone marrow and liver, and increased production of EPO by the kidney in macrophage deficient mice with no pathology, following 7 weeks of macrophage depletion. Based on these observations, we hypothesize that macrophages contribute to homeostatic erythropoiesis by producing EPO or functional analogous of EPO, and that their absence rapidly evokes a compensatory EPO response by the kidney. To address this hypothesis, we studied *in vitro* the impact of BMDM on the development of RBC from lineage negative cells (equivalent to HSC) in absence of EPO. Although EPO-was not detected, the data obtained demonstrates that BMDM and BMDM conditioned medium promote erythroid development.

## 2.3 Material and Methods

### 2.3.1 *Animal procedures*

All procedures with mice were approved by the Animal Care Committee of the Université du Québec à Montréal (protocols 0514-R1-778-0515 and 0515-R2-778-0516) and according to relevant national and international guidelines.

### 2.3.2 *In vitro erythropoiesis model*

Bone marrow single cell suspensions were prepared by aseptic removal of tibia and femur epiphyses and marrow flushing into 100  $\mu$ L of PBS by centrifugation at 300g during 5 min, as previously described (Roméro et al. 2016). Bone marrow single-cell suspensions were counted and suspended to  $100 \times 10^6$  cells/mL. Lineage negative (Lin) cells were enriched using the *EasySep Mouse hematopoietic progenitor enrichment* kit (Stem Cell Technologies, Vancouver, CA) and were suspended into Erythroid Differentiation Medium (EDM) (IMDM 15% FBS, 1% detoxified BSA, 200  $\mu$ g/mL holotransferrin, 10  $\mu$ g/mL insulin, 100  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol, 50 units/mL penicillin G and 50  $\mu$ g/ml streptomycin) (Shuga et al. 2007).

### 2.3.3 *BMDM supernatant conditioning*

Standard 12-well TC Plates (cat. No. 83.3921) were treated with human fibronectin (2  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) for 2 hours (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) (Aviva systems Biology, San Diego, CA). Conditioned medium was prepared with BMDM ( $1 \times 10^6$  cells/mL) in EDM for 72h (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Supernatants were collected and centrifuged (300g, 5 minutes) to completely remove cells. Control EDM was treated in a similar manner, and served as control conditioned medium.

#### **2.3.4 *In vitro* erythropoiesis and confocal imaging**

Ibidi  $\mu$ -Slide 8 well chambered cover slips (Cat. No. 80826) were treated with human fibronectin ( $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) for 2 hours ( $37^\circ\text{C}$ ,  $5\%\text{CO}_2$ ) (Aviva systems Biology, San Diego, CA). After 72h incubation, Lin- cells ( $2 \times 10^6$  cells/mL) or non-adherent bone marrow cells ( $4 \times 10^6$  cells/mL) were incubated with anti-mouse CD16/32 antibody (Clone 93) for 5 minutes at  $4^\circ\text{C}$  in the dark. Cells were then stained with Ter119-Alexa Fluor 488, transferrin receptor- (CD71) Alexa Fluor555 and F4/80 Alexa Fluor 647 antibodies for 1 hour at  $4^\circ\text{C}$  in the dark. Cells were washed with PBS and fixed with paraformaldehyde (4%) for 20 minutes. Cells were then washed with PBS and stained with DAPI  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  for 10 min. Cells were finally washed 3 times with PBS and covered with glycerol 50%. Imaging was performed with a Nikon A1+ confocal microscope and analyzed using Fiji open source software (Schindelin et al. 2012).

#### **2.3.5 FACS analysis of erythroid populations**

For analysis of erythroid populations, cells were incubated with anti-mouse CD16/32 antibody (Clone 93) for 5 minutes at  $4^\circ\text{C}$  in the dark. Cells were then incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-mouse CD71, phycoerythrin (PE)-conjugated Ter119 and 7-amino-actinomycin D (7AAD) viability staining solution for 15 minutes. Erythroid subpopulations were analyzed by gating for Ter119<sup>+</sup> cells on a forward-scatter/CD71<sup>+</sup> scatterplot as described by Ramos et al. (Ramos, Casu & Gardenghi 2013). All reagents were from BioLegend, San Diego, CA. Analytical flow cytometry was performed on an Accuri C6 (Bekton Dickinson, USA) and analyzed using the BD Accuri Analysis Software.

#### **2.3.6 Assessment of EPO mRNA by PCR**

RNA from tissue and culture samples was extracted using Trizol reagent (Sigma, St-Louis, MO) following the Chomczynski and Sacchi (Chomczynski & Sacchi 1987) method of extraction. RNA purity was quantified by Nanodrop (ThermoScientific,

MA, USA). cDNA was synthesized using the Omniscript RT (Qiagen) kit. The Taq PCR Core (Qiagen) kit was used with specific EPO and GAPDH primers: EPO sense 5'- ATGAAGACTTGCAGCGTGGA- 3', antisense 3'- TTCTGCACAACCCATCGTGA-5', GAPDH sense 5' TATGTCGTGGAGTCTACTGGT-3', antisense 3'-GAGTTGTCATATTTCTCGT-5'.

### **2.3.7 Western blot for EPO detection**

Cells and tissues were lysed on ice in RIPA buffer (50 mM Tris-HCL pH8, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM NaF and protease inhibitors). Lysates were then sonicated (3 times 15 sec.) and centrifuged at 16.000g for 20 minutes at 4°C. Supernatant protein concentrations were quantified by the Lowry assay (DC protein assay, BioRad, Mississauga, ON, Canada). Proteins (20-30 µg/lane) were subjected to SDS-PAGE, and transferred to a nitrocellulose membrane (BioRad). Membranes were blocked in SuperBlock blocking buffer (Thermo Scientific) for 1 h, washed with TBS/0.1% Tween 20, and incubated with biotinilated anti-EPO (R&D systems) overnight at 4°C. Membranes were then washed and incubated with anti-biotin-HRP (Abcam). Proteins were visualized using SuperSignal West pico chemiluminescent substrate (Thermo Scientific).

### **2.3.8 EPO ELISA**

Supernatant was concentrated using Amicon Ultra-0.5 mL centrifugal filters for protein purification and concentration and EPO concentrations were measured by ELISA (Quantikine mouse/rat EPO immunoassay R&D systems, Inc) following manufacturer's instructions.

### **2.3.9 Statistical Analysis**

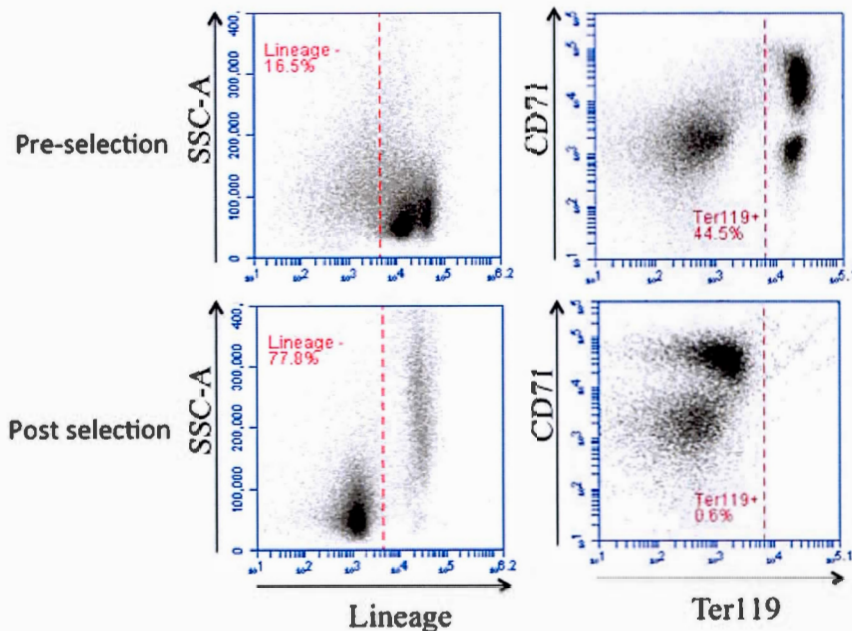
Statistical analyses were performed with a one-way ANOVA and analysis of variance followed Tukey's post-test for comparison of more than two groups and an unpaired t-test for comparison of two groups.



## 2.4 Results

### BMDM stimulate erythroblast proliferation in synergy with EPO

The *in-vitro* model for erythropoiesis to be used in this research was first validated. For this, lineage negative (Lin<sup>-</sup>) cells were enriched by negative selection (Figure 2.1) to eliminate as possible Ter119<sup>+</sup> erythroid cells. This negative selection procedure efficiently removed cells expressing myeloid and lymphoid differentiation markers.



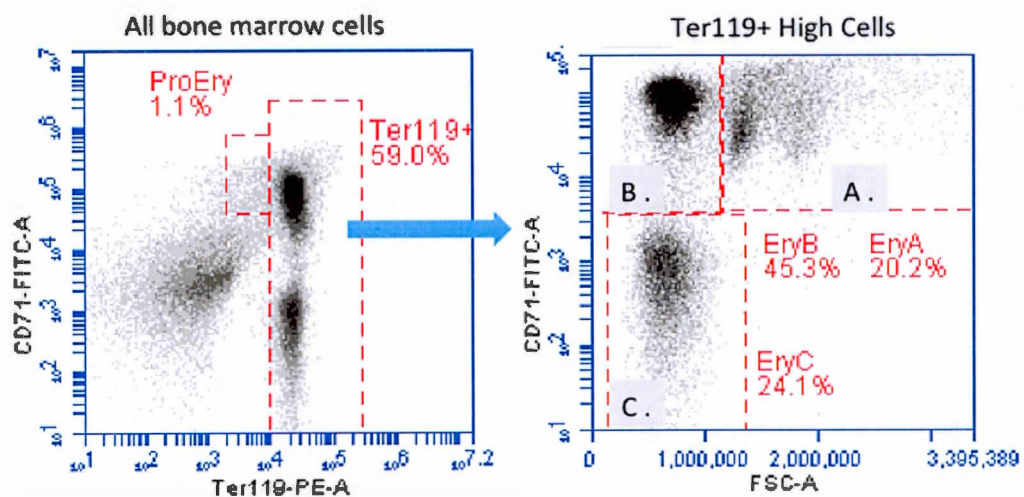
**Figure 2.1 Efficiency of Lineage<sup>-</sup> cell enrichment by negative selection.**

Total bone marrow cell suspensions were incubated overnight in 100 mm petri dishes ( $40 \times 10^6$  cells/petri) to remove adherent cells. Lineage negative cells were purified from non-adherent cells using the EasySep™ Mouse Hematopoietic Progenitor Cell Enrichment Kit. Purification was validated via Cytofluorometry using Ter119, CD71 and lineage staining, resulting in less than 0.5% of Ter119<sup>+</sup> cells.





Enriched Lin<sup>-</sup> cells were then cultured in EDM medium containing holotransferrin, human insulin, deionized BSA and EPO in absence or presence of BMDM, to study the impact of macrophages in the proliferation and differentiation of Lin<sup>-</sup> cells into late-staged erythroid cells. After three days of culture, particular differences between erythroblast subpopulations according to their differentiation stages were discriminated by gating Ter119<sup>+</sup> cells and analyzing gated cells with a FSC/CD71 scatterplot by FACS analysis (Figure 2.2). A modest synergy was measured between BMDM and EPO in the production of Ter119<sup>+</sup> cells.

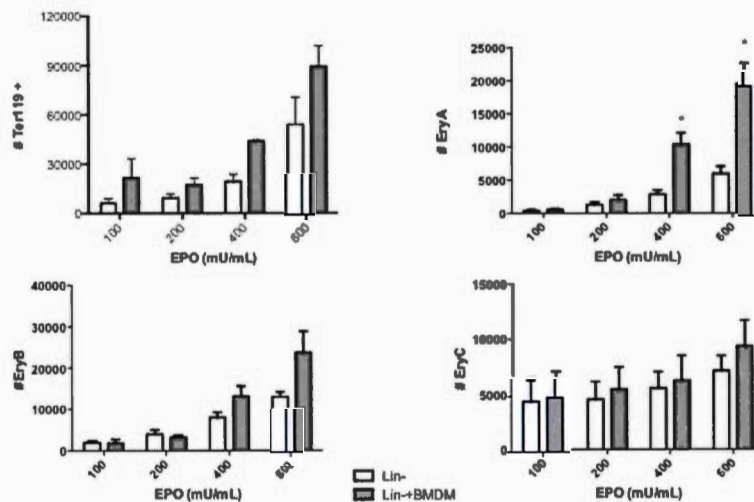


**Figure 2.2 Erythroblast gating strategy.**

An erythroid gate was established on Ter119<sup>+</sup> cells of total bone marrow and events were plotted as CD71/Forward scatter (FSC) profiles. EryA cells (A) are large CD71<sup>+</sup> cells, EryB (B) are smaller CD71<sup>+</sup> cells whereas EryC are small CD71<sup>+</sup> cells.



However, higher numbers of Ter119<sup>+</sup> cells were evidenced in Lin<sup>-</sup> cells and BMDM co-cultures, in absence of exogenous EPO (Figure 2.3A). In addition, early stage erythroblasts (EryA) increased in cultures containing BMDM in the presence of EPO at 400 and 600 mU concentrations (Figure 2.3 B,  $p < 0.01$ ). The numbers of EryB and EryC cells remained comparable in conditions with or without macrophages.



**Figure 2.3 Macrophages enhance EPO-dependent proliferation and differentiation of lineage negative cells into early basophilic erythroblasts.**

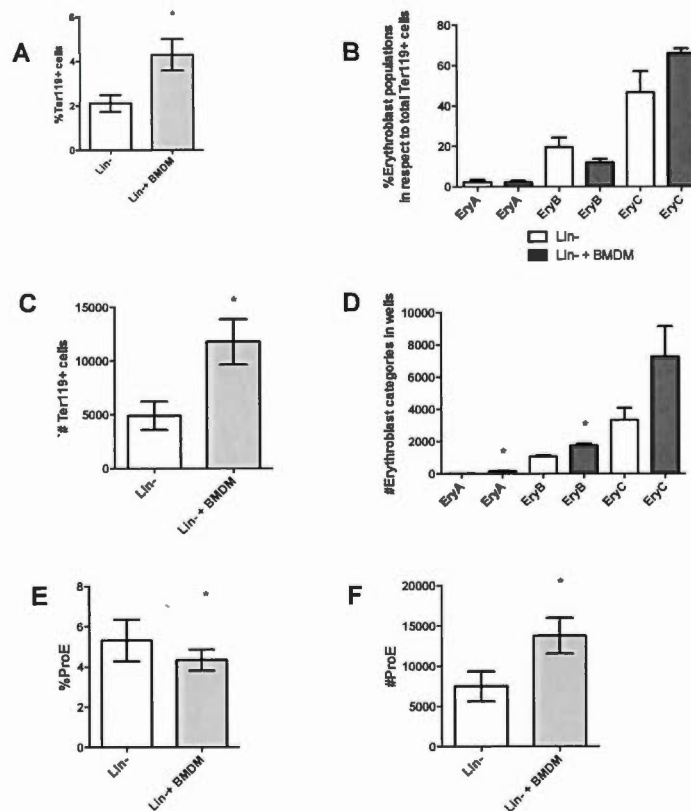
Lineage negative cells ( $2.5 \times 10^5$ ) were cultured with or without  $1.25 \times 10^4$  BMDM in fibronectin covered Labtek™ in erythrocyte differentiating medium in the presence of increasing EPO concentrations (IMDM 15% FBS, 1% BSA, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  holotransferrin, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  insulin, 100  $\mu\text{M}$   $\beta$ -mercaptoethanol, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , P/S). After 72h of culture, the numbers (A) of Ter119<sup>+</sup> Cells were evaluated by flow cytometry (BD accuri C6). The Erythroblast sub-populations EryA (B), EryB (C), EryC (D) were measured by Ter119, CD71 double staining and Forward Scatter parameter (FSC) in cytofluorometry. \* indicates a significant difference of  $P < 0.05$  by two ANOVA test ( $n=6$ ).



**BMDM stimulate Lineage- cell differentiation in absence of EPO**

The pro-erythropoietic function of macrophages in absence of exogenous EPO was further characterized *in vitro*. FACS analysis demonstrated increased percentages of Ter119<sup>+</sup> cells in 72 h cultures with BMDM (Figure 2.4 A; p <0.05), without major differences in the percentages of the distinct erythroblast stages (Figure 2.4 B). However, in respect to total cell numbers, significantly more Ter119<sup>+</sup> cells (Figure 2.4 C) and EryB cells (Figure 2.4 D, p <0.05) were counted in cultures with macrophages. Although the relative percentages of ProE were lower in cultures with BMDM (Figure 2.4.E), their total numbers significantly increased (Figure 2.4 F). Altogether, these results indicate increased development of the EPO-dependent stages ProE, EryA and EryB cells in cultures containing BMDM and no exogenous EPO.





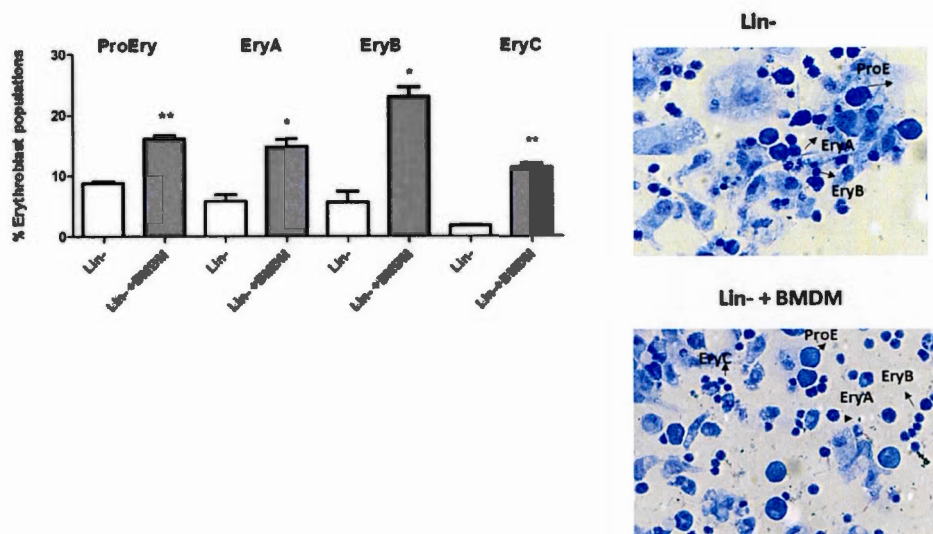
**Figure 2.4 Macrophages promote the differentiation of lineage negative cells into early proerythroblasts and late basophilic erythroblasts in absence of EPO.**

Lineage negative cells ( $2.5 \times 10^5$ ) were cultured with or without  $1.25 \times 10^4$  BMDM in fibronectin covered Labtek™ in erythrocyte differentiating medium without EPO (IMDM 15% FBS, 1% BSA, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  holotransferrin, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  insulin, 100  $\mu\text{M}$   $\beta$ -mercaptoethanol, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , P/S). After 72h of culture, Ter119<sup>+</sup> Cells were evaluated by flow cytometry (BD accuri C6). The Erythroblast sub-population ProE, EryA, EryB and EryC were measured by Ter119, CD71 double staining and Forward Scatter parameter (FSC) in cytofluorometry. \* indicates a significant difference of  $P < 0.05$ , by unpaired t test ( $n=4$  independent experiments).





In parallel to FACS analysis, quantitative analysis of Giemsa stains were effectuated in duplicate cultures, which revealed higher percentages of all erythroblast populations; these effects were particularly more significant for ProE ( $p < 0.01$ ) and EryC cells ( $p < 0.01$ ) (Figure 2.5).

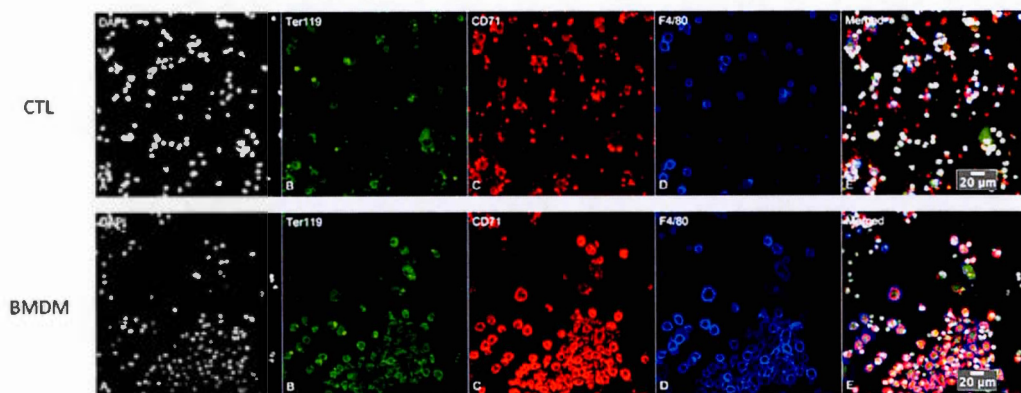


**Figure 2.5** Histological confirmation of erythropoiesis by macrophages.

Lineage negative cells ( $2.5 \times 10^5$ ) were cultured with or without  $1.25 \times 10^4$  BMDM in fibronectin covered Labtek™ in erythrocyte differentiating medium without EPO (IMDM 15% FBS, 1% BSA, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  holotransferrin, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  insulin, 100  $\mu\text{M}$   $\beta$ -mercaptoethanol, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , P/S). After 72h of culture, different erythroblast subpopulations were evaluated by Giemsa staining. \* and \*\* indicate a significant difference of  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  respectively by unpaired t test ( $n=4$  independent experiments).



Next, a more qualitative analysis by confocal imaging was used, which confirmed enhanced proliferation of Ter119+CD71<sup>+</sup> erythroid cells in close proximity to macrophages (F4/80+ cells) (Figure 2.6), suggesting that direct contact between erythroblasts and macrophages stimulates erythroid differentiation.



**Figure 2.6 Confocal imaging confirmation of enhanced erythroid differentiation by macrophages.**

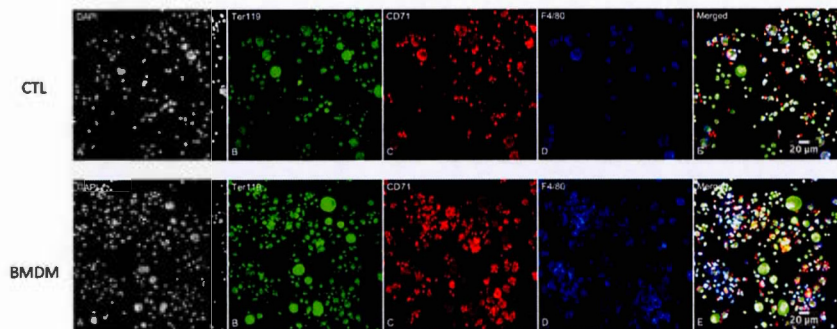
Lineage negative cells ( $2.5 \times 10^5$ ) were cultured with or without  $1.25 \times 10^4$  BMDM in fibronectin covered Labtek™ in erythrocyte differentiating medium without EPO (EDM: IMDM 15% FBS, 1% BSA, 200 $\mu$ g/mL holotransferrin, 10  $\mu$ g/mL insulin, 100  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol, 50  $\mu$ g/mL, P/S). After 72h of culture in fibronectin covered Ibidi™ wells, cells were stained with DAPI, anti-Ter119.Alexa Fluor 488, and anti-CD71-Alexa Fluor555 and F4/80 Alexa Fluor 647 antibodies.



### **BMDM conditioned medium promotes proerythroblastic cell proliferation and island formation but inhibits late stage erythropoiesis**

The next objective in our study was to discern to which extent the pro-erythropoietic function of BMDM depended on direct cell-to-cell contact. For this, BMDM were cultured in EDM without EPO for 72 hours (1 million cells per mL) and supernatant was recovered, centrifuged and directly used as culture medium for Lin<sup>-</sup> cells. May-Grunwald staining revealed promotion of erythroblastic islands (Supplementary Figure 1) in well-containing BMDM-conditioned supernatant.

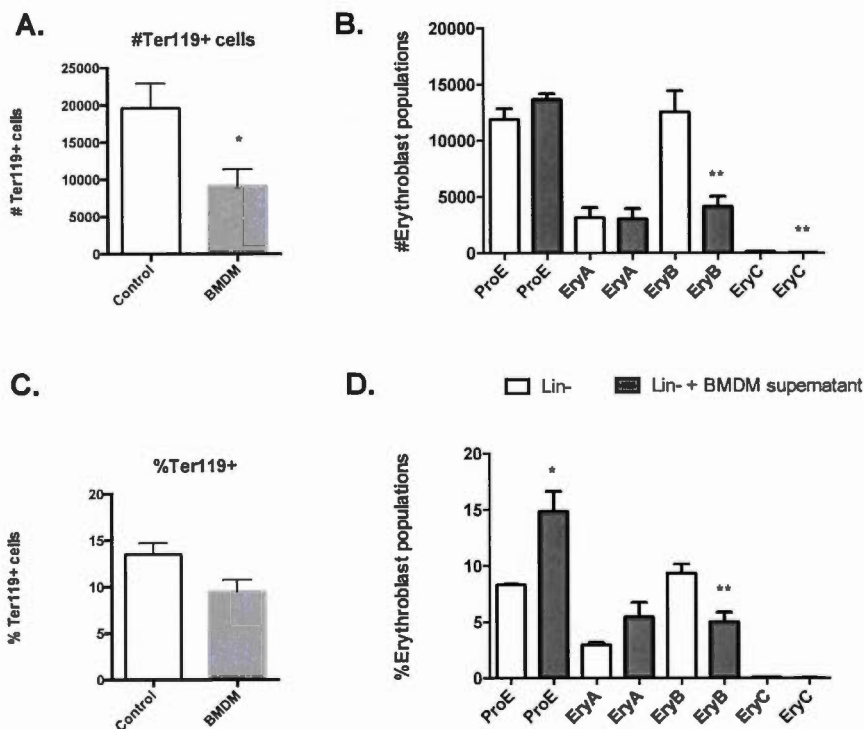
Although confocal imaging did not indicate major effects on Ter119<sup>+</sup> cells (Figure 2.7), flow cytometry analysis indicated less Ter119<sup>+</sup> cell numbers (Figure 2.8 A,  $p < 0.05$ ) as well as lower numbers of EryB and EryC cells in wells with BMDM-conditioned media, assigning inhibitory effects to macrophage-derived soluble factors.



**Figure 2.7 Analysis of macrophage conditioned media effects on lineage negative cells by confocal imaging.**

Lin<sup>-</sup> ( $2 \times 10^6$  cells/mL) were cultured with either control or BMDM-conditioned medium (IMDM 15% FBS, 1% BSA, 200 µg/mL holotransferin, 10 µg/mL insulin, 100 µM β-mercaptoethanol, 50 µg/mL, P/S). After 72h of culture in fibronectin covered Ibidi™ wells, cells were stained with DAPI, anti-Ter119-Alexa Fluor 488, anti-CD71-Alexa Fluor 555 and F4/80 Alexa Fluor 647 antibodies.





**Figure 2.8 BMDM conditioned media inhibits late stage erythroblasts.**

Lineage negative cells ( $2 \times 10^6$  cells/mL) were cultured with either control or BMDM-conditioned medium (IMDM 15% FBS, 1% BSA, 200  $\mu$ g/mL holotransferin, 10  $\mu$ g/mL insulin, 100  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol, 50  $\mu$ g/mL, P/S). After 72h of culture in fibronectin covered Ibidi™ wells, the Erythroblast sub-population ProE, EryA, EryB and EryC were measured by Ter119, CD71 double staining and Forward Scatter parameter (FSC) in cytofluorometry. \* and \*\* indicate a significant difference of  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  respectively by unpaired t test ( $n=5$ ).

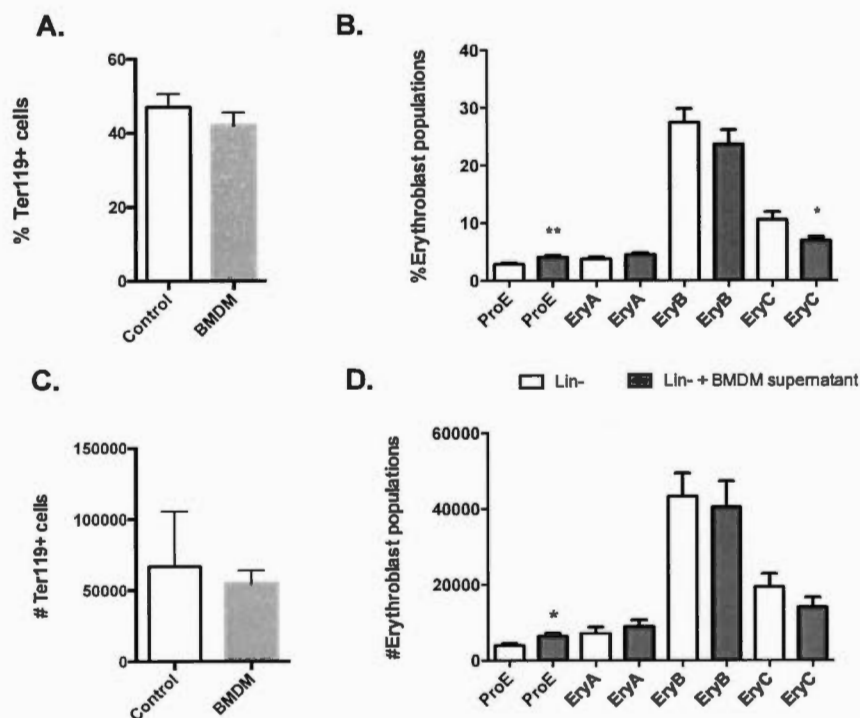




**BMDM conditioned medium enhances early stage erythroid differentiation in non-adherent bone marrow cell suspensions**

Considering the inhibitory effects of BMDM-conditioned medium on EryB and EryC erythroid development from Lin<sup>-</sup> cells, the impact of this conditioned media on cells ongoing already erythroid differentiation was also investigated. For this, total bone marrow cell suspensions were incubated overnight to remove adherent cells, and the non-adherent cells were then cultured in the presence of BMDM supernatant. As observed for Lin<sup>-</sup> cell cultures, FACS analysis confirmed a decrease in Ter119<sup>+</sup> cells in bone marrow non-adherent cells cultured with BMDM-conditioned medium (Figure 2.9 A, C), which was concurrent with lower EryB cell numbers but also with lower EryC cell numbers (Figure 2.9 D). A significant increase in the numbers of ProE cell populations was also evidenced (Figure 2.9 B, D), whereas no significant effect was measured on the EryA population (Figure 2.9 D).



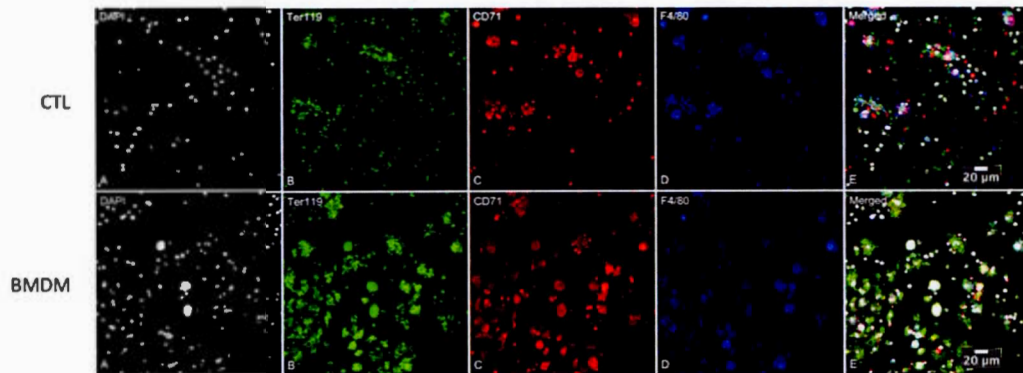


**Figure 2.9** Macrophage conditioned medium stimulates the proerythroblast stage in bone marrow suspensions.

Total bone marrow was incubated overnight in 100 mm petri dishes ( $40 \times 10^6$  cells/petri) to remove adherent cells. Non-adherent bone marrow cells ( $4 \times 10^6$  cells/mL) were cultured with either control or macrophage conditioned medium (IMDM 15% FBS, 1% BSA, 200  $\mu$ g/mL holotransferin, 10  $\mu$ g/mL insulin, 100  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol, 50  $\mu$ g/mL, P/S). After 72h, cells were analyzed by FACS with Ter119, CD71 and 7AAD staining. \* and \*\* indicate a significant difference of  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  respectively by unpaired t test ( $n=16$  for control,  $n=17$  for BMDM).

Confocal imaging revealed erythroblast islands in 72h non-adherent bone marrow cell cultures in the presence of BMDM conditioned medium (Figure 2.10).





**Figure 2.10 Erythroid development and survival of bone marrow precursors is enhanced by macrophage conditioned medium.**

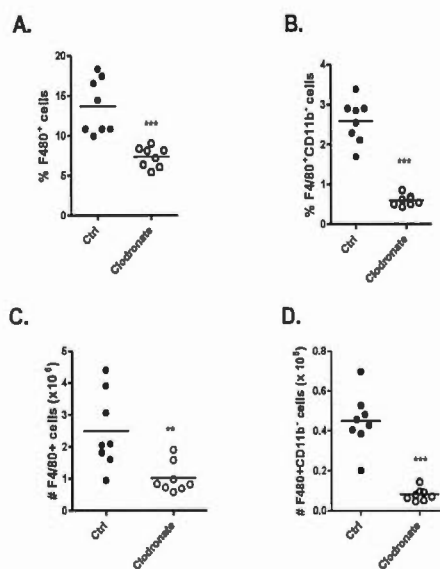
Total bone marrow was incubated overnight in 100mm petri dishes ( $40 \times 10^6$  cells/petri) to remove adherent cells. Non-adherent bone marrow cells ( $4 \times 10^6$  cells/mL) were cultured with either control or macrophage conditioned medium (IMDM 15% FBS, 1% BSA, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  holotransferin, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  insulin, 100  $\mu\text{M}$   $\beta$ -mercaptoethanol, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , P/S). After 72h culture in fibronectin covered Ibidi™ wells, cells were stained with DAPI, Ter119-Alexa Fluor 488, CD71 -Alexa Fluor555 and F4/80 Alexa Fluor 647 antibodies.

Altogether, the *in vitro* data indicate enhanced erythropoiesis when cell-to-cell contact is provided between  $\text{Lin}^-$  cells and BMDM in absence of exogenous EPO, with particular stimulation of ProE, EryA and EryB. However, if cell-to-cell-contact is not allowed, BMDM soluble factors inhibits the basal differentiation of  $\text{Lin}^-$  cells into EryB cells.



### ***In vivo* depletion of macrophages with clodronate liposomes abrogates early erythroblast formation in mouse bone marrow**

With the aim of validating the relative contribution of macrophages on erythropoiesis *in vivo*, mice were injected with Clodronate liposomes 7 days prior to sacrifice. Clodronate has a very short half-life and does not cross the phospholipid bilayers of liposomes or cell membranes. Encapsulation of Clodronate into anionic liposomes targets it to phagocytes such as macrophages and cause apoptosis, thus permitting the specific depletion of phagocytic cells (Rooijen & Hendrikx 2010) as confirmed by our analysis of bone marrow cells (Figure 2.11).

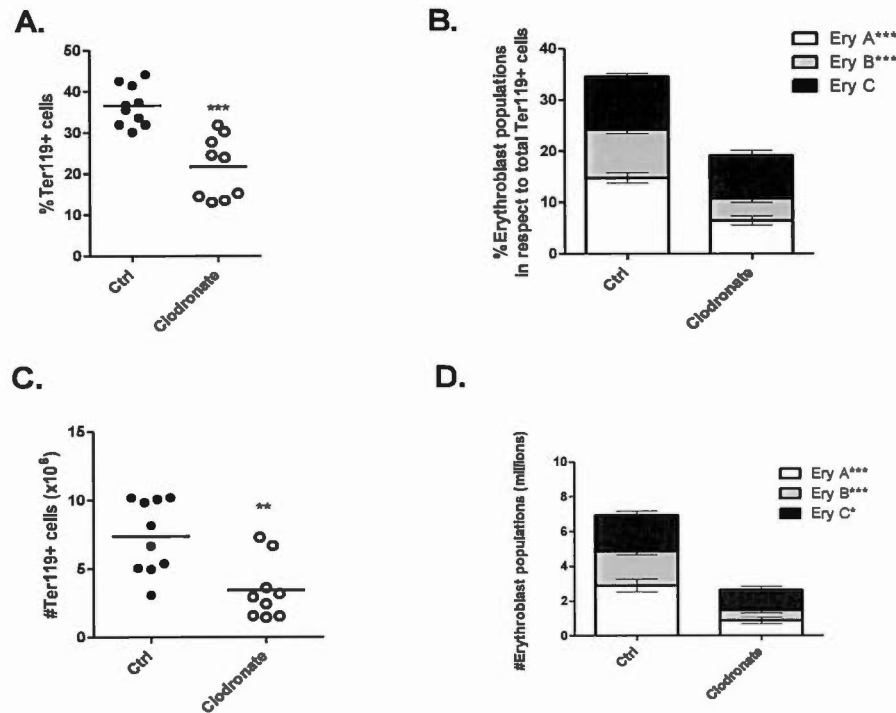


**Figure 2.11 Clodronate significantly depletes bone marrow macrophages.**

Mice were treated with Clodronate liposomes (Clodronate) and PBS (control) 7 days prior to sacrifice. Bone-marrow macrophages were identified with F4/80 and anti-CD11b antibody. \*\* and \*\*\* indicate a significant difference of  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$  respectively, by non-parametric student-t-test ( $n=8$ ).



As expected due to their known function in erythroblastic islands, bone marrow and blood samples revealed 30.8% decreases in Ter119<sup>+</sup> cells in Clodronate-treated mice (Figure 2.12,  $p < 0.01$ ).



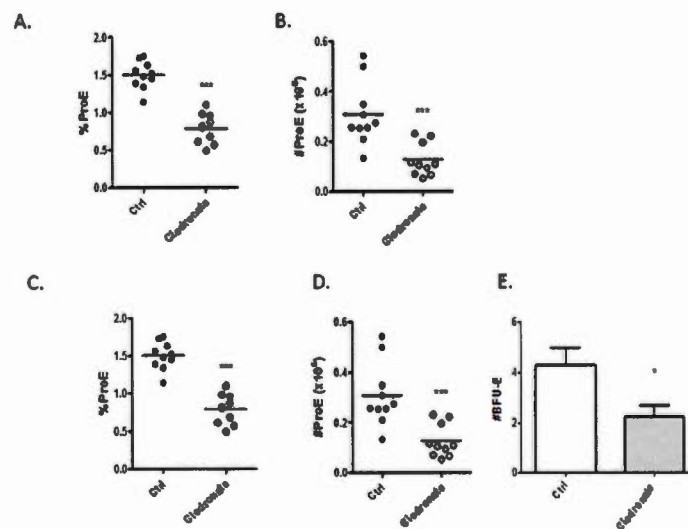
**Figure 2.12** Bone marrow erythropoiesis is impaired in clodronate-treated mice.

Mice were treated with Clodronate liposomes (Clodronate) and PBS (control) 7 days prior to sacrifice. Bone-marrow EryA, EryB, EryC cells were measured by Ter119, CD71 double staining and Forward Scatter parameter (FSC) by cytofluorometry. \*, \*\* and \*\*\* indicate a significant difference of  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$  respectively by non-parametric student-t-test ( $n=8$ ).

Furthermore, detailed analysis of the erythroid subpopulations showed that early stage erythroblasts were mostly affected by macrophage depletion: ProE cells were 35.5% lower (Figure 2.13 A, B), EryA were 46.38% lower and EryB showed 38.96% decrease. Minor differences were found in EryC when comparing Clodronate and



PBS treated mice (Figure 2.12 B, D). A colony forming unit assay was performed on blood marrow to enumerate hematopoietic progenitor cells. Significantly lower numbers of Burst-Forming units-Erythroid (BFU-E) colonies were counted after 8 days of culture in semi-solid EPO supplemented medium (Figure 2.13,  $p < 0.05$ ).

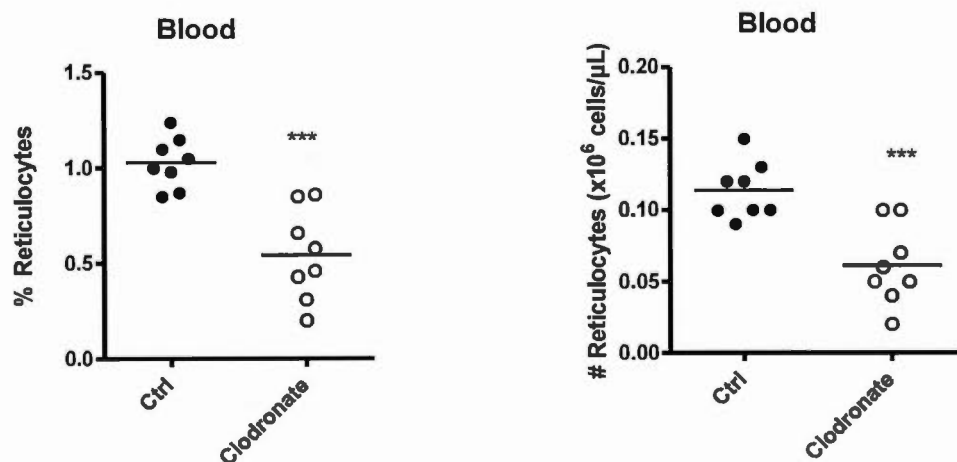


**Figure 2.13 Proerythroblasts are decreased in the bone marrow of Clodronate-treated mice.**

Mice were treated with Clodronate liposomes (Clodronate) and PBS (control) 7 days prior to sacrifice. ProE cells were measured by Ter119, CD71 double staining and Forward Scatter parameter (FSC) in cytofluorometry. BFU-E were counted by MethoCult™ Colony-Forming Unit assay on methylcellulose. \*, and \*\*\* indicate a significant difference of  $P < 0.05$  and  $P < 0.001$  respectively by non-parametric student-t-test ( $n=4$  for BFU-E;  $n=8$  for ProE).

Analysis of circulating blood cells indicated a significant drop in the percentages of reticulocytes in clodronate liposomes-treated mice (Figure 2.14,  $p < 0.05$ ).





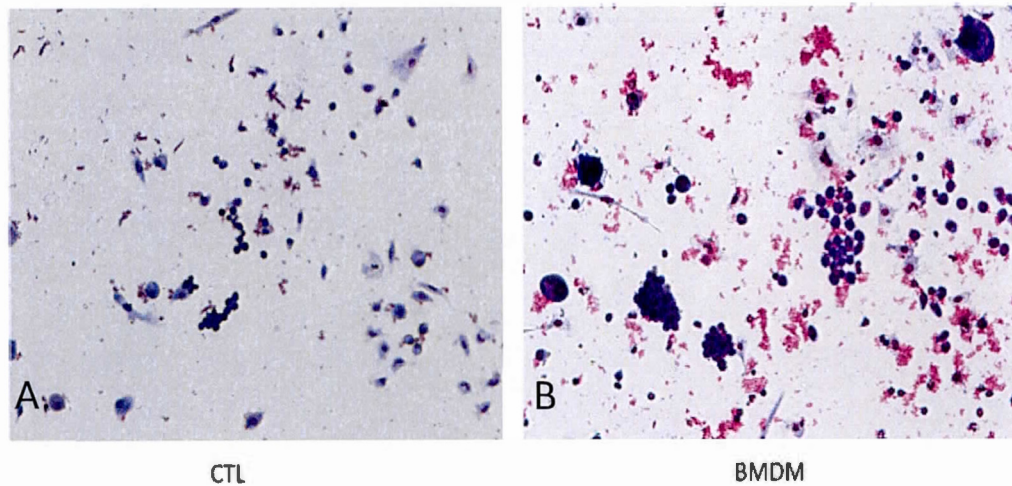
**Figure 2.14** Clodronate treatment causes a rapid decrease of circulating reticulocytes.

Mice were treated with Clodronate liposomes (clodronate) and PBS (control) 7 days prior to the sacrifice. Reticulocytes were measured by Ter119, CD71 double staining and Forward Scatter parameter (FSC) in cytofluorometry. \*\*\* indicates a significant difference of  $P < 0.001$  by non-parametric student-t-test ( $n=8$ ).

Altogether, our data indicate administration of clodronate significantly depleted macrophages, leading to rapid inhibition of erythropoiesis and drops in circulating reticulocytes. Major inhibitory effects are observed for ProE, EryA and EryC cells, corroborating the data, which suggest enhancement of these specific erythroid populations when macrophages are present in *in-vitro* co-cultures with Lin<sup>-</sup> cells.

**BMDM do not express EPO**

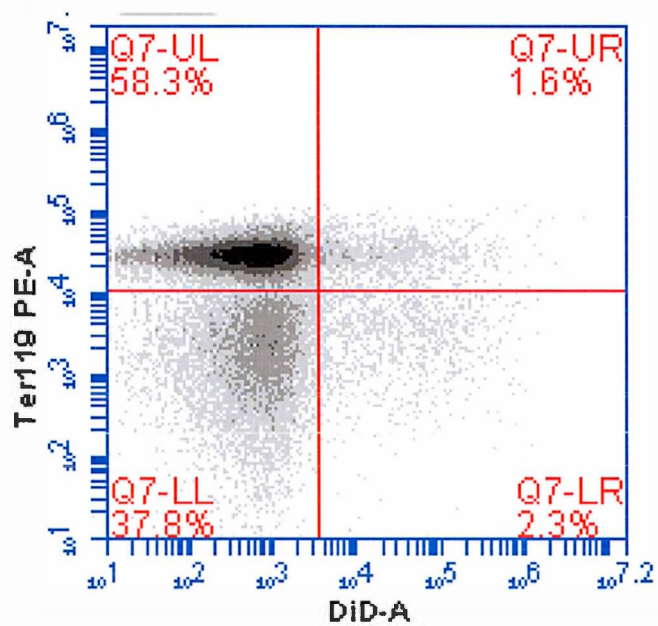
Considering the stimulatory effect induced by BMDM in the differentiation and proliferation of early stage erythroblasts, which are responsive to EPO, we analyzed if EPO was expressed or secreted by BMDM. Neither PCR (Supplementary Figure 4) nor Western Blot analysis (Supplementary Figure 5) were able to confirm EPO expression or production in BMDM lysates. EPO ELISA of BMDM supernatant was also negative for EPO production (Data not shown).



**Supplementary Figure 1. Macrophage conditioned medium stimulates erythroblastic island formation.**

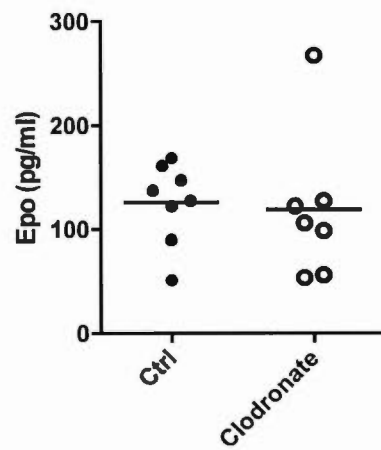
Lineage negative cells ( $2 \times 10^6$  cells/mL) were cultured with either control (A) or macrophage conditioned medium (B) without EPO (IMDM 15% FBS, 1% BSA, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  holotransferrin, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  insulin, 100  $\mu\text{M}$   $\beta$ -mercaptoethanol, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , P/S). After 72 hours of culture in fibronectin covered Labtek™ wells, cells were stained with May-Grünwald.





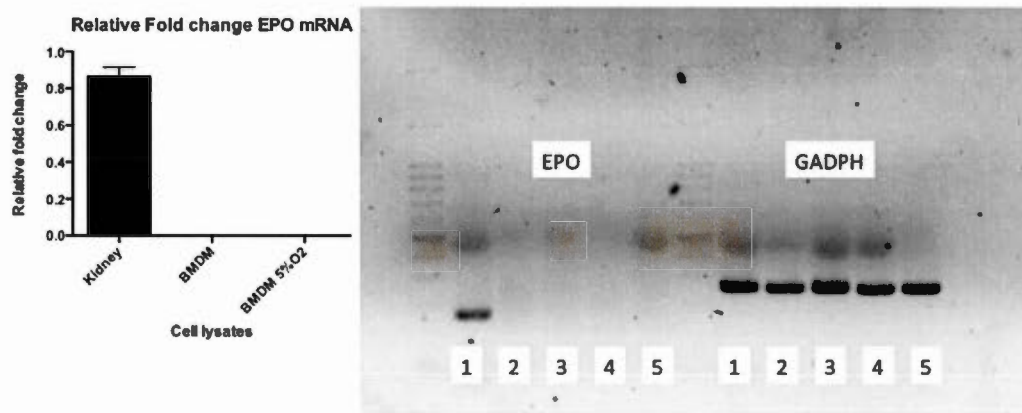
**Supplementary Figure 2 : Liposomes do not target Ter119<sup>+</sup> cells.**

DiD<sup>+</sup> liposomes were administered intravenously 1 day before sacrifice and whole bone marrow was stained with anti-Ter119-PE antibody and analyzed for DiD positive staining.



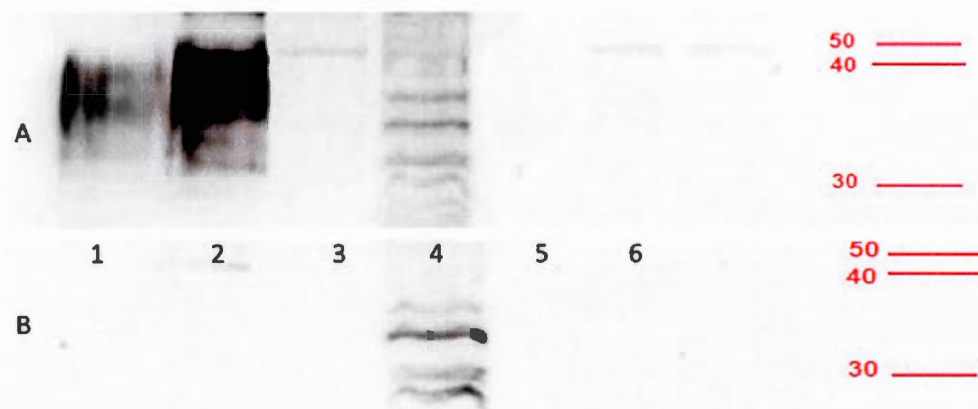
**Supplementary Figure 3: Plasmatic EPO levels are not changed by macrophage depletion after 7 days.**

Mice were treated with Clodronate liposomes (Clodronate) and PBS (control) 7 days prior to the sacrifice. Plasmatic EPO levels were measured by ELISA (n=8).



**Supplementary Figure 4: EPO could not be detected by PCR in BMDM lysates.**

1. Kidney 2. L929 fibroblasts 3. BMDM 4. BMDM 5% O2 5. BMDM 5%O2 Golgi-stop (n=3). EPO appears at 166 bp in the kidney.



**Supplementary Figure 5: EPO is not detected by Western Blot in BMDM lysates.**

1. Recombinant EPO 2. Kidney lysate 3. BMDM 5 % O<sub>2</sub> treated with Golgi-stop 3. L929 fibroblasts 4. BMDM 5. BMDM 5% O<sub>2</sub>. A: Primary antibody: Mouse anti-EPO-biotin detected with secondary antibody: Streptavidin HRP. EPO is detected around 37kDa. B: Secondary antibody Streptavidin HRP only, showing nonspecific affinity to L929 proteins, confirming EPO is not produced by BMDM cells in A



## CHAPITRE III

### DISCUSSION

Knowing that macrophages are essential to erythropoiesis and that their long term depletion causes anemia (Ramos, Casu, Gardenghi, et al. 2013a), the principal objective of this study was to further characterize their pro-erythropoietic activity and discriminate the erythroid stages affected with and without direct cell-to-cell interaction with these cells. An *in vitro* model was established in which BMDM were cultured in erythroid differentiation medium (EDM) for 72 hours to recover conditioned media, or were cultured together with Lin<sup>-</sup> negative cells as well as non-adherent bone marrow cells to follow up erythroid cell differentiation. Liposome encapsulated clodronate was also used to selectively eliminate phagocytic cells *in vivo*, in order to assess the role of macrophages on erythroid differentiation. Based on the current knowledge, we hypothesized that macrophages produce EPO or analogous soluble factors, speculating that the plasmatic levels of EPO measured in macrophage depleted mice represents a compensatory reaction from the kidney in response their absence.

In order to distinguish the role of the macrophage in erythropoiesis, we tested different *in vitro* models. We first differentiated Lin<sup>-</sup> cells in direct contact with BMDM in the presence of various concentrations of EPO and analyzed these results by cytofluorometry, confocal imagery and Giemsa staining, with direct cellular counts of the various cell subpopulations and fluorescence measurements. Positive impacts for macrophages in erythropoiesis were evidenced in conditions with and

without EPO, which are in agreement with our working hypothesis. Lin<sup>-</sup> cells cultured in presence of EPO significantly increased the differentiation of Ter119<sup>+</sup> cells when co-cultured with BMDM, specifically promoting the early basophilic erythroblasts and indicating a synergy between EPO and macrophages. Interestingly, erythropoiesis was enhanced when BMDM were cultured together with Lin<sup>-</sup> cells without exogenous EPO. Under these conditions, ProE and EryB cells were significantly stimulated, and a trend towards more EryC cells was also noticed. These results, corroborated by staining, confirm the ability of macrophages to promote erythroid development *in vitro* when no exogenous EPO is added.

Confocal imaging provided an insight of physical interactions between erythroblasts (Ter119<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup> cells) and macrophages (F4/80<sup>+</sup>), confirming that direct contact between erythroblasts and macrophages takes place under our experimental conditions without exogenous EPO. Altogether, the data confirms that macrophages promote erythropoiesis under these conditions, and that cell-to-cell contact takes place during erythroblastic development.

We then focussed on the potential of macrophage-conditioned medium to promote erythroid differentiation and thus discern whether soluble factors are involved. BMDM were cultured for 72 hours in the EDM medium without EPO, and Lin<sup>-</sup> cells were then cultured with this supernatant. Cytometry and confocal imagery provided quantitative and qualitative analysis. We confirmed spontaneous formation of erythroblastic islands from Lin<sup>-</sup> cells cultures by May Grunwald staining and microscopy analysis (Supplementary Figure 1). Confocal imaging (Figure 4.8) highlighted the appearance of large Ter119<sup>+</sup> pro-erythroblasts, confirmed by FACS analysis to be significantly increased by BMDM supernatant. Interestingly, the overall yield in Ter119<sup>+</sup> cells decreased when macrophage conditioned medium was used, probably concurrent with lower numbers of EryB cells; in addition very few

EryC cells were detected. Thus in absence of direct cell-to-cell contact, BMDM conditioned medium promotes ProE and EryA cells while decreasing EryB cells.

In addition to studying the effect of BMDM conditioned medium in erythroid development with Lin<sup>-</sup> cells, we also investigated its impact on total non-adherent bone marrow cells, as a strategy to reproduce the bone marrow environment. Bone marrow cells were allowed to adhere overnight, and non-adherent cells were cultured with BMDM conditioned media for 72 hours. Cells were then analyzed as previously through cytometry and higher numbers of ProE were detected in wells cultured with conditioned medium. Confocal imaging confirmed the appearance of distinct erythroblastic islands with a central macrophage surrounded by erythroblasts at different stages of differentiation. Altogether, our data indicates that macrophage-derived soluble factors stimulate early erythroid development, but do not enhance the late (EryC) stages.

Having shown that macrophages are able to promote erythropoiesis in culture conditions without EPO, that rely partly on cell-to-cell contact throughout erythroblastic development, and also promoting the differentiation of early stage erythroblasts through soluble pro-erythropoietic factors, we investigated if these stages were reciprocally affected in mice depleted of macrophages. To do so, female Balb/c mice (4-6 weeks old) were injected with liposome-encapsulated clodronate, to selectively eliminate macrophages. After 7 days, mice were sacrificed and the bone marrow was analyzed by flow cytometry and semi-solid methylcellulose cultures. The latter enables the identification of stages preceding ProE (BFU-E). The depletion of macrophages through clodronate liposomes was shown to be effective, having a strong negative impact on bone marrow erythroid populations *in vivo*. Ter119<sup>+</sup> cells were significantly diminished in Clodronate injected mice one week after treatment, and EryA and EryB were also significantly reduced both in number and percentages. Interestingly, there was not a significant effect on the most differentiated EryC stages.



ProE percentages and numbers were also significantly decreased, as well as the less differentiated BFU-E colonies. Importantly, blood reticulocytes (Ter119+/CD71+ cells) also decreased significantly. To exclude the possibility of direct interaction of Clodronate liposomes with erythroid cells, we assessed the fluorescence of bone marrow cells in mice, after administration of DiD loaded liposomes. Less than 1.6% Ter119+/DiD+ cells were detected in the bone marrow (Supplementary Figure 2). These results indicate that the absence of macrophages in the bone marrow induces a potent and rapid inhibitory effect in erythropoiesis, most importantly on early erythroblasts stages (ProE and EryA). It is important to underline that contrary to Ramos et al. (2013), plasmatic EPO levels did not increase in mice depleted of macrophages (Supplementary Figure 3). However, their data came from mice treated for 7 consecutive weeks with Clodronate while our mice were depleted of macrophages only for 1 week. Our interpretation of these results is that short-term depletion of macrophages is insufficient in inducing a systemic EPO response by the kidney. However, these results also indicate that short-term absence of macrophages severely affects erythropoiesis in the bone marrow. Hence, taken together, these results suggest that basal levels of EPO are not sufficient to support steady-state erythropoiesis if macrophages are depleted. We speculate that macrophages may sustain erythropoiesis through mechanisms partially independent of EPO, but that EPO may stimulate macrophages and amplify their pro-erythropoietic responses including sustainment of steady-state erythropoiesis.

The *in vivo* and *in vitro* data leads to assume that soluble factors mediate macrophage-dependent proliferation of ProE. Since these early stages are those with higher expression of the EPO receptor, we investigated whether the BMDM used expressed or secreted EPO. PCR was performed on BMDM in hypoxic and normoxic condition and no expression was detected (Supplementary Figure 4). Western Blot was also performed on BMDM under hypoxic and normoxic conditions with and without Golgi transport blockers without any conclusive EPO expression

(Supplementary Figure 5). Finally, an EPO ELISA was performed on BMDM conditioned supernatant (both normal and concentrated) without any EPO reactivity detected above basal background noise. These results suggest that macrophages exert their pro-erythroblastic actions through an EPO-independent signalling pathway. This is rather intriguing, considering that erythropoiesis is a process entirely dependent on EPO. It is undeniable that EPO is an important player in erythroid cell development but the interactions between all players in the erythroblastic island and in the larger bone marrow medullary are much more complex (see review of de Back et al. 2014).

CFU-E do not need direct interaction with accessory cells but require IGF-1 to complete erythroid development (Sawada et al. 1989), and macrophages have been shown to produce IGF-1 in response to CD44 engagement by hyaluronate (Noble et al. 1993). We used fibronectin in our erythroblastic cell culture to promote adherence and mimic intraosseous cell interaction conditions (Shuga et al. 2007), and it can engage CD44 and stimulate local production of IGF-1. It is also interesting to note that BFU-E produce EPO *in vitro* when cultured with EPO containing medium (Stopka et al. 1998), which may directly increase ProE but not CFU-E differentiation. As such it is possible that the early stage pro-erythropoietic activity measured with BMDM conditioned media is mediated through fibronectin-CD44 coupling, thus inducing IGF-1 production by macrophages and consequently directly stimulating BFU-E proliferation and differentiation into ProE. This may also explain the significant decrease in BFU-E associated with short-term macrophage depletion.

We propose that the long held view of erythropoiesis regulated exclusively by kidney EPO, whereby macrophages are only useful for iron exchange and nucleus phagocytosis is outdated. It is clear that many regulatory pathways exist within the erythroblastic island, which exists in the context of a specialized environment provided by the bone marrow, composed of differentiating cells, cytokines and cell-adhesion molecules. Steady state plasmatic EPO levels are low but are enough to

promote *in situ* production of EPO while high levels of EPO are indicative of stress erythropoiesis. Erythroblasts seem to have both pro and anti-erythropoietic self-regulating mechanisms, and macrophages may act as supervisor cells, regulating erythropoiesis through soluble and direct cell-to cell mechanisms in turn influenced by various regulatory feedback loops. As a conclusion, the *in vitro* and *in vivo* data obtained in this study further underscore the requirement of macrophages for sustainment of steady state erythropoiesis, and that their intervention in homeostatic erythropoiesis is functional under low EPO levels. The latter is sufficient to generate positive interaction loops that promote and maintain adequate EPO levels within the islands, sustained by interactions between macrophages and erythroblasts

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

Sachant que les macrophages sont essentiels à l'érythropoïèse et que leur déplétion à long terme cause une anémie qui déclenche la production rénale d'EPO (Ramos, Casu, Gardenghi, et al. 2013a), l'objectif principal de cette étude était de caractériser l'activité pro-érythropoïétique des macrophages sur les différents stades de développement érythrocytaire avec ou sans contact cellulaire direct avec les précurseurs en différenciation. Ainsi, un modèle *in vitro* a été établi avec des BMDM en culture dans du milieu de différenciation érythrocytaire (EDM) pendant 72 heures afin de récupérer le surnageant, ou en culture directe BMDM-cellules Lin<sup>-</sup> ou de cellules non adhérentes de la moelle osseuse, afin de suivre la différenciation érythrocytaire. L'imagerie confocale, l'analyse par cytométrie et la coloration May-Grünwald-Giemsa ont été utilisées pour identifier et mesurer l'effet des BMDM ou de leur milieu conditionné sur la différenciation des sous-populations érythrocytaires. Des liposomes de Clodronate ont aussi été utilisés pour sélectivement éliminer les cellules phagocytaires *in vivo*, afin d'évaluer le rôle des macrophages sur la différenciation érythrocytaire. En se basant sur les connaissances actuelles, nous émettons l'hypothèse que les macrophages sont capable de produire de l'EPO ou un facteur analogue soluble et que la hausse du niveau plasmatique d'EPO est une réaction compensatoire du rein en réponse à une perte de l'érythropoïèse macrophage-dépendant.

Afin de bien différencier le rôle des macrophages pendant l'érythropoïèse, nous avons testés plusieurs modèles *in vitro*. Nous avons premièrement différencié des cellules Lin<sup>-</sup> en contact directe avec des BMDM à différentes concentrations d'EPO, et avons analysé ces résultats par cytofluorométrie, par imagerie confocale et par coloration Giemsa, avec des comptes cellulaires des différentes sous-populations cellulaires et de niveaux de fluorescence. La stimulation de l'érythropoïèse par les macrophages a été mis en évidence dans des conditions avec et sans EPO, ce qui est en accord avec notre hypothèse. Les cellules Lin<sup>-</sup> mises en culture en présence d'EPO se différencient davantage en cellules Ter119<sup>+</sup> lorsqu'elles sont mises en culture avec des BMDM. Cette condition stimule spécifiquement les érythroblastes basophiles précoces, ce qui indique une synergie entre l'EPO et les macrophages. Fait intéressant, l'érythropoïèse est augmentée lorsque les BMDM sont mis en culture avec les cellules Lin<sup>-</sup> en absence d'EPO. Ces résultats confirment la capacité des macrophages à stimuler le développement érythrocytaire *in vitro* sans ajout d'EPO exogène.

L'imagerie confocale a donné un aperçu des interactions physiques entre érythroblastes (cellules Ter119<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup>) et les macrophages (F4/80<sup>+</sup>), confirmant ainsi que le contact direct entre érythroblastes et macrophages a lieu dans nos conditions expérimentales en absence d'EPO. Tout compte fait, les résultats confirment que les macrophages peuvent stimuler l'érythropoïèse à travers des mécanismes indépendants à l'EPO, et que les interactions cellulaires sont présentes pendant le développement érythrocytaire.

Nous nous sommes ensuite attardé sur le potentiel pro-érythropoïétique du surnageant conditionné par les macrophages, afin d'élucider si des facteurs solubles sont impliqués. Les BMDM ont été mis en culture pendant 72 heures dans du milieu EDM sans EPO et des cellules Lin<sup>-</sup> ont ensuite été mis en culture avec ce surnageant (sans contact avec BMDM). L'imagerie confocale et la cytométrie ont permis une

analyse quantitative et qualitative. Nous avons confirmé la formation spontanée d'îlots érythroblastiques par coloration May-Grünwald et par analyse microscopique (figure supplémentaire 1). L'imagerie confocale (Figure 4.8) a mis en évidence l'apparition de grandes cellules proérythroblastes Ter119<sup>+</sup> retrouvées en nombre significativement plus élevé en présence de surnageant BMDM, confirmé par analyse FACS. Fait intéressant, la quantité totale de cellules Ter119<sup>+</sup> a diminuée lorsque le surnageant de BMDM était utilisé, probablement causé par la baisse de cellules EryB. De plus, très peu de cellules EryC ont été détectées. Ainsi, en absence d'interaction cellulaire directe, le surnageant de BMDM promeut les ProE et les cellules EryA tout en diminuant la quantité de cellules EryB.

En plus d'étudier l'effet du milieu conditionné BMDM dans la différenciation érythrocytaire des cellules Lin<sup>-</sup> nous avons aussi investigué son impact sur les cellules totales et non adhérentes de la moelle osseuse, afin d'essayer de reproduire le milieu complexe intra-osseux. Les cellules de la moelle osseuse ont été mises à adhérer pour la nuit et les cellules non adhérentes récupérées et mises en culture avec le milieu conditionné BMDM pendant 72 heures. Les cellules ont ensuite été analysées comme auparavant par cytométrie et des nombres plus élevés de ProE ont été détectés dans les conditions de milieu BMDM. L'analyse confocale a confirmé aussi l'apparence d'îlots érythroblastiques distinct avec un macrophage centrale entouré d'érythroblastes à différent stade de différenciation. Tous ensemble, nos résultats démontrent que des facteurs solubles dérivés des macrophages stimulent le développement des stades précoces érythrocytaires, mais ne promeut pas les stades tardifs (EryC).

Ayant démontré que les macrophages sont capables de promouvoir l'érythropoïèse à travers des mécanismes apparemment indépendants à l'EPO et partiellement dépendant sur le contact direct cellulaire, et qu'ils promeuvent la différenciation des stades érythroblastiques précoces à travers des facteurs solubles,

nous avons investigué si ces stades étaient également affectés par la déplétion *in vivo* des macrophages. Pour ce faire, nous avons injecté des liposomes de Clodronate dans des souris femelles Balb/c (4-6 semaines d'âge) afin de sélectivement éliminer les macrophages. Après 7 jours, les souris ont été sacrifiées et la moelle osseuse a été analysé par cytofluorométrie et par culture sur de la méthylcellulose semi-solide. Ce dernier permet l'identification des stades précédant les ProE (BFU-E). La déplétion des macrophages via les liposomes de Clodronate a été très efficace et a eu un fort impact négatif sur les populations érythrocytaires dans la moelle osseuse. Les cellules Ter119<sup>+</sup> ont été significativement diminuées dans les souris injectées au Clodronate. Les EryA et EryB étaient également réduites en nombre et en pourcentage. Il est intéressant de noter qu'il n'y a pas eu de baisse significative sur le stade EryC le plus différencié. Les pourcentages et nombres de ProE ont drastiquement diminués, ainsi que les colonies moins différenciées de BFU-E. Il est important de noter que les réticulocytes (Ter119<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup>) ont aussi été significativement diminués. Afin d'exclure la possibilité d'une interaction directe des liposomes de Clodronate avec les cellules érythrocytaires, des liposomes de DiD fluorescent ont été injectés chez les souris, et moins de 1.6% de cellules Ter119<sup>+</sup>/DiD<sup>+</sup> ont été détectées (Figure supplémentaire 2).

Ces résultats indiquent que l'absence des macrophages dans la moelle osseuse induit un effet inhibitoire puissant et rapide sur l'érythropoïèse, surtout sur les stades érythroblastes précoces (ProE et EryA). Il est important de souligner que contrairement à Ramos et al., les niveaux plasmatiques d'EPO n'étaient pas augmentés chez les souris traitées au Clodronate (Figure supplémentaire 3). Cependant, leurs résultats proviennent de souris traitées pendant 7 semaines consécutives avec du Clodronate. Nous interprétons que ces résultats indiquent que la déplétion à court terme des macrophages n'est pas suffisante pour induire une réponse systémique d'induction d'EPO par le rein. Cependant, ces résultats démontrent également que l'absence à court terme des macrophages affecte

négativement l'érythropoïèse dans la moelle osseuse. Cela suggère aussi que les taux d'EPO basaux ne sont pas suffisants pour soutenir l'érythropoïèse homéostatique en absence de macrophage. Nous spéculons que les macrophages peuvent soutenir l'érythropoïèse grâce à des mécanismes partiellement dépendant sur l'EPO mais que l'EPO peut stimuler les macrophages et amplifier leur réponse pro-érythropoïétique incluant le soutien de l'érythropoïèse homéostatique. Ainsi, les hauts niveaux d'EPO plasmatique sont indicatifs d'érythropoïèse de stress majeure.

Les résultats *in vivo* et *in vitro* nous laissent croire qu'un facteur soluble est responsable de la prolifération dépendante des macrophages des ProE. Puisque ces stades précoces sont ceux ayant le plus d'expression du récepteur à l'EPO, nous avons investigué si les BMDM expriment ou secrètent de l'EPO. La technique PCR a été effectuée sur des lysats de BMDM mis en culture sous des conditions normoxiques et hypoxiques sans que l'expression d'EPO soit détectée (figure supplémentaire 4). Un Western Blot a aussi été effectué sur les lysats de BMDM hypoxique et normoxique avec et sans bloqueur de transporteur de golgi sans qu'il y ait une expression concluante d'EPO (figure supplémentaire 5). Finalement une ELISA EPO a été effectuée sur le surnageant de BMDM (normal et concentré) sans qu'il y ait une réactivité au-dessus du niveau basal de bruit de fond. Ces résultats suggèrent que les macrophages exercent leur activité pro-érythropoïétiques à travers une voie de signalisation EPO-indépendante. Ceci est particulièrement intrigant considérant que l'érythropoïèse est un procédé entièrement dépendant de l'EPO. Il est indéniable que l'EPO est un facteur important dans le développement des cellules érythrocytaires, mais les interactions intercellulaires dans l'îlot érythroblastique et dans la zone élargie de la matrice médullaire intra-osseux sont beaucoup plus complexes (voir la revue de Back et al. 2014).

Il est connu que les CFU-E n'ont pas besoin d'interaction cellulaire mais d'IGF-1 afin de compléter le développement érythrocytaire (Sawada et al. 1989). Il a



été démontré que les macrophages produisent du IGF-1 et du TNF—  $\alpha$  en réponse à la liaison du CD44 par le hyaluronate (Noble et al. 1993). Le CD44 est une molécule adhésion de surface impliquée dans l'interaction cellule-cellule et cellule-matrice, exprimés de manière omniprésente dans la moelle osseuse. Le CD44 a comme ligand l'ostéopontin, la sérglycerine, les collagènes, la laminine et la fibronectine (Goodison et al. 1999). Nous avons utilisé la fibronectine dans la culture des cellules érythroblastiques afin de promouvoir l'adhérence et reproduire les interactions cellulaires dans la moelle osseuse (Shuga et al. 2007). Il a été rapporté que la génération de BFU-E et CFU-E ne requiert pas d'EPO ou de récepteur à l'EPO, cependant ceci requiert plus d'études puisque cette information est contradictoire (Wu et al. 1995). Il est intéressant de noter cependant, que les BFU-E produisent de l'EPO *in vitro* quand il sont mis en culture avec du milieu en présence d'EPO (Stopka et al. 1998), ce qui pourrait directement augmenter les ProE, mais pas la différenciation des CFU-E. Ainsi il est possible que l'activité pro-érythropoïétique du surnageant de BMDM observé chez les stades érythrocytaires précoces soit du à une liaison de la fibronectine au CD44, induisant ainsi une production de IGF-1 par les macrophages et permettant la prolifération des BFU-E en ProE. Ceci pourrait aussi expliquer la diminution importante de BFU-E associé à la déplétion des macrophages.

Les ProE représentent un lien entre les CFU-E ayant une définition fonctionnelle et les érythroblastes ayant une définition morphologique (EryA à EryC). Il est également intéressant de noter que les ProE sont auto-renouvelants (Koury 2011). Cet autorenouveaulement peut se produire grâce à une activité autocrine dépendante de Gas6 et de l'EPO. Les ProE sont les premières cellules à répondre à l'EPO. Ceci induit la production du *Growth Arrest-specific gene 6* (Gas6) par les érythroblastes, ce qui accroît la signalisation du récepteur à l'EPO en activant la voie serine-thréonine kinase Akt (Angelillo-Scherrer et al. 2008).

De plus, Gas6 joue un rôle dans la survie cellulaire (Goruppi et al. 1996), la clairance des cellules apoptotiques (Linger et al. 2008) et il a été démontré qu'elle est produite par les macrophages dans les tumeurs, causant la croissance et des métastases (Sica 2010). De manière plus intéressante, Gas6 inhibe le relâchement de cytokines anti-érythropoïétiques par les macrophages (IL-10, IL-13, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ ) régulant ainsi l'érythropoïèse à travers une boucle de rétroaction (Angelillo-Scherrer et al. 2008). Ceci suggère que les cellules ProE jouent un rôle majeur dans l'amplification et la régulation de la signalisation EPO à l'intérieur de l'îlot érythroblastiques. Les ProE ont aussi un rôle de croissance en produisant du *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) et du *Placental Growth Factor* (PlGF), qui se lie au récepteur VEGFR1 présente sur les macrophages et les cellules endothéliales (Tordjman et al. 2001).

Nos résultats démontrent que le surnageant conditionné par les BMDM diminue de façon significative les EryB et EryC et que la déplétion *in vivo* de macrophages n'affecte pas significativement les populations de EryC dans la moelle osseuse. Dans ce contexte, il est possible d'expliquer cette réponse par une expression de TNF- $\alpha$ , causé par une interaction entre la fibronectine et le CD44 à la surface du macrophage (Noble et al. 1993). Ceci concorde bien avec les connaissances actuelles que les populations d'érythroblastes sont directement inhibées par le TNF- $\alpha$  (Dai et al. 2003; De Maria, Zeuner, et al. 1999). Considérant que l'EPO inhibe directement le TNF- $\alpha$  et induit un phénotype tolérant chez les macrophages (Luo et al. 2016), l'absence d'EPO dans notre milieu semble incapable de renverser cette action inhibitrice. De plus, en cas de niveaux d'EPO abaissé, le rôle de régulation négatif des macrophages semble promouvoir l'idée d'un environnement érythroblastique complexe régulé par des boucles de régulation autocrine et rétroactive.

Une autre cytokine régulatrice produite par les macrophages et les cellules de la moelle osseuse retrouvée dans l'îlot érythroblastique est le TGF- $\beta$ , qui agit comme inhibiteur paradoxal de la prolifération érythroblastique en arrêtant la prolifération et en accélérant la différenciation (Zermati et al. 2000). La superfamille des cytokines TNF régule à la hausse l'IFN- $\gamma$ , qui agit de plusieurs manières à inhiber l'érythropoïèse (Felli et al. 2005). Premièrement, il peut directement inhiber la croissance des CFU-E, et cette action est bloquée par des hautes concentrations d'EPO (Dallalio et al. 1999). Deuxièmement, il peut inhiber la production d'IGF-1 par les macrophages (Arkins et al. 1995). Finalement, l'IFN- $\gamma$  induit le *TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand* (TRAIL) par les macrophages (Zamai et al. 2000). Le TRAIL a l'habilité unique d'induire l'apoptose dans les cellules hématopoïétiques et est exprimé chez les érythroblastes tardifs (Secchiero et al. 2004). Plusieurs des cytokines mentionnées précédemment sont produites par les macrophages lorsqu'ils sont classiquement activés (Davis et al. 2013). Ainsi, il est possible qu'en absence d'EPO, les macrophages ne puissent pas supporter l'érythropoïèse tardive puisque leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoire est exacerbée. Cette hypothèse est soutenue par le fait que la signalisation de l'EPO chez les macrophages induit un phénotype tolérant (Luo et al. 2016). Ceci démontre encore le rôle des macrophages comme étant des amplificateurs ou des régulateurs de l'érythropoïèse homéostatique en réponse au niveau d'EPO basal.

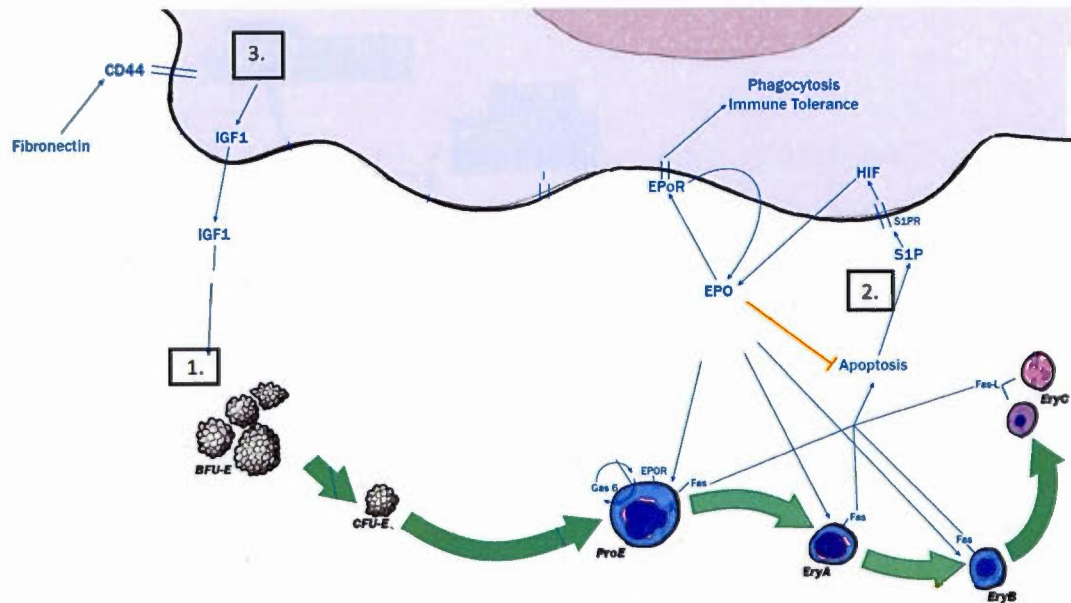
Contrairement à la littérature, nous n'avons pas été en mesure de compléter la différenciation des ProE en EryC *in vitro* en absence d'EPO. Cependant, nous ne pouvons pas ignorer la possibilité que l'EPO est produite par les macrophages dans notre système de culture *in vitro*, considérant que nous avons démontré une absence de production dans des cultures de BMDM isolé et non pas chez les BMDM présent dans la culture des HSC. Cette spéculation est poussée par le fait qu'un article récent démontre que les cellules apoptotiques relâche un signal « trouve-moi » appelé sphingosine 1 phosphate (S1P), qui se lie au S1PR1 sur les macrophages et induit la

signalisation HIF et l'expression d'EPO chez les macrophages (Luo et al. 2016). L'EPO agit de manière autocrine sur les macrophages, augmentant l'expression du récepteur à l'EPO à leur surface et stimulant l'enlèvement des cellules apoptotiques par la régulation à la hausse de PPAR $\gamma$  via la cascade JAK2-ERK-C/EBP $\beta$  (Luo et al. 2016). Il a aussi été démontré que le S1P renverse l'inhibition de la prolifération des BFU-E par la céramide, un messager secondaire produit par l'hydrolyse de la sphingomyéline (Dallalio et al. 1999), créant ainsi une autre boucle de rétroaction. L'interaction entre la céramide et le S1P stimule l'acclimatation à l'hypoxie (Chawla et al. 2014) et est impliquée dans la migration et la maintenance des cellules hématopoïétiques via la fonction CXCR4 (Kimura et al. 2004). En conclusion, une voie régulatrice pourrait s'établir à travers laquelle la production de S1P par les cellules apoptotiques (incapable de compléter la différenciation érythroblastique) induit l'expression d'EPO et d'EPO-R dans les macrophages. L'expression de CXCR4 due au S1P et la sortie des HPC vers les sites extramédullaires d'érythropoïèse pourraient agir comme une réponse d'érythropoïèse *bona fide* avant d'induire une réponse systémique du rein. Cette supposition se range bien avec la pathologie de la  $\beta$ -thalassémie, dans laquelle l'érythropoïèse est inefficace due à une synthèse incomplète de l'hémoglobine (Marengo-Rowe 2007). La maladie est caractérisée par un grand nombre de proérythroblastes et de faibles nombres d'érythroblastes tardifs, et une apoptose accrue (Marengo-Rowe 2007). L'apoptose pourrait causer le relâchement de grandes quantités de S1P, promouvant ainsi la production d'EPO par les macrophages, qui en suite cause la prolifération des ProE et la différenciation en érythroblastes tardifs incompetents tombant en apoptose, créant ainsi une boucle vicieuse caractéristique de la  $\beta$ -thalassémie. Cette hypothèse est supportée par le fait que la déplétion des macrophages *in vivo* inverse la  $\beta$ -thalassémie (Ramos, Casu, Gardenghi, et al. 2013a).

Une autre boucle de rétroaction implique l'interaction Fas-FasL. Fas est exprimé par les stades érythroblastiques précoces, mais pas sur les cellules EryC. Ces derniers expriment le ligand Fas. La liaison croisée de Fas ainsi que l'interaction Fas-FasL induite l'apoptose des érythroblastes précoces (De Maria, Testa, et al. 1999) et ce mécanisme agit comme voie intrinsèque de régulation négative afin de prévenir la prolifération excessive. Cette voie est inhibée par des hauts niveaux d'EPO (De Maria, Testa, et al. 1999), et les niveaux d'EPO sont régulés par l'apoptose des érythroblastes, ajoutant ainsi un autre niveau d'autorégulation à l'intérieur de l'îlot érythroblastique.

En conclusion, nous proposons que la vision classique de l'érythropoïèse étant un processus régulé par l'EPO rénale où les macrophages n'ont qu'un rôle d'échange de fer et de phagocytose des noyaux extrudés soit longuement périmée. Il est clair que plusieurs voies de régulation existent (voir Figure 4.1) à l'intérieur de l'îlot érythroblastique, qui existe dans le contexte d'un environnement spécialisé fourni par la moelle osseuse, composé de cellules en différenciation, des cytokines sécrétées et des molécules d'adhésion cellulaires. Les niveaux d'EPO plasmatique homéostatique sont bas, mais sont assez élevés afin de promouvoir la production d'EPO *in situ* tandis que des niveaux élevés d'EPO sont indicatifs d'une érythropoïèse de stress. Les érythroblastes semblent avoir des mécanismes autorégulateurs pro et anti-érythropoïétiques et les macrophages peuvent agir en tant que cellules superviseur, régulant l'érythropoïèse à travers des mécanismes solubles et de contacts cellulaires directs, qui sont à leur tour régulés par différentes boucles de rétroaction.

La Figure 4.1 résume les interactions possibles entre le macrophage central et des composants du microenvironnement des îlots érythroblastiques.



**Figure 4.1 Interactions pouvant soutenir la production locale d'EPO dans le microenvironnement des îlots érythroblastiques en condition homéostatique.**

Schéma proposé par by Christopher Warburton and redésigné par Lisa Vander Plaetse. 1. Le développement érythrocytaire débute par les BFU-E génératrices des colonies plus petites (CFU-E) qui produisent des proérythroblastes (ProE). Ces derniers, avec les érythroblastes basophiles précoces (EryA) et tardifs (EryB) répondent à l'EPO, qui confère des effets anti-apoptotiques. 2. La production locale d'EPO par le macrophage central peut être stimulée par le S1P issu des cellules apoptotiques. Les érythroblastes en développement plus avancé (EryC) expriment le ligand FasL, qui peut interagir et induire l'apoptose des ProE, EryA et EryB exprimant Fas. 3. Les interactions entre la fibronectine et CD44 stimulent les BFU-E et les CFU-E via l'IGF1 sécrété par le macrophage central. La production de Gas6 par les ProE peut augmenter davantage la signalisation par l'EPO et stimuler leur autorenouveaulement. Ce modèle représente une version simplifiée des interactions qui sont mieux détaillées dans la discussion.

Comme conclusion finale, nos résultats *in vitro* et *in vivo* indiquent que les macrophages sont essentiels pour le support de l'érythropoïèse homéostatique et que leur fonction ne requiert que des faibles concentrations d'EPO. Ce dernier est suffisant pour générer des boucles d'interaction positive qui promeut et maintien des niveaux d'EPO adéquats à l'intérieur de l'îlot, soutenu par des interactions entre macrophages et érythroblastes.

## CHAPITRE V

### CONCLUSION

Nous avons démontré ici que les macrophages sont capable d'agir en synergie avec l'EPO afin d'augmenter l'érythropoïèse à partir de cellules souches érythroblastiques. Ils sont également capables d'induire une érythropoïèse complète en absence d'EPO exogène. De plus en absence d'EPO et de contact direct avec les érythroblastes, les macrophages induisent une prolifération des stades précurseurs érythrocytaires tout en inhibant les stades tardifs. La déplétion des macrophages *in vivo* cause un écroulement complet de l'érythropoïèse dans la moelle osseuse, et ce sans affecter la production d'EPO plasmaticque par les reins. Nous n'avons pas été en mesure de montrer l'expression ou la production d'EPO par les macrophages. Les macrophages agissent donc comme régulateurs et amplificateurs du signal pro-érythropoïétiques de l'EPO. Ils le font de manière partiellement EPO-indépendante et sont également capable réguler l'érythropoïèse.

En conclusion, nous proposons que la vision classique de l'érythropoïèse agissant via la voie spécifique d'EPO et où les macrophages agissent comme cellules phagocytaires des noyaux et comme source de fer n'est plus à date. Il est clair que plusieurs voies régulatrices existent à l'intérieur de l'îlot érythroblastique, qui est lui-même à l'intérieur des tissus spécialisé de la moelle osseuse où se côtoient différentes cellules en différenciation, des cytokines solubles et des molécules d'adhésions cellulaires. Les niveaux circulant d'EPO plasmaticque en conditions homéostatiques sont bas mais cela est assez pour promouvoir la production *in situ* d'EPO tandis que



des niveaux élevés d'EPO circulant est indicatifs d'érythropoïèse de stress. Les érythroblastes semblent être capables d'avoir des fonctions pro — et anti-érythropoïétiques et les macrophages peuvent agir en tant que cellules superviseurs qui régulent l'érythropoïèse à travers des contacts directs avec les cellules ou des facteurs solubles. Toutes ses interactions sont à leur tour régulé par des boucles de rétroaction afin d'assurer une régulation étroite de la production de 200 milliards de globules rouges par jour.

## CHAPITRE VI

### PERSPECTIVES

Afin de confirmer les conclusions de la présente étude, plusieurs perspectives de recherches sont possibles.

Premièrement, l'hypothèse de la boucle d'activation via l'apoptose-S1P est à vérifier. Il serait possible de pré-conditionner les macrophages avec de la S1P avant de les introduire dans le modèle *in vitro* établi. Ainsi les macrophages conditionnés devraient produire d'avantage d'EPO et stimuler la production de globules rouges. Afin de confirmer ceci, une PCR et un Western Blot pourraient être effectués sur les macrophages conditionnés afin de déceler la production d'EPO. Il serait également possible de confirmer cette voie de signalisation en introduisant des anticorps neutralisant de la S1P dans le modèle *in vitro*.

Une autre voie de signalisation de l'érythropoïèse est l'interaction FAS-FASL. Dans ce cas-ci, un anticorps neutralisant anti-FASL introduit dans le modèle *in vitro* permettrait de mesurer l'importance de cette signalisation dans l'érythropoïèse.

Enfin, l'effet d'inhibition de l'érythropoïèse tardif observé en présence des macrophages pourrait être dû à la sécrétion de TNF- $\alpha$ . L'effet pro-érythropoïétique précoce pourrait être attribué à la production d'IGF1. Dans les deux cas, il serait important de tester le milieu conditionné par les macrophages et les lysats de macrophages pour déceler les TNF- $\alpha$  et l'IGF1 afin de valider le modèle produit ci-dessus.



## ANNEXE A

### DESCRIPTION DE L'IMPLICATION DE L'ÉTUDIANT DANS LES TRAVAUX ET LA RÉDACTION D'UN ARTICLE

Cette étude a eu besoin d'un travail d'équipe entre Hugo Roméro, Tatiana Scorza, Jaime Sanchez Dardon et moi-même. Les manipulations *in vivo* (infections, injections, prélèvement sanguins) ont été effectués par Hugo Roméro. Les manipulations effectuées le jour des sacrifices des souris ont été effectués par tous les auteurs de l'article, j'ai été plus particulièrement responsable de l'isolation de la moelle osseuse et de l'acquisition des données au cytomètre. La rédaction de l'article a été effectuée par Hugo Roméro. J'ai participé à l'élaboration et la révision de l'article. Ce travail a été fait en dehors de mes tâches personnelles d'étude, mais contribuent néanmoins à mon apprentissage pendant ma maîtrise en biologie.



ANNEXE B

RESEARCH ARTICLE : OSTEOCLASTS ARE REQUIRED FOR  
HEMATOPOIETIC STEM AND PROGENITOR CELL MOBILIZATION BUT  
NOT FOR STRESS ERTYRHOPOIESIS IN *PLASMODIUM CHABAUDI ADAMI*  
MURINE MALARIA



## Research Article

# Osteoclasts Are Required for Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Mobilization but Not for Stress Erythropoiesis in *Plasmodium chabaudi adami* Murine Malaria

Hugo Roméro, Christopher Warburton, Jaime Sanchez-Dardon, and Tatiana Scorza

Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada H3B 3H5

Correspondence should be addressed to Tatiana Scorza; scorza.tatiana@uqam.ca

Received 28 October 2015; Accepted 27 December 2015

Academic Editor: Cesar Terrazas

Copyright © 2016 Hugo Roméro et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The anemia and inflammation concurrent with blood stage malaria trigger stress haematopoiesis and erythropoiesis. The activity of osteoclasts seems required for the mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) from the bone marrow to the periphery. Knowing that BALB/c mice with acute *Plasmodium chabaudi adami* malaria have profound alterations in bone remodelling cells, we evaluated the extent to which osteoclasts influence their hematopoietic response to infection. For this, mice were treated with osteoclast inhibiting hormone calcitonin prior to parasite inoculation, and infection as well as hematological parameters was studied. In agreement with osteoclast-dependent HSPC mobilization, administration of calcitonin led to milder splenomegaly, reduced numbers of HSPC in the spleen, and their retention in the bone marrow. Although C-terminal telopeptide (CTX) levels, indicative of bone resorption, were lower in calcitonin-treated infected mice, they remained comparable in naive and control infected mice. Calcitonin-treated infected mice conveniently responded to anemia but generated less numbers of splenic macrophages and suffered from exacerbated infection; interestingly, calcitonin also decreased the number of macrophages generated *in vitro*. Globally, our results indicate that although osteoclast-dependent HSC mobilization from bone marrow to spleen is triggered in murine blood stage malaria, this activity is not essential for stress erythropoiesis.

## 1. Introduction

Quiescent hematopoietic stem cells (HSCs) reside in the bone marrow (BM) near the endosteum, in specific microenvironments called endosteal niches [1–3]. Low numbers of HSCs leave the BM and enter the blood stream in steady state conditions [4, 5], thereafter establishing in extramedullary sites of hematopoiesis like the spleen and liver, or returning to the BM [6, 7]. Recent studies involve bone resorbing osteoclasts in the homeostasis and mobilization of HSC and hematopoietic progenitor cells (HSPC) in conditions of stress, although this function remains controversial [8–11]. Indeed, stimulation of osteoclasts activity by Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand (RANKL) increases HSPC mobilization through secretion of cathepsin K, which cleaves c-Kit-ligand and Stromal Cell-Derived Factor 1 (SDF-1), required for maintenance of endosteal niches. Phlebotomy or lipopolysaccharide (LPS) injection, two models of physiological stress, also increase osteoclastogenesis and trigger

HSPC egression. Furthermore, the osteoclast inhibiting hormone calcitonin was reported to decrease HSPC mobilization in response to LPS injection [11]. However, contradictory evidences demonstrate that inhibition of osteoclast activity by bisphosphonate does not impair HSPC mobilization in response to Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) treatment [1, 10], suggesting that osteoclasts may only intervene in certain types of hematopoietic stresses.

Mobilization of HSPC is triggered by viral, bacterial, and *Plasmodium* infection [12–16], as well as by phenylhydrazine (PHZ-) induced anemia in mice [17–19], but the contribution of osteoclasts in these responses has not been yet characterized. Blood stage malaria causes systemic inflammation and acute hemolytic anemia in mice [20], which are events that trigger stress hematopoiesis to generate phagocytic cells involved in parasite clearance and new erythrocytes to cope with anemia [21–24]. In murine malaria models, stress hematopoiesis associates with egression of HSPC from the BM to spleen, which becomes the major site of erythropoiesis



[25, 26] and myelopoiesis [27, 28]. This mobilization is indirectly involved in the development of splenomegaly [16, 29] and extramedullary myelopoiesis [16], which are required in the resolution of acute parasitemia, through removal of parasitized red blood cells (pRBCs) by splenic macrophages [30–32].

We recently reported profound alterations in bone remodeling in mice with malarial or PHZ-induced hemolytic anemia [33], characterized by decreased bone formation, reduced osteoclastogenesis, and balance resulting in bone mass loss. Knowing these alterations, the contribution of osteoclasts in HSPC egression, stress erythropoiesis, and resolution of *Plasmodium chabaudi adami* DK infection was investigated in calcitonin-treated mice. Calcitonin is a peptide hormone known to inhibit osteoclasts bone resorption and osteoclast differentiation [34–36]. Our data indicate that calcitonin causes a significant drop in the basal activity of osteoclasts and partially interferes with the egression of HSPC from BM to spleen in blood stage malaria. However, the development of splenic stress erythropoiesis is not affected by this treatment. Unexpectedly, treatment with calcitonin exacerbates parasitemia *in vivo* and interferes with macrophage differentiation and proliferation *in vivo* and *in vitro*.

## 2. Materials and Methods

All procedures in mice were approved by the Animal Care Committee of the Université du Québec à Montréal (protocol 0210-677-0211) and according to relevant national and international guidelines.

**2.1. Mice and In Vivo Treatments.** Female BALB/c mice (Charles River, Canada) aged 4–6 weeks were used in all experiments. Mice were maintained in temperature controlled conditions ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) under a 12-hour light cycle (7:00 to 19:00), having free access to osmosed water and rodent chow 5075 (Charles River, Canada). Mice were euthanized by isoflurane inhalation followed by  $\text{CO}_2$ . Mice were infected with the *P. c. adami* DK nonlethal strain, originally isolated from *Thamnomys rutilans* and kindly provided by Dr. David Walliker, University of Edinburgh (Congo-Brazzaville, 1972) [37].

To evaluate the contribution of osteoclasts in HSPC mobilization during *Plasmodium* infection, mice received 200  $\mu\text{L}$  salmon calcitonin (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in PBS) (Biotrend, Switzerland) during 5 consecutive days by the intraperitoneal route and were infected with  $10^5$  *P. c. adami* DK pRBC in PBS by the intravenous route on the 3rd day of treatment. Mice were euthanized on days 5, 8, and 10 after infection for analysis of hematopoietic parameters and cytokines in plasma by ELISA (BioLegend, USA). To assess the effect of calcitonin-dependent osteoclasts inhibition on the erythropoietic responses to experimental hemolytic and nonhemolytic anemia, mice were injected intraperitoneally with 200  $\mu\text{L}$  of salmon calcitonin (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in PBS) (Biotrend, Switzerland) during 5 consecutive days. Hemolytic anemia was induced in mice by peritoneal administration of PHZ (Sigma Aldrich, Canada) at 40 mg/Kg of body weight in 200  $\mu\text{L}$  of PBS, on the 3rd and 4th days of calcitonin treatment. To induce

nonhemolytic anemia, the submandibular vein was incised with a 4 mm lancet (Medipoint, USA) and 300  $\mu\text{L}$  of blood was withdrawn on the 3rd day of calcitonin treatment. Mice received an equal volume of physiologic saline solution by the intraperitoneal route immediately after phlebotomy. In certain experiments with infected mice, 100  $\mu\text{L}$  DiD-loaded anionic liposomes (Formumax, USA) were administered intravenously one day prior to calcitonin treatment.

**2.2. Determination of Hemoglobin, Reticulocytes, and Parasitemia in Blood.** Hemoglobin levels were monitored daily by diluting 2  $\mu\text{L}$  tail-vein blood in 500  $\mu\text{L}$  Drabkin's solution (Sigma Aldrich, Canada). Following 15 min of incubation in the dark, 200  $\mu\text{L}$  of blood was transferred into 96-well plates (Costar, USA) in duplicate and absorbance was measured at 540 nm in a microplate reader. Values were converted to g/dL using a standard curve of rat hemoglobin (Sigma Aldrich, Canada) prepared in Drabkin's solution. All samples were assessed in duplicate. To estimate the percentages of reticulocytes in blood, 1  $\mu\text{L}$  of tail-vein blood was collected in 1 mL of PBS. The cell suspensions were then stained with anti-CD71-FITC antibody (BioLegend, USA) and incubated at  $4^\circ\text{C}$  for 30 min. Data were acquired with an Accuri C6 (Becton Dickinson, USA) and analyzed with the FlowJo software (Tree Star). In parallel, parasitemia was measured daily in methanol fixed blood smears stained with a 10% Giemsa solution in PBS during 15 minutes.

**2.3. Cell Isolation and Flow Cytometry.** Bone marrow single-cell suspensions were prepared by removal of tibia and femur epiphyses and flushing the marrow into 100  $\mu\text{L}$  of PBS by centrifugation of 300 g during 5 minutes. Spleen single-cell suspensions were obtained by mechanically dissociating the spleen in a 60 mm petri dish containing 5 mL of PBS. Recovered cells from the BM and the spleen were counted and resuspended at  $10^7$  cells/mL in RPMI 1640, supplemented with 10%, penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 mg/mL) (Invitrogen, USA). Cells were distributed at 100  $\mu\text{L}/\text{tube}$  into  $12 \times 75$  polypropylene tubes (Sarstedt, Canada). For assessment of erythroid populations, cells were stained with 1  $\mu\text{g}$  of TER119-PE and anti-CD71-FITC (clone RI7217) antibodies. For additional analysis, RBCs in spleen cell suspensions were lysed with the RBC lysing buffer HybriMax (Sigma Aldrich, Canada). HSCs were stained with 10  $\mu\text{L}$  of the biotinylated lineage antibody cocktail (CD3, Ly6/6C, B220, CD11b, and Ter119) and 1  $\mu\text{g}$  of streptavidin-APC, anti-Scal-FITC (clone D7), and anti-CD117-PE (clone 28B). Mature macrophages were stained with 1  $\mu\text{g}$  of anti-CD11b-FITC (clone M1/70) and anti-F4/80-PE (clone BM8). Dead cells were excluded from analysis with 7-amino-actinomycin D (7-AAD) (BioLegend, USA) staining. All antibodies were from BioLegend, USA. Analytical flow cytometry was performed on an Accuri C6 (Becton Dickinson, USA) and data was analyzed using FloJo software (Tree Star).

**2.4. Quantification of Macrophage Colony Stimulating Factor and C-Terminal Telo peptide by ELISA.** ELISA for quantification of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF,

Promokine, Canada) and C-terminal telopeptide (CTX, Mybiosource, USA) were performed following the manufacturer's instructions. Briefly, 96-well ELISA MaxiSorp plates (Nunc, USA) were coated overnight with 60  $\mu$ L of capture antibody at 4°C. Wells were washed 4 times with washing buffer (0, 05% Tween 20 in PBS, 300  $\mu$ L) and incubated with blocking buffer (1% BSA in PBS) for 1 hour. Following 4 washes, 60  $\mu$ L of samples and standards was added and incubated for 2 hours at room temperature, the plates were washed, and 60  $\mu$ L of detection antibody was added and incubated for 2 hours at room temperature. After 4 washes, 60  $\mu$ L of avidin-HRP was added and incubated for 30 min at room temperature, after which wells were washed 4 times. Sixty  $\mu$ L of tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution (Sigma-Aldrich, Canada) was added and incubated for 20 min at room temperature in the dark, and the reaction was stopped by adding 60  $\mu$ L 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The absorbance was determined with a microplate reader set at 450 nm.

**2.5. Colony-Forming Unit Assays.** Single-cell suspensions from the spleen and BM were prepared at  $1 \times 10^6$  and  $2 \times 10^5$  cells/mL, respectively, in RPMI 1640, supplemented with 10%, penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 mg/mL) (Invitrogen, USA) and 0.3 mL was added into 3 mL of MethoCult 03434 (StemCell Technologies, USA). The cell suspension was vortexed, allowed to stand for 10 min, and dispensed into 35 mm culture dishes (StemCell Technologies, USA) using a 16-gauge blunt-end needle and a 3 mL syringe, 1.1 mL per dish in duplicate. The cultures were incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in air, and 95% humidity for 8 days after which Colony-Forming Unit Macrophages (CFU-M) were identified and counted.

**2.6. Macrophages Differentiation In Vitro.** Single-cell suspensions from BM were prepared at  $1 \times 10^6$  cells/mL in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, penicillin (100 U/mL) (Sigma, USA), streptomycin (100 mg/mL) (Sigma, USA), 30% L929 cells supernatant (ATCC, USA), and 0, 125, 250, and 500 ng/mL of salmon calcitonin (Biotrend, Switzerland). After 6 days of incubation at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in air, and 95% humidity, cells were harvested and macrophage differentiation was assessed by flow cytometry with CD11b-FITC (BioLegend, USA) and F4/80-PE (BioLegend, USA) staining. To evaluate cell proliferation, a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt/phenazine methosulfate (MTS/PMS) solution (Promega, USA) was added to cell culture in a ratio 2:10. After 2 h incubation at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in air, and 95% humidity, absorbance was measured at 490 nm in a microplate reader.

**2.7. Statistical Analysis.** Statistical analysis was performed with a one-way ANOVA analysis of variance followed by Tukey's posttest for comparison of more than two groups and an unpaired *t*-test for comparison of two groups. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001 represent comparisons in respect to respective controls.

### 3. Results

**3.1. Administration of Calcitonin Enhances Parasitemia but Does Not Affect Splenic Stress Erythropoiesis.** In order to investigate the contribution for osteoclasts in malarial stress hematopoiesis with the *P. c. adami* DK infection model, BALB/c mice were treated with calcitonin two days prior to infection and three days following infection. Resolution of infection and subsequent stress erythropoiesis were monitored and compared in control and calcitonin-treated mice. For comparative purposes, the calcitonin dose and administration scheduled reported by Kollet et al. were used [11]. As expected, significantly lower plasma concentrations of CTX were measured in calcitonin-treated mice on day 5 after infection, confirming inhibition of osteoclast activity (Figure 1(a); *P* < 0.05). Parasitemia was exacerbated in calcitonin-treated mice throughout patent infection (Figure 1(b); *P* < 0.01), resulting in higher cumulative parasite burden (Figure 1(c); *P* < 0.001). Consequent to higher parasitemia, hemoglobin levels were relatively lower in calcitonin-treated mice on days 11 and 12 after infection (Figure 1(d); *P* < 0.01 and *P* < 0.05, resp.). Concurrent with enhanced anemia, the percentages of reticulocytes (CD71<sup>+</sup> cells) were higher in calcitonin-treated mice on day 14 after infection (Figure 1(e)).

The erythropoietic responses to anemia were also followed in PHZ-treated or phlebotomized mice (Figures 2(a) and 2(b)). In accordance with the responses to infection, comparable reticulocytosis occurred in control and calcitonin-treated mice under these two experimental conditions (Figures 2(c) and 2(d)).

**3.2. Administration of Calcitonin Promotes Retention of HSC in the Bone Marrow and Decreases Malarial Splenomegaly.** Considering the crucial role of splenic stress hematopoiesis in the control of *Plasmodium* infection [16, 28] and anemia [21, 25, 26, 38], the effect of calcitonin on splenic hematopoietic parameters was investigated early (day 5 after infection), at peak parasitemia (day 8), and following resolution of peak infection (day 10). As expected, spleen cellularity increased in mice with malaria (Figure 3(a)), and this effect was apparent and comparable in control and calcitonin-treated mice until day 5 after infection (Figure 3(a)). However, reduced numbers of splenocytes (Figure 3(a); *P* < 0.001) and reduced splenic index (Supplementary Figure 1 in Supplementary Material available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3909614>; *P* < 0.01) were measured in calcitonin-treated mice at peak infection, indicating milder splenomegaly.

Parallel monitoring of the erythroid populations confirmed higher numbers of splenic CD71<sup>+</sup> Ter119<sup>+</sup> cells in infected mice from day 5 after infection, which increased thereafter (Figure 3(b); *P* < 0.001); this response was significantly attenuated in calcitonin-treated mice at the time of peak infection (Figure 3(b); *P* < 0.01). In respect to splenic lineage negative cells, their numbers increased significantly compared to uninfected controls only after peak infection. Major differences were only apparent on day 8 after infection, reflected by significantly lower lineage negative cell numbers in calcitonin-treated infected mice (Figure 3(c); *P* < 0.01).

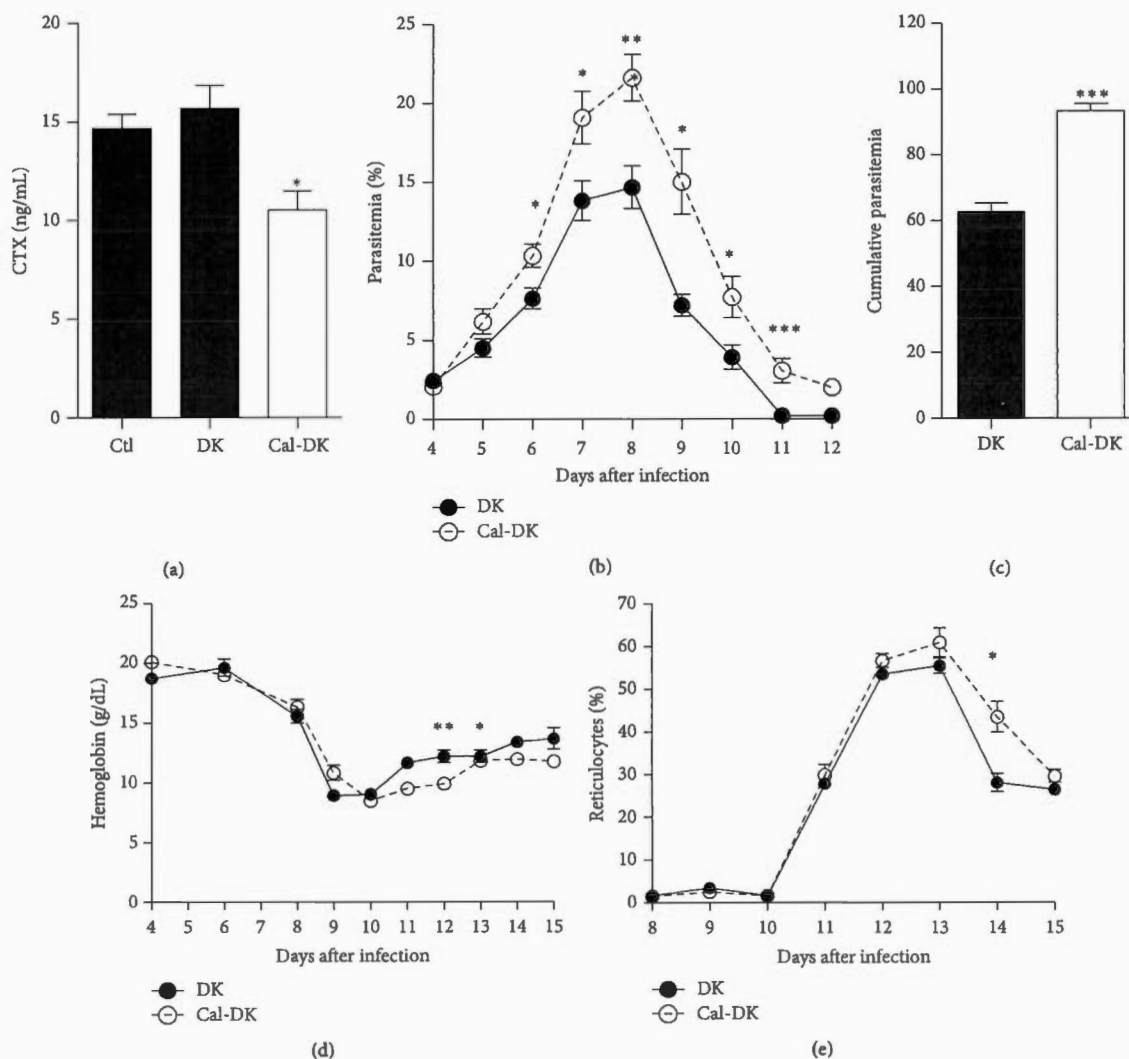


FIGURE 1: Impact of calcitonin on *Plasmodium chabaudi adami* parasitemia and anemia. Mice were treated with calcitonin (Cal-DK) or PBS (Ctl and DK) during 5 consecutive days. *P. c. adami* DK parasites ( $10^5$  pRBCs) were inoculated on the 3rd day of treatment. Four mice of each infected group and 4 uninfected controls were sacrificed at 5 day after infection and C-telopeptide of type I collagen (CTX) levels were assessed in the plasma by ELISA (a). Parasitemia was monitored daily for determination of the kinetics of infection (b) and cumulative parasitemia (c). Hemoglobin levels (d) and reticulocytosis (e) were measured in the blood. Data are mean  $\pm$  SEM and represent the compilation of three experiments (a total of 14–18 mice per infected group); values are compared using a nonparametric Student's *t*-test. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

In contrast, administration of calcitonin significantly reduced the number of splenic lineage negative cKit<sup>+</sup> Scal<sup>+</sup> cells (LSK) at peak infection, as well as 10 days after infection (Figure 3(e);  $P < 0.01, 0.001$ , resp.).

The analysis of lymphoid populations in spleen revealed increased numbers of CD90<sup>+</sup> cells (Supplementary Figure 2(A);  $P < 0.001$ ) and CD19<sup>+</sup> cells (Supplementary Figure 2(B);  $P < 0.001$ ) at peak infection; treatment with calcitonin resulted in lower CD19<sup>+</sup> cell numbers (Supplementary Figure 2(B);  $P < 0.05$ ). In respect to splenic myeloid cells, calcitonin did not affect the characteristic rise in CD11b<sup>+</sup>

cells (Supplementary Figure 2(C);  $P < 0.001$ ) and Fc $\epsilon$ RIa<sup>+</sup> cKit<sup>+</sup> cells at peak infection (Supplementary Figure 2(D);  $P < 0.01$ ).

Analysis of BM hematopoietic parameters confirmed the drops previously reported in BM cellularity of infected mice [39] (Figure 4(a)), and this effect was not modified by calcitonin. Evaluation of the erythroid populations in the BM showed similar drops in CD71<sup>+</sup> Ter119<sup>+</sup> cell numbers in the two groups of infected mice (Figure 4(b)). Compared to uninfected mice, the number of BM lineage negative cells significantly dropped on days 8 and 10 after infection in

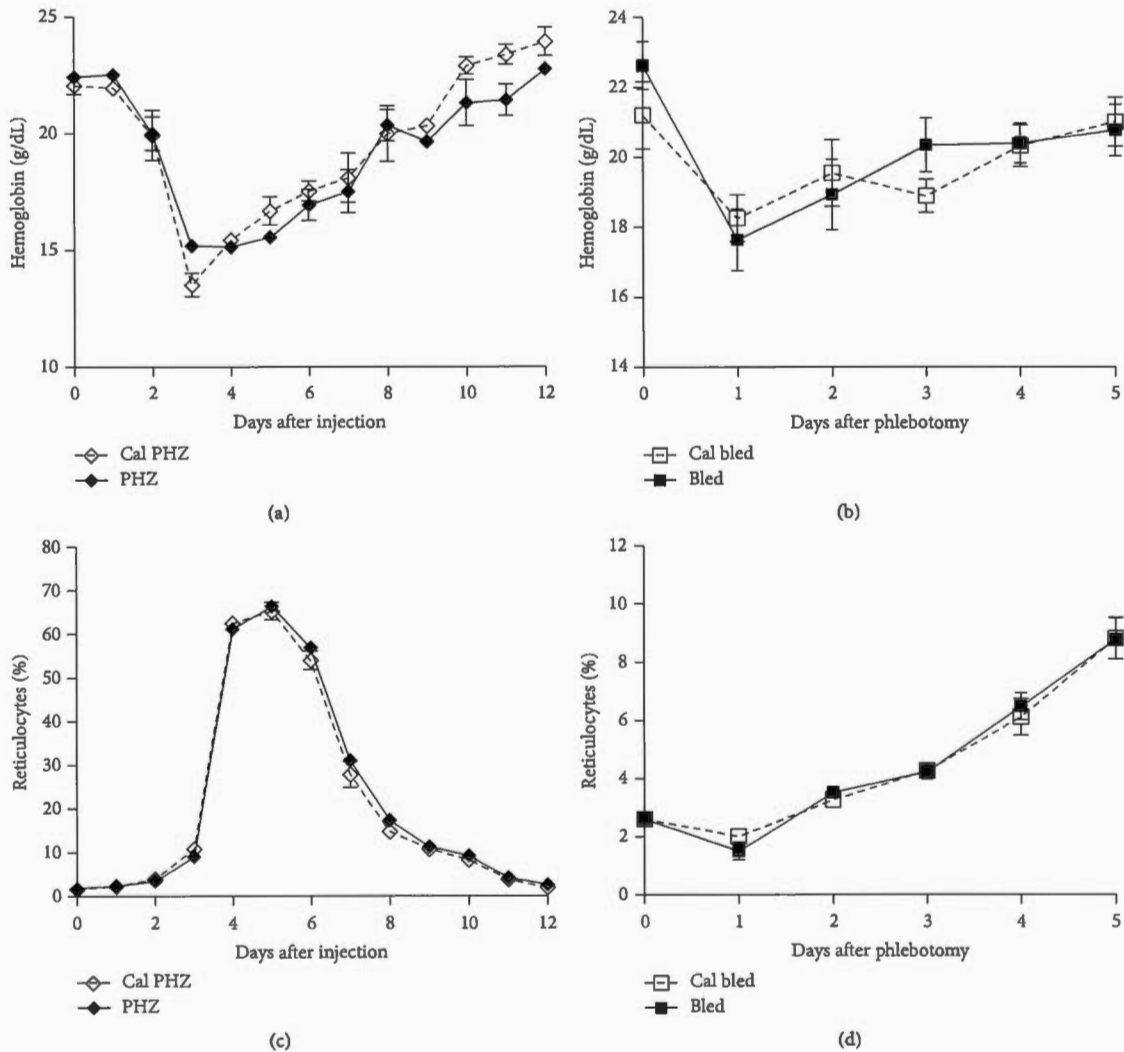


FIGURE 2: Effect of calcitonin on postexperimental anemia recovery. Mice were treated with calcitonin (Cal-Bled and Cal-PHZ) or PBS (Bled and PHZ) during 5 consecutive days. On the 3rd day of treatment, mice were phlebotomized (Bled and Cal-Bled;  $n = 11$ ) or received phenylhydrazine injections (PHZ and Cal-PHZ;  $n = 3$ ) and blood hemoglobin concentration (a and b) and reticulocytosis (c and d) were monitored daily. Data are mean  $\pm$  SEM and values are compared using a nonparametric Student's  $t$ -test.

infected mice (Figure 4(c)), becoming relatively higher in calcitonin-treated mice when compared to infected controls at peak infection (Figure 4(c);  $P < 0.01$ ). The numbers of LSK cells also increased in the BM of infected mice and were significantly higher in calcitonin-treated mice on day 8 after infection (Figure 4(d),  $P < 0.01$ ).

**3.3. Calcitonin Decreased Macrophages Number in Spleen and Altered Their Production during Plasmodium Infection.** As reviewed by Chua et al. [24], phagocytic macrophages are essential for clearance of pRBCs, and dysregulation of their number or function negatively affects resolution of *Plasmodium* infection. To determinate whether the increased parasitemia observed in calcitonin-treated mice was due to

restricted production of macrophages, the numbers of F4-80<sup>+</sup> cells were analyzed in the BM and spleen. Relative to uninfected mice, the infection did not provoke major effects on BM F4/80<sup>+</sup> cells, but their numbers were significantly higher in calcitonin-treated mice on day 10 after infection (Figure 5(a);  $P < 0.05$ ). In contrast to the BM, the infection caused an important increase in splenic F4/80<sup>+</sup> cells, and this effect was significantly attenuated in calcitonin-treated mice on days 8 and 10 after infection (Figure 5(b);  $P < 0.01$ , 0.001, resp.). Analysis of progenitors Colony Forming Unit-Macrophage (CFU-M) did not reveal major modifications in the BM of infected mice (Figure 5(c)), but lower numbers of CFU-M generated from the spleen of calcitonin-treated mice on day 8 after infection (Figure 5(d);  $P < 0.05$ ). Interestingly,

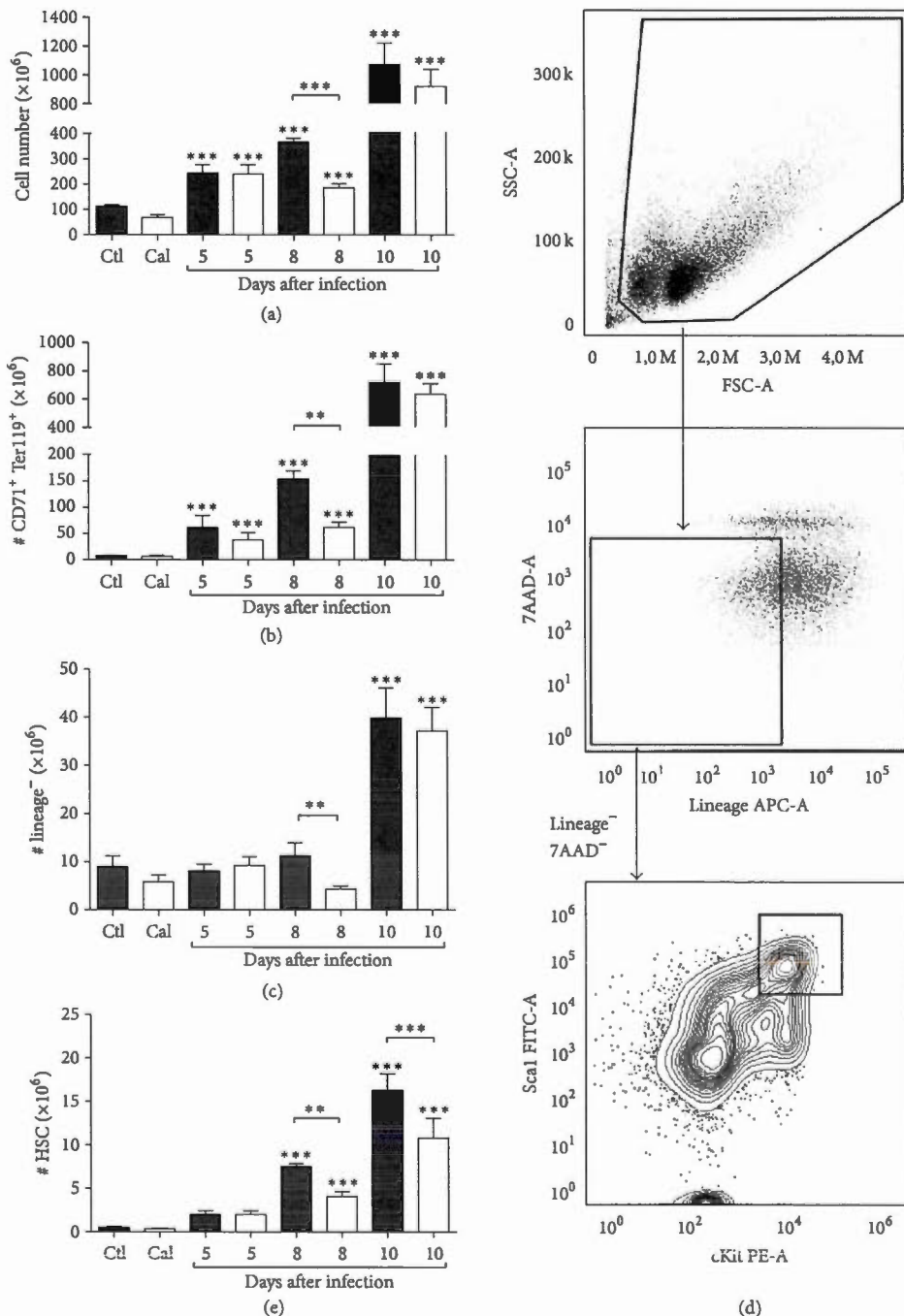


FIGURE 3: Modulation of splenic hematopoiesis during *Plasmodium* infection by calcitonin. Mice were treated with calcitonin (white bars) or with PBS (grey bars) during 5 consecutive days and were infected with *P. c. adami* DK parasites ( $10^5$  pRBCs) on the 3rd day of treatment. Data from uninfected controls (Ctl, Cal  $n = 3$ ) is included for comparison. Infected mice were sacrificed at 5 ( $n = 8$ ), 8 ( $n = 8-12$ ), and 10 ( $n = 3-4$ ) days after infection and the spleen was aseptically recovered for analysis of numbers of total cells (a), erythroid cells (b), lineage<sup>-</sup> cells (c), and hematopoietic stem cells (e) by cytofluorometry. Identification panel of hematopoietic stem cells (Lineage<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>Sca1<sup>+</sup>cKit<sup>+</sup>) by cytofluorometry is also represented (d). Data are mean  $\pm$  SEM and values are compared to respective uninfected control mice and between the two infected groups using a one-way ANOVA test. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .



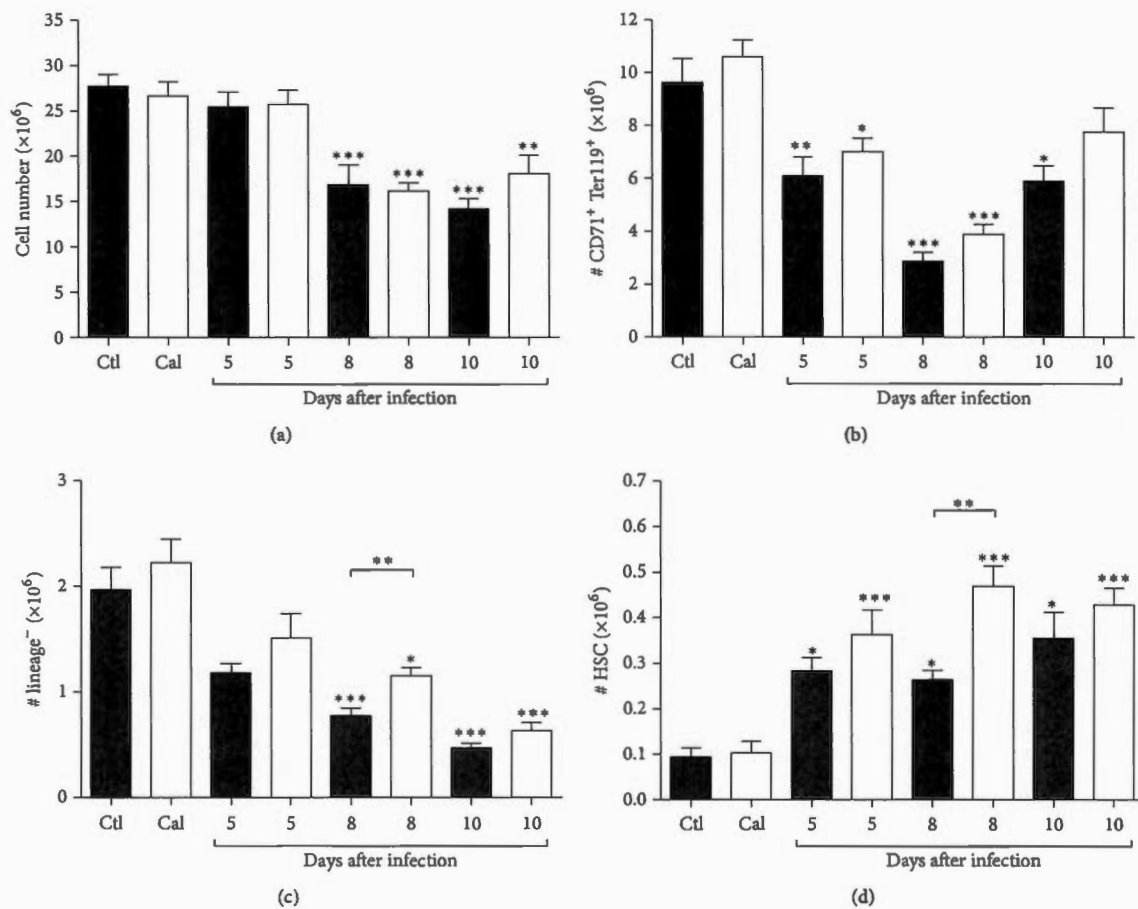


FIGURE 4: Impact of calcitonin on bone marrow hematopoiesis during *Plasmodium* infection. Mice were treated with calcitonin (white bars; Cal) or with PBS (grey bars; Ctl) during 5 consecutive days and were infected with *P. c. adami* DK parasites ( $10^5$  pRBCs) on the 3rd day of treatment. Data from uninfected controls (Ctl, Cal  $n = 3$ ) is included for comparison. Mice were sacrificed 5 ( $n = 8$ ), 8 ( $n = 8-12$ ), or 10 ( $n = 3-4$ ) days after infection, and femoral and tibia bone marrow was aseptically recovered for analysis of numbers of total cells (a), erythroid cells (b), lineage<sup>-</sup> cells (c), and hematopoietic stem cells (d) by cytofluorometry. Data are mean  $\pm$  SEM from 3 independent experiments (a total of 19–24 mice per infected group); values are compared to respective uninfected control mice and between the two infected groups using a one-way ANOVA test. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

serum M-CSF levels remained comparable in infected and uninfected mice (Supplementary Figure 3).

Altogether, our results suggest altered production of macrophages in calcitonin-treated and infected mice. To discriminate the impact of calcitonin on preexisting versus *de novo* generated macrophages, DiD anionic liposomes were administered prior to infection, to specifically stain all phagocytic cells including macrophages. DiD (DiIC18<sub>3</sub>) is a viable lipophilic fluorescent dye weakly fluorescent in water, but highly fluorescent and photostable when incorporated into cell membranes [40], and allows discriminating mature macrophages (DiD positive) from *de novo* generated macrophages (DiD negative) (Supplementary Figure 4). The lipid composition of the anionic liposomes was originally designed to efficiently deplete phagocytic cells *in vivo* and

*in vitro* when loaded with clodronate, and as nonphagocytic cells are not affected, this tool is efficient for targeting of macrophages [41, 42]. Compared to uninfected controls, in which the majority of BM macrophages were DiD<sup>+</sup>, approximately 50% F4/80<sup>+</sup> DiD<sup>+</sup> cells were found in infected mice on day 10 after infection, suggesting mobilization of mature macrophages from the BM and production of new (DiD<sup>-</sup>) macrophages (Figure 5(e);  $P < 0.01$ ). The numbers of splenic F4/80<sup>+</sup> DiD<sup>+</sup> cells drastically increased on day 10 after infection, indicating recruitment of mature macrophages to the spleen after peak infection (Figure 5(f);  $P < 0.001$ ). F4/80<sup>+</sup> DiD<sup>-</sup> cells also increased during infection, but this response was half-fold in calcitonin-treated mice (Figure 5(f);  $P < 0.01$ ), suggesting deficient *de novo* production of macrophages.

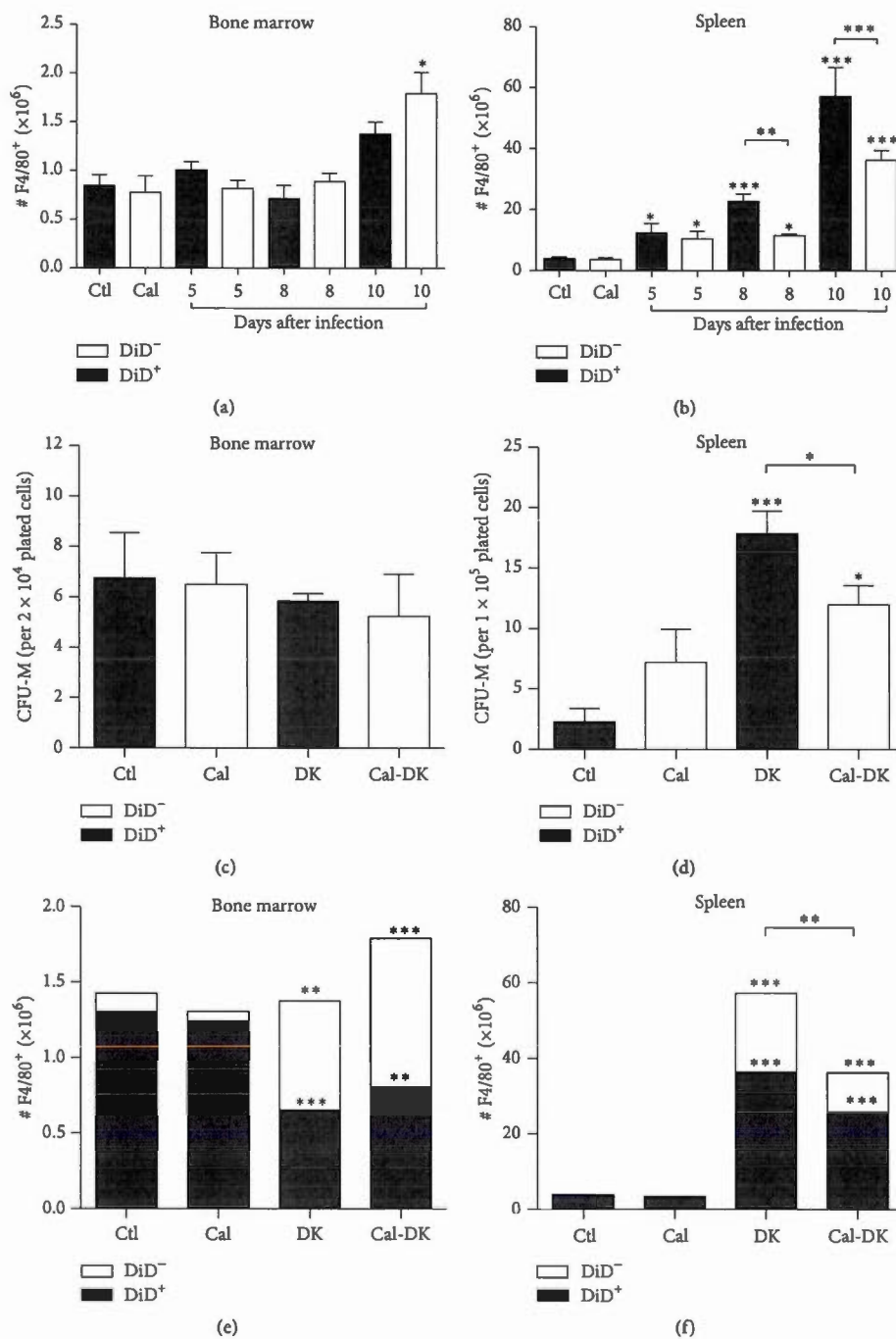


FIGURE 5: Modulation of macrophages population by calcitonin during *Plasmodium* infection. Before experimentation, mice were injected intravenously with DiD-liposomes for staining of phagocytic cells. Mice were treated with calcitonin (white bars; Cal) or with PBS (grey bars; Ctl) during 5 consecutive days and were infected with *P. c. adami* DK parasites ( $10^5$  pRBCs) on the 3rd day of treatment. Data from uninfected controls (Ctl, Cal  $n = 3$ ) is included for comparison. Mice were sacrificed at 5 ( $n = 8$ ), 8 ( $n = 8-12$ ), and 10 ( $n = 3-4$ ) days after infection and macrophages (F4/80<sup>+</sup> cells) were assessed by cytofluorometry in bone marrow (a) and spleen (b). At 8 days after infection, the numbers of Colony Forming Unit-Macrophage (CFU-M) were determined in 12-day bone marrow (c) and spleen (d) cultures using MethoCult 03434 media. At 10 days after infection, the numbers of DiD<sup>+</sup> and DiD<sup>-</sup> negative macrophages (F4/80<sup>+</sup> cells) were evaluated by cytofluorometry in bone marrow (e) and spleen (f). Data are mean  $\pm$  SEM from 3 independent experiments (with a total of 19–24 mice per infected group); values are compared to respective uninfected control mice and between the two infected mice groups using a one-way ANOVA test. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

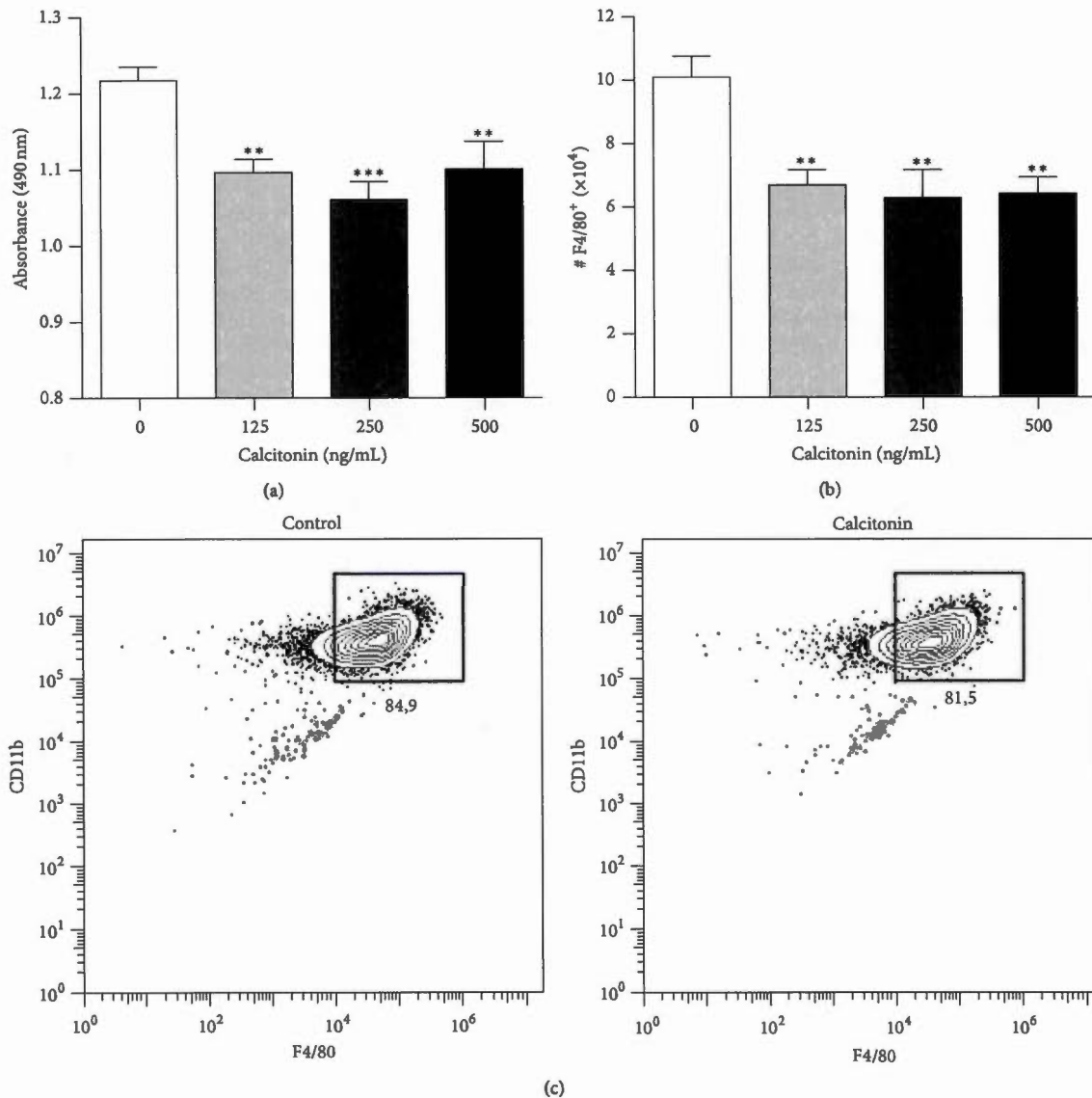


FIGURE 6: Impact of calcitonin on macrophage differentiation *in vitro*. Nonadherent cells of bone marrow at  $10^6$  cells/mL were cultured during 5 days in macrophage differentiation medium with different concentrations of calcitonin ( $n = 7-9$ ). Cell proliferation was evaluated by MTS/PMS assay (a) and macrophage counts ( $F4/80^+$  cells) were assessed by cytometry following identification panel (c). Data are mean  $\pm$  SEM and values are compared to controls using a one-way ANOVA test. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

**3.4. Calcitonin Inhibits *In Vitro* Differentiation of Macrophages.** Calcitonin was originally documented to inhibit osteoclasts bone resorption activity and osteoclast differentiation [34–36]. In order to investigate whether the lower macrophage numbers found in calcitonin-treated mice are concurrent with direct action of this hormone on myeloid precursors, the impact of calcitonin on differentiation of macrophage progenitors was evaluated *in vitro*. Our data indicates reduced proliferation (Figure 6(a);  $P < 0.01$ ) and lower numbers of  $F4/80^+$  cells in BM cultures stimulated with M-CSF (Figure 6(b);  $P < 0.01$ ).

## 4. Discussion

Herein, we evaluated the relative contribution for osteoclasts in the egression of HSPC from the BM to the spleen during blood stage malaria, using the well-characterized *P. c. adami* DK infection model in BALB/c mice. We previously compared bone remodelling markers in mice suffering from acute hemolytic anemia caused by *P. c. adami* infection or PHZ injection. These conditions are characterized by reduced bone mineralization and bone formation, as well as reduced numbers of osteoclasts and osteoclasts progenitors in the



BM [33]. Considering that the levels of CTX, indicative of osteoclast-dependent bone resorption, remained comparable in infected, PHZ-treated, and naive mice [33], we concluded that the decreased bone mass density found in mice with hemolytic anemia was concurrent with imbalance favoring bone resorption, as has been reported for other hemolytic conditions [43, 44]. Herein, calcitonin was administered to mice three days prior to and during the first two days of infection to block bone resorption. Interestingly, plasma CTX levels were comparable in naive and infected mice on day 5 after infection, suggesting no major stimulation of bone resorption in this murine malaria model. The fact that CTX levels were lower in calcitonin-treated mice confirmed an inhibitory action of this peptide hormone on steady state osteoclast activity.

In our experimental malaria model, the number of HSPC increased in a comparable manner in the BM of calcitonin-treated and control-infected mice on day 5 after infection, with no major effects in the spleen. However, at peak infection, calcitonin-treated mice had higher numbers of HSPC in the BM and lower numbers of HSPC in the spleen, also developing relatively milder splenomegaly. These results suggest that osteoclast-dependent mobilization of HSPC to the spleen is partially responsible for splenomegaly in murine malaria. Comparable recruitment of HSPC to the spleen has been reported in C57BL/6 mice infected with *P. chabaudi* AS. In this malaria model, IFN- $\gamma$  signalling and concurrent secretion of C-C motif ligand 2/7 (CCL2/CCL7) chemokines by BM stromal cells seem required for HSPC mobilization [16]. Interestingly, IFN- $\gamma$  signalling indirectly stimulates the activity of osteoclasts [45], which may stimulate their effects in HSPC mobilization.

In opposition to reduced HSPC mobilization, calcitonin did not affect splenic stress erythropoiesis. Appearance of circulating reticulocytes is considered an ultimate marker for functional erythropoiesis (as reviewed in [46]), and our data indicate comparable reticulocytosis in calcitonin-treated and control mice in response to malarial anemia, despite reduced mobilization of HSPC and reduced numbers of erythroid progenitors in the spleen. Accordingly, calcitonin did not affect reticulocytosis in mice recovering from anemia caused by bleeding or PHZ-treatment.

Calcitonin-treated mice developed higher parasitemia throughout the period of patent infection, resulting in enhanced anemia on days 11 and 12 after infection. In logic accordance with an exacerbated anemia, higher reticulocytosis occurred in these mice on day 14 after infection, which suggested that the drop in splenic erythroid progenitors on day 8 after infection did not have major effects on the recovery from anemia. In this context, stress Burst Forming Unit-Erythroid (BFU-E) with self-renewal properties have been reported, which efficiently generate cKit<sup>+</sup> CD71<sup>+</sup> Ter119<sup>+</sup> cells in response to erythropoietin (EPO), bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), stem cell factor (SCF), and hypoxia [47, 48]. As comparable numbers of cKit<sup>+</sup> CD71<sup>+</sup> Ter119<sup>+</sup> cells were measured in control and calcitonin-treated mice on day 8 after infection (data not shown), we conclude that osteoclast-dependent HSPC mobilization from the BM is not

essential for splenic stress erythropoiesis in murine blood stage malaria.

Analysis of lymphocytic and granulocytic cell populations in the spleen at peak infection revealed no modifications in the numbers of T cells, mast cells, and myeloid cells in calcitonin-treated mice, although decreased numbers of B cells were noticed. The exacerbated parasitemia measured in calcitonin-treated mice may be concurrent with compromised parasite killing by macrophages. Indeed, an important proportion of pRBCs circulate in the blood stream [49] and their elimination by spleen red pulp macrophages is pivotal for the control of infection [50–52]. Calcitonin-treated mice, which developed exacerbated parasitemia, had fewer numbers of macrophages in the spleen on days 8 and 10 after infection and, accordingly, reduced numbers of CFU-M generated from the spleen of these mice. B cells only intervene in the late resolution of blood stage malaria [53], and the reduction caused by calcitonin on CD19<sup>+</sup> cells numbers is not expected to affect the resolution of *P. c. adami* infection. In contrast, C-C chemokine receptor type 2- (CCR2-) dependent migration of monocytes from the BM to spleen [54] and splenic myelopoiesis are essential for the control of *P. chabaudi* infection [16]. Administration of DiD-loaded liposomes prior to calcitonin treatment and infection efficiently labelled macrophages, allowing following their fate and distinguishing newly generated macrophages *in vivo*. In respect to noninfected controls, we evidenced comparable drops in the number of DiD<sup>+</sup> macrophages in the BM and their concurrent increase in the spleen during infection. These results suggest that calcitonin does not alter the mobilization of monocytes/macrophages from the BM nor their recruitment to spleen. However, the fact that the numbers of splenic DiD<sup>-</sup> macrophages were significantly lower in calcitonin-treated mice on day 10 after infection rather indicates impaired *de novo* generation of macrophages in mice treated with this hormone. Accordingly, *in vitro* production of macrophages from BM progenitors was reduced by calcitonin.

The generally accepted paradigm proposes the recruitment of circulating monocytes to inflammatory site whereupon they differentiate into macrophages (as reviewed in [24, 55, 56]). However, recent studies have reported local proliferation of resident macrophages in response to inflammation [57, 58] and this process seems driven by M-CSF [59]. Calcitonin did not alter M-CSF levels in infected mice; we hypothesize that it may interfere with M-CSF-dependent signalling in certain bone marrow precursor cells and that impaired recruitment of HSPC to the spleen may further compromise myelopoiesis.

It is generally accepted that osteoclasts are the major cells responding to calcitonin (as reviewed in [60]). The hormone inhibits contraction and motility, as well as secretion of acid phosphatase [61–63]. Expression of the calcitonin receptor occurs during the differentiation of myeloid precursors into osteoclasts, requiring simultaneous action of M-CSF and RANKL [64, 65]. As such, the inhibition caused by calcitonin on macrophage differentiation is puzzling and suggests that common BM precursors committing to the monocyte-macrophage differentiation may respond to this hormone.

In summary, based on our preliminary study [33] and our new data, we conclude that the inflammatory response and anemia caused by blood stage infection with *P. c. adami* parasites do not stimulate the activity of osteoclasts. Inhibition of the basal activity of osteoclasts may be sufficient to partially block egression of HSPC from the BM, but this egression seems not essential for the stress erythropoiesis in conditions of acute anemia. The intriguing effects of calcitonin on the differentiation and proliferation of macrophages remain to be characterized.

### Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

### References

- [1] I. G. Winkler, N. A. Sims, A. R. Pettit et al., "Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs," *Blood*, vol. 116, no. 23, pp. 4815–4828, 2010.
- [2] Y. Xie, T. Yin, W. Wiegand et al., "Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging," *Nature*, vol. 457, no. 7225, pp. 97–101, 2009.
- [3] A. Köhler, V. Schmithorst, M.-D. Filippi et al., "Altered cellular dynamics and endosteal location of aged early hematopoietic progenitor cells revealed by time-lapse intravital imaging in long bones," *Blood*, vol. 114, no. 2, pp. 290–298, 2009.
- [4] D. E. Wright, A. J. Wagers, A. P. Gulati, F. L. Johnson, and I. L. Weissman, "Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells," *Science*, vol. 294, no. 5548, pp. 1933–1936, 2001.
- [5] J. L. Abkowitz, A. E. Robinson, S. Kale, M. W. Long, and J. Chen, "Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure," *Blood*, vol. 102, no. 4, pp. 1249–1253, 2003.
- [6] S. Massberg, P. Schaerli, I. Knezevic-Maramica et al., "Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues," *Cell*, vol. 131, no. 5, pp. 994–1008, 2007.
- [7] F. M. Wolber, E. Leonard, S. Michael, C. M. Orschell-Traycoff, M. C. Yoder, and E. F. Srouf, "Roles of spleen and liver in development of the murine hematopoietic system," *Experimental Hematology*, vol. 30, no. 9, pp. 1010–1019, 2002.
- [8] S. Lymperti, A. Ersek, F. Ferraro, F. Dazzi, and N. J. Horwood, "Inhibition of osteoclast function reduces hematopoietic stem cell numbers in vivo," *Blood*, vol. 117, no. 5, pp. 1540–1549, 2011.
- [9] A. Mansour, G. Abou-Ezzi, E. Sitnicka, S. E. W. Jacobsen, A. Wakkach, and C. Blin-Wakkach, "Osteoclasts promote the formation of hematopoietic stem cell niches in the bone marrow," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 209, no. 3, pp. 537–549, 2012.
- [10] K. Miyamoto, S. Yoshida, M. Kawasumi et al., "Osteoclasts are dispensable for hematopoietic stem cell maintenance and mobilization," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 208, no. 11, pp. 2175–2181, 2011.
- [11] O. Kollet, A. Dar, S. Shivtiel et al., "Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells," *Nature Medicine*, vol. 12, no. 6, pp. 657–664, 2006.
- [12] A. E. Gibbons, P. Price, and G. R. Shellam, "Analysis of hematopoietic stem and progenitor cell populations in cytomegalovirus-infected mice," *Blood*, vol. 86, no. 2, pp. 473–481, 1995.
- [13] P. Zhang, S. Nelson, G. J. Bagby, R. Siggins II, J. E. Shellito, and D. A. Welsh, "The lineage-c-kit+Sca-1+ cell response to *Escherichia coli* bacteremia in Balb/c mice," *STEM CELLS*, vol. 26, no. 7, pp. 1778–1786, 2008.
- [14] A. McCabe, Y. Zhang, V. Thai, M. Jones, M. B. Jordan, and K. C. MacNamara, "Macrophage-lineage cells negatively regulate the hematopoietic stem cell pool in response to IFN $\gamma$  at steady state and during infection," *STEM CELLS*, vol. 33, no. 7, pp. 2294–2305, 2015.
- [15] J. L. Johns and D. L. Borjesson, "Downregulation of CXCL12 signaling and altered hematopoietic stem and progenitor cell trafficking in a murine model of acute *Anaplasma phagocytophilum* infection," *Innate Immunity*, vol. 18, no. 3, pp. 418–428, 2012.
- [16] N. N. Belyaev, J. Biró, J. Langhorne, and A. J. Potocnik, "Extramedullary myelopoiesis in malaria depends on mobilization of myeloid-restricted progenitors by IFN- $\gamma$  induced chemokines," *PLoS Pathogens*, vol. 9, no. 6, Article ID e1003406, 2013.
- [17] L. E. Lenox, J. M. Perry, and R. F. Paulson, "BMP4 and Madh5 regulate the erythroid response to acute anemia," *Blood*, vol. 105, no. 7, pp. 2741–2748, 2005.
- [18] J. M. Perry, O. F. Harandi, P. Porayette, S. Hegde, A. K. Kannan, and R. F. Paulson, "Maintenance of the BMP4-dependent stress erythropoiesis pathway in the murine spleen requires hedgehog signaling," *Blood*, vol. 113, no. 4, pp. 911–918, 2009.
- [19] K. Mierzejewska, Y. M. Klyachkin, J. Ratajczak, A. Abdel-Latif, M. Kucia, and M. Z. Ratajczak, "Sphingosine-1-phosphate-mediated mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells during intravascular hemolysis requires attenuation of SDF-1-CXCR4 retention signaling in bone marrow," *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 814549, 5 pages, 2013.
- [20] T. J. Lamb and J. Langhorne, "The severity of malarial anaemia in *Plasmodium chabaudi* infections of BALB/c mice is determined independently of the number of circulating parasites," *Malaria Journal*, vol. 7, no. 1, article 68, 2008.
- [21] L. Weiss, "Mechanisms of splenic control of murine malaria: cellular reactions of the spleen in lethal (strain 17XL) *Plasmodium yoelii* malaria in BALB/c mice, and the consequences of pre-infective splenectomy," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 41, no. 2, pp. 144–160, 1989.
- [22] S. J. Galli, N. Borregaard, and T. A. Wynn, "Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils," *Nature Immunology*, vol. 12, no. 11, pp. 1035–1044, 2011.
- [23] C. Joos, L. Marrama, H. E. J. Polson et al., "Clinical protection from falciparum malaria correlates with neutrophil respiratory bursts induced by merozoites opsonized with human serum antibodies," *PLoS ONE*, vol. 5, no. 3, Article ID e9871, 2010.
- [24] C. L. L. Chua, G. Brown, J. A. Hamilton, S. Rogerson, and P. Boeuf, "Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology?" *Trends in Parasitology*, vol. 29, no. 1, pp. 26–34, 2013.
- [25] J.-L. Villeval, A. Gearing, and D. Metcalf, "Changes in hemopoietic and regulator levels in mice during fatal or nonfatal malarial infections. II. Nonerythroid populations," *Experimental Parasitology*, vol. 71, no. 4, pp. 375–385, 1990.

- [26] S. Tsubata, K. Ebe, T. Kawamura et al., "Protection against malaria by anti-erythropoietin antibody due to suppression of erythropoiesis in the liver and at other sites," *Immunology and Cell Biology*, vol. 83, no. 6, pp. 638–642, 2005.
- [27] G. Mungyer, L. G. Poels, C. Jerusalem, and R. Jerusalem, "Plasmodium berghei: influence on granulopoiesis and macrophage production in BALB/c mice," *Experimental Parasitology*, vol. 56, no. 2, pp. 266–276, 1983.
- [28] J. Riopel, M. Tam, K. Mohan, M. W. Marino, and M. M. Stevenson, "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice have impaired resistance to blood-stage malaria," *Infection and Immunity*, vol. 69, no. 1, pp. 129–136, 2001.
- [29] F. P. D. M. Hermida, D. P. Vieira, E. R. Fernandes, and H. F. de Andrade Jr., "Wave expansion of CD34<sup>+</sup> progenitor cells in the spleen in rodent malaria," *Experimental Parasitology*, vol. 121, no. 3, pp. 230–237, 2009.
- [30] Y. R. Ha, Y. Kang, and S. J. Lee, "In vivo study on splenomegaly inhibition by genistein in *Plasmodium berghei*-infected mice," *Parasitology International*, vol. 64, no. 5, pp. 369–376, 2015.
- [31] R. M. Elias, L. R. Sardinha, K. R. B. Bastos et al., "Role of CD28 in polyclonal and specific T and B cell responses required for protection against blood stage malaria," *The Journal of Immunology*, vol. 174, no. 2, pp. 790–799, 2005.
- [32] J. Krücken, L. I. Mehnert, M. A. Dkhil et al., "Massive destruction of malaria-parasitized red blood cells despite spleen closure," *Infection and Immunity*, vol. 73, no. 10, pp. 6390–6398, 2005.
- [33] R. Moreau, D. T. Malu, M. Dumais et al., "Alterations in bone and erythropoiesis in hemolytic anemia: comparative study in bled, phenylhydrazine-treated and *Plasmodium*-infected mice," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 9, Article ID e46101, 2012.
- [34] M. Gowen, F. Lazner, R. Dodds et al., "Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization," *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 14, no. 10, pp. 1654–1663, 1999.
- [35] L. S. Holliday, H. G. Welgus, C. J. Fliszar, G. M. Veith, J. J. Jeffrey, and S. L. Gluck, "Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 35, pp. 22053–22058, 1997.
- [36] Y. Yamamoto, T. Noguchi, and N. Takahashi, "Effects of calcitonin on osteoclast," *Clinical Calcium*, vol. 15, no. 3, pp. 147–151, 2005.
- [37] R. S. Ramiro, S. E. Reece, and D. J. Obbard, "Molecular evolution and phylogenetics of rodent malaria parasites," *BMC Evolutionary Biology*, vol. 12, no. 1, article 219, 2012.
- [38] M. M. Stevenson and G. Kraal, "Histological changes in the spleen and liver of C57BL/6 and A/J mice during *Plasmodium chabaudi* AS infection," *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 51, no. 1, pp. 80–95, 1989.
- [39] E. Dalko, V. Gaudreault, J. Sanchez Dardon, R. Moreau, and T. Scorza, "Preconditioning with hemin decreases *Plasmodium chabaudi* adami parasitemia and inhibits erythropoiesis in BALB/c mice," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 1, Article ID e54744, 2013.
- [40] M. Majkowski, P. Póda, J. Kulbacka, J. Saczko, and A. F. Sikorski, "Alternation of fluorescent spectra of membrane markers DiI C18(3) and DiI C18(5) evoked by laser illumination," *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 60, no. 10, pp. 789–791, 2012.
- [41] S. B. Weisser, N. van Rooijen, and L. M. Sly, "Depletion and reconstitution of macrophages in mice," *Journal of Visualized Experiments*, no. 66, Article ID e4105, pp. 5–11, 2012.
- [42] N. van Rooijen and E. Hendrikx, "Liposomes for specific depletion of macrophages from organs and tissues," *Methods in Molecular Biology*, vol. 605, pp. 189–203, 2010.
- [43] K. Thongchote, S. Svasti, M. Sa-Ardrit, N. Krishnamra, S. Fucharoen, and N. Charoenphandhu, "Impaired bone formation and osteopenia in heterozygous  $\beta$  IVSII-654 knockin thalassemic mice," *Histochemistry and Cell Biology*, vol. 136, no. 1, pp. 47–56, 2011.
- [44] C. Perisano, E. Marzetti, M. S. Spinelli, C. A. M. Callà, C. Graci, and G. MacCauro, "Physiopathology of bone modifications in  $\beta$ -thalassemia," *Anemia*, vol. 2012, Article ID 320737, 5 pages, 2012.
- [45] Y. Gao, F. Grassi, M. R. Ryan et al., "IFN- $\gamma$  stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, no. 1, pp. 122–132, 2007.
- [46] M. J. Koury and M. Rhodes, "How to approach chronic anemia," *Hematology*, vol. 2012, pp. 183–190, 2012.
- [47] O. F. Harandi, S. Hedge, D.-C. Wu, D. Mckeone, and R. F. Paulson, "Murine erythroid short-term radioprotection requires a BMP4-dependent, self-renewing population of stress erythroid progenitors," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 120, no. 12, pp. 4507–4519, 2010.
- [48] J. M. Perry, O. F. Harandi, and R. F. Paulson, "BMP4, SCF, and hypoxia cooperatively regulate the expansion of murine stress erythroid progenitors," *Blood*, vol. 109, no. 10, pp. 4494–4502, 2007.
- [49] J. L. Grun, C. A. Long, and W. P. Weidanz, "Effects of splenectomy on antibody-independent immunity to *Plasmodium chabaudi* adami malaria," *Infection and Immunity*, vol. 48, no. 3, pp. 853–858, 1985.
- [50] A. Yadava, S. Kumar, J. A. Dvorak, G. Milon, and L. H. Miller, "Trafficking of *Plasmodium chabaudi* adami-infected erythrocytes within the mouse spleen," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no. 10, pp. 4595–4599, 1996.
- [51] V. Brinkmann, S. H. E. Kaufmann, M. M. Simon, and H. Fischer, "Role of macrophages in malaria: O<sub>2</sub> metabolite production and phagocytosis by splenic macrophages during lethal *Plasmodium berghei* and self-limiting *Plasmodium yoelii* infection in mice," *Infection and Immunity*, vol. 44, no. 3, pp. 743–746, 1984.
- [52] M. M. Stevenson, E. Ghadirian, N. C. Philips, D. Rae, and J. E. Podoba, "Role of mononuclear phagocytes in elimination of *Plasmodium chabaudi* AS infection," *Parasite Immunology*, vol. 11, no. 5, pp. 529–544, 1989.
- [53] K. N. Couper, D. G. Blount, J. C. R. Hafalla, N. Van Rooijen, J. B. de Souza, and E. M. Riley, "Macrophage-mediated but gamma interferon-independent innate immune responses control the primary wave of *Plasmodium yoelii* parasitemia," *Infection and Immunity*, vol. 75, no. 12, pp. 5806–5818, 2007.
- [54] A.-M. Sponaas, A. P. Freitas do Rosario, C. Voisine et al., "Migrating monocytes recruited to the spleen play an important role in control of blood stage malaria," *Blood*, vol. 114, no. 27, pp. 5522–5531, 2009.
- [55] F. Geissmann, S. Jung, and D. R. Littman, "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties," *Immunity*, vol. 19, no. 1, pp. 71–82, 2003.
- [56] C. Shi and E. G. Pamer, "Monocyte recruitment during infection and inflammation," *Nature Reviews Immunology*, vol. 11, no. 11, pp. 762–774, 2011.
- [57] C. S. Robbins, I. Hilgendorf, G. F. Weber et al., "Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in

- atherosclerosis," *Nature Medicine*, vol. 19, no. 9, pp. 1166–1172, 2013.
- [58] S. J. Jenkins, D. Ruckerl, P. C. Cook et al., "Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of T<sub>H</sub>2 inflammation," *Science*, vol. 332, no. 6035, pp. 1284–1288, 2011.
- [59] L. C. Davies, M. Rosas, S. J. Jenkins et al., "Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation," *Nature Communications*, vol. 4, article 1886, 2013.
- [60] L. Masi and M. L. Brandi, "Calcitonin and calcitonin receptors," *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, vol. 4, no. 2, pp. 117–122, 2007.
- [61] H. Suzuki, I. Nakamura, N. Takahashi et al., "Calcitonin-induced changes in the cytoskeleton are mediated by a signal pathway associated with protein kinase A in osteoclasts," *Endocrinology*, vol. 137, no. 11, pp. 4685–4690, 1996.
- [62] I. Nakamura, N. Takahashi, E. Jimi, N. Udagawa, and T. Suda, "Regulation of osteoclast function," *Modern Rheumatology*, vol. 22, no. 2, pp. 167–177, 2012.
- [63] L. J. Raggatt and N. C. Partridge, "Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 33, pp. 25103–25108, 2010.
- [64] S. Granholm, P. Lundberg, and U. H. Lerner, "Expression of the calcitonin receptor, calcitonin receptor-like receptor, and receptor activity modifying proteins during osteoclast differentiation," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 104, no. 3, pp. 920–933, 2008.
- [65] S. Granholm, P. Henning, and U. H. Lerner, "Comparisons between the effects of calcitonin receptor-stimulating peptide and intermedin and other peptides in the calcitonin family on bone resorption and osteoclastogenesis," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 112, no. 11, pp. 3300–3312, 2011.



## BIBLIOGRAPHIE

- Adamson, J.W., 1968. The erythropoietin-hematocrit relationship in normal and polycythemic man: implications of marrow regulation. *Blood*, 32 (4), pp.597–609.
- Adamson, J.W., Torok-Storb, B. & Lin, N., 1978. Analysis of erythropoiesis by erythroid colony formation in culture. *Blood cells*, 4, pp.89–103.
- Allen, T.D. & Dexter, T.M., 1982. Ultrastructural Aspects of Erythropoietic Differentiation in Long-term Bone Marrow Culture. *Differentiation*, 21, pp.86–94.
- Angelillo-Scherrer, A. et al., 2008. Role of Gas6 in erythropoiesis and anemia in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 118 (2), pp.583–596.
- Arkins, S., Rebeiz, N., Brunke-Reese, D.L., Biragyn, A. & Kelley, K.W., 1995. Interferon-gamma inhibits macrophage insulin-like growth factor-I synthesis at the transcriptional level. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 9 (3), pp.350–60.
- Austyn, J.M. & Gordon, S., 1981. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *European journal of immunology*, 11 (10), pp.805–815.
- Bachmann, S., Le Hir, M. & Eckardt, K.U., 1993. Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 41 (3), pp.335–341.

- de Back, D.Z., Kostova, E.B., van Kraaij, M., van den Berg, T.K. & van Bruggen, R., 2014. Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Frontiers in physiology*, 5 (January), pp.1–9.
- Bakker, W.J. et al., 2004. FoxO3a regulates erythroid differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyl transferase 1. *The Journal of cell biology*, 164, pp.175–184.
- Bala, S., Kumar, A., Soni, S., Sinha, S. & Hanspal, M., 2006. Emp is a component of the nuclear matrix of mammalian cells and undergoes dynamic rearrangements during cell division. *Biochemical and biophysical research communications*, 342 (4), pp.1040–1048.
- Bessis, M. & Breton-Gorius, J., 1962. Iron Metabolism in the Bone Marrow as Seen by Electron Microscopy: A Critical Review. *Blood*, 19 (6), pp.635–663.
- Bessis, M., Mize, C. & Prenant, M., 1978. Erythropoiesis: comparison of in vivo and in vitro amplification. *Blood cells*, 4 (1–2), pp.155–174.
- Bogdanova, A., Mihov, D., Lutz, H., Saam, B., Gassmann, M. & Vogel, J., 2007. Enhanced erythro-phagocytosis in polycythemic mice overexpressing erythropoietin. *Blood*, 110, pp.762–769.
- Brunet, A. et al., 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 96, pp.857–868.
- Bunn, H.F., 2013. Erythropoietin. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3 (3), p.a011619.
- Chambellan, A., Coulon, S., Cavailles, A., Hermine, O. & Similowski, T., 2012. COPD and erythropoiesis: Interactions and consequences. *Revue des Maladies Respiratoires*, 29(2), pp.213–231.

- Chasis, J.A. & Mohandas, N., 2008. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood*, 112 (3), pp.470–478.
- Chawla, S., Rahar, B., Singh, M., Bansal, A., Saraswat, D. & Saxena, S., 2014. Exogenous sphingosine-1-phosphate boosts acclimatization in rats exposed to acute hypobaric hypoxia: Assessment of haematological and metabolic effects. *PLoS ONE*, 9 (6), pp.1–10.
- Chiba, T., Nagata, Y., Kishi, A., Sakamaki, K., Miyajima, A., Yamamoto, M., Engel, J.D. & Todokoro, K., 1993. Induction of erythroid-specific gene expression in lymphoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (24), pp.11593–11597.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-. *Anal Biochem*, 162, pp.156–159.
- Crocker, P. & Gordon, S., 1985. Isolation and characterization of resident stromal macrophages and hematopoietic cell clusters from mouse bone marrow. *The Journal of experimental medicine*, 162, pp.993–1014.
- Dai, C., Chung, I.J., Jiang, S., Price, J.O. & Krantz, S.B., 2003. Reduction of cell cycle progression in human erythroid progenitor cells treated with tumour necrosis factor alpha occurs with reduced CDK6 and is partially reversed by CDK6 transduction. *British Journal of Haematology*, 121 (6), pp.919–927.
- Dallalio, G., North, M., Worden, B.D. & Means, R.T.J., 1999. Inhibition of human erythroid colony formation by ceramide. *Experimental hematology*, 27 (7), pp.1133–1138.
- Dautry-varsat, A., Ciechanover, A. & Lodish, H.F., 1983. pH and the recycling of transferrin during receptor- mediated endocytosis. *Proceedings of the National*



*Academy of Sciences of the United States of America*, 80, pp.2258–2262.

- Davis, M.J.M., Tsang, T.T.M., Qiu, Y. & Dayrit, J., 2013. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *mBio*, 4 (3), pp.1–10.
- Dijkers, P.F., Medema, R.H., Lammers, J.W.J., Koenderman, L. & Coffey, P.J., 2000. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Current Biology*, 10, pp.1201–1204.
- Dolis, D., Moreau, C., Zachowski, A. & Devaux, P.F., 1997. Aminophospholipid translocase and proteins involved in transmembrane phospholipid traffic. *Biophysical chemistry*, 68 (1–3), pp.221–231.
- Dzierzak, E. & Philipsen, S., 2013. Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 21 (7), pp.409–415.
- Fabrick, B.O. et al., 2007. The macrophage CD163 surface glycoprotein is an erythroblast adhesion receptor. *Blood*, 109 (12), pp.5223–5229.
- Felli, N. et al., 2005. Multiple members of the TNF superfamily contribute to IFIBRONECTINE-gamma-mediated inhibition of erythropoiesis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175 (3), pp.1464–1472.
- Ferreira, R., Ohneda, K., Yamamoto, M. & Philipsen, S., 2005. GATA1 Function , a Paradigm for Transcription Factors in Hematopoiesis. *Molecular Cell biology*, 25 (4), pp.1215–1227.
- Fujimi, A. et al., 2008. Ex vivo large-scale generation of human red blood cells from cord blood CD34+ cells by co-culturing with macrophages. *International Journal of Hematology*, 87 (4), pp.339–350.

- Gifford, S.C., Derganc, J., Shevkoplyas, S.S., Yoshida, T. & Bitensky, M.W., 2006. A detailed study of time-dependent changes in human red blood cells: from reticulocyte maturation to erythrocyte senescence. *British journal of haematology*, 135 (3), pp.395–404.
- Giger, K.M. & Kalfa, T.A., 2015. Phylogenetic and Ontogenetic View of Erythroblastic Islands. *BioMed Research International*, 2015.
- Goodison, S., Urquidi, V. & Tarin, D., 1999. CD44 cell adhesion molecules. *Molecular pathology : MP*, 52 (4), pp.189–196.
- Gordon, L.I., Miller, W.J., Branda, R.F., Zanjani, E.D. & Jacob, H.S., 1980. Regulation of erythroid colony formation by bone marrow macrophages. *Blood*, 55 (6), pp.1047–1050.
- Goruppi, S., Ruaro, E. & Schneider, C., 1996. Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene*, 12 (3), pp.471–80.
- Gregory, T., Yu, C., Ma, a, Orkin, S.H., Blobel, G. a & Weiss, M.J., 1999. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood*, 94 (1), pp.87–96.
- Hamamura, K., Matsuda, H., Takeuchi, Y., Habu, S., Yagita, H. & Okumura, K., 1996. A critical role of VLA-4 in erythropoiesis in vivo. *Blood*, 87 (6), pp.2513–2517.
- Hanspal, M. & Hanspal, J.S., 1994. The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation: a 30-kD heparin-binding protein is involved in this contact. *Blood*, 84 (10), pp.3494–3504.
- Hanspal, M., Smockova, Y. & Uong, Q., 1998. Molecular identification and

functional characterization of a novel protein that mediates the attachment of erythroblasts to macrophages. *Blood*, 92 (8), pp.2940–2950.

Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., Galy, B. & Camaschella, C., 2010. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*, 142 (1), pp.24–38.

Hermine, B.O., Beru, N., Pech, N. & Goldwasser, E., 1992. An autocrine role for erythropoietin in mouse hematopoietic cell differentiation. *Blood*, 79 (12), pp.2253–2260.

Heyworth, C., Pearson, S., May, G. & Enver, T., 2002. Transcription factor-mediated lineage switching reveals plasticity in primary committed progenitor cells. *The EMBO journal*, 21 (14), pp.3770–3781.

Hirasawa, R., 2002. Essential and Instructive Roles of GATA Factors in Eosinophil Development. *Journal of Experimental Medicine*, 195 (11), pp.1379–1386.

Jacobsen, R.N. et al., 2014. Mobilization with granulocyte colony-stimulating factor blocks medullar erythropoiesis by depleting F4/80 (+) VCAM1 (+) CD169 (+) ER-HR3 (+) Ly6G (+) erythroid island macrophages in the mouse. *Experimental hematology*.

Jacobson, L.O., Goldwasser, E., Plzak, L.F. & Fried, W., 1957. Studies on Erythropoiesis. Part IV. Reticulocyte Response of Hypophysectomized and Polycythemic Rodents to Erythropoietin. *Experimental Biology and Medicine*, 94 (2), pp.243–249.

Jelkmann, W., 1992. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiological reviews*, 72 (2), pp.449–489.

Kashii, Y. et al., 2000. A member of Forkhead family transcription factor, FKHRL1, is one of the downstream molecules of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt

- activation pathway in erythropoietin signal transduction. *Blood*, 96, pp.941–949.
- Kawane, K., Fukuyama, H., Kondoh, G., Takeda, J., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y. & Nagata, S., 2001. Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science (New York, N.Y.)*, 292 (5521), pp.1546–1549.
- Kimura, T., Boehmler, A.M., Seitz, G., Kuçi, S., Wiesner, T., Brinkmann, V., Kanz, L. & Möhle, R., 2004. The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 supports CXCR4-dependent migration and bone marrow homing of human CD34<sup>+</sup> progenitor cells. *Blood*, 103 (12), pp.4478–4486.
- Kina, T., Ikuta, K., Takayama, E., Wada, K., Majumdar, A. Sen, Weissman, I.L. & Katsura, Y., 2000. The monoclonal antibody TER-119 recognizes a molecule associated with glycophorin A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage. *British Journal of Haematology*, 109, pp.280–287.
- Koury, M.J., 2011. Self-renewal in late-stage erythropoiesis. *Blood*, 117 (9), pp.1–4.
- Koury, M.J. & Bondurant, M.C., 1990. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science (New York, N.Y.)*, 248, pp.378–381.
- Kristiansen, M., Graversen, J. & Jacobsen, C., 2001. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*, 409 (January), pp.1999–2002.
- Kulesa, H., Frampton, J. & Graf, T., 1995. GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboblats, and erythroblats. *Genes & Development*, 9 (10), pp.1250–1262.
- Lee, G. et al., 2006. Targeted gene deletion demonstrates that the cell adhesion molecule ICAM-4 is critical for erythroblastic island formation. *Blood*, 108 (6), pp.2064–2071.

- Lee, G., Spring, F.A., Parsons, S.F., Mankelow, T.J., Peters, L.L., Koury, M.J., Mohandas, N., Anstee, D.J. & Chasis, J.A., 2003. Novel secreted isoform of adhesion molecule ICAM-4 : potential regulator of membrane-associated ICAM-4 interactions. , 101 (5), pp.1790–1797.
- Leimberg, M.J., Prus, E., Konijn, A.M. & Fibach, E., 2008. Macrophages function as a ferritin iron source for cultured human erythroid precursors. *Journal of cellular biochemistry*, 103 (4), pp.1211–1218.
- Li, L. et al., 2010. Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (8), pp.3505–3510.
- Linger, R.M.A., Keating, A.K., Earp, H.S. & Graham, D.K., 2008. TAM Receptor Tyrosine Kinases: Biologic Functions, Signaling, and Potential Therapeutic Targeting in Human Cancer. *Advances in Cancer Research*, 100, pp.35–83.
- Liu, M., Jin, X., He, X., Pan, L., Zhang, X. & Zhao, Y., 2015. Macrophages support splenic erythropoiesis in 4T1 tumor-bearing mice. *PLoS ONE*, 10 (3), pp.1–16.
- Liu, Y., Pop, R., Sadegh, C., Brugnara, C., Haase, V.H. & Socolovsky, M., 2006. Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. *Blood*, 108 (1), pp.123–133.
- Luo, B. et al., 2016. Erythropoietin Signaling in Macrophages Promotes Dying Cell Clearance and Immune Tolerance. *Immunity*, 44, pp.1–16.
- Maiese, K., Hou, J., Chong, Z. & Shang, Y., 2009. Erythropoietin, forkhead proteins, and oxidative injury: biomarkers and biology. *The Scientific World Journal*, pp.1072–1104.

- Manwani, D. & Bieker, J., 2008. The erythroblastic island. *Current top Dev Biol.*, 2153 (7), pp.2–6.
- Marengo-Rowe, A.J., 2007. The thalassemias and related disorders. *Proceedings (Baylor University. Medical Center)*, 20 (1), pp.27–31.
- De Maria, R., Testa, U., et al., 1999. Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood*, 93 (3), pp.796–803.
- De Maria, R., Zeuner, a, et al., 1999. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*, 401 (September), pp.489–493.
- Marinkovic, D., Zhang, X., Yalcin, S., Luciano, J.P., Brugnara, C., Huber, T. & Ghaffari, S., 2007. Foxo3 is required for the regulation of oxidative stress in erythropoiesis. *The Journal of clinical investigation*, 117, pp.2133–2144.
- Marsee, D.K., Pinkus, G.S. & Yu, H., 2010. CD71 (transferrin receptor): an effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens. *American journal of clinical pathology*, 134 (3), pp.429–435.
- Martinez, F.O., Gordon, S., Locati, M. & Mantovani, a., 2006. Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *The Journal of Immunology*, 177 (10), pp.7303–7311.
- Maxwell, P.H. et al., 1993. Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney international*, 44, pp.1149–1162.
- Mohandas, N., Prenant, M., St, L. & Dc, W., 1978. Three-dimensional model of bone marrow. *Blood*, 51 (4), pp.633–643.
- Muta, K., Krantz, S.B., Bondurant, M.C. & Wickrema, a, 1994. Distinct roles of

- erythropoietin, insulin-like growth factor I, and stem cell factor in the development of erythroid progenitor cells. *The Journal of clinical investigation*, 94 (1), pp.34–43.
- Noble, P.W., Lake, F.R., Henson, P.M. & Riches, D.W.H., 1993. Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-1 expression by a tumor necrosis factor-dependent mechanism in murine macrophages. *Journal of Clinical Investigation*, 91 (6), pp.2368–2377.
- Ohls, R.K., 1994. Erythropoietin Production by Macrophages from Preterm Infants : Implications Regarding the Cause of the Anemia of Prematurity. , 35 (1), pp.3–4.
- Ramos, P., Casu, C., Gardenghi, S., et al., 2013a. Macrophages support pathological erythropoiesis in polycythemia vera and  $\beta$ -thalassemia. *Nature medicine*, 19 (4), pp.437–445.
- Ramos, P., Casu, C., Gardenghi, S., et al., 2013 b. Macrophages support pathological erythropoiesis in polycythemia vera and  $\beta$ -thalassemia. *Nature medicine*, 19 (4), pp.437–445.
- Ramos, P., Casu, C. & Gardenghi, S., 2013. Macrophages support pathological erythropoiesis in Polycythemia Vera and Beta-Thalassemia. *Nature medicine*, 19 (4), pp.437–445.
- Rankin, E.B., Wu, C., Khatri, R., Wilson, T.L.S. & Andersen, R., 2012. The HIF signalling pathway in Osteoblasts Directly Modulates Erythropoiesis Through the Production of EPO. *Cell*, 149 (1), pp.63–74.
- Rich, I.N., Heit, W. & Kubanek, B., 1982. Extrarenal erythropoietin production by macrophages. *Blood*, 60 (4), pp.1007–1018.

- Rich, I.N., Vogt, C. & Pentz, S., 1988. Erythropoietin gene expression in vitro and in vivo detected by in situ hybridization. *Blood cells*, 14 (2–3), pp.505–520.
- Richmond, T.D., Chohan, M. & Barber, D.L., 2005. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends in cell biology*, 15 (3), pp.146–155.
- Romero, H., Warburton, C., Sanchez-Dardon, J. & Scorza, T., 2016. Osteoclasts Are Required for Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Mobilization but Not for Stress Erythropoiesis in *Plasmodium chabaudi adami* Murine Malaria. *Mediators of Inflammation*, 2016, pp.1–13.
- Rooijen, N. Van & Hendrikx, E., 2010. Liposomes for specific depletion of macrophages from organs and tissues. , 605, pp.189–203.
- Sadahira, Y., Yasuda, T. & Kimoto, T., 1991. Regulation of Forssman antigen expression during maturation of mouse stromal macrophages in haematopoietic foci. *Immunology*, 73 (4), pp.498–504.
- Sadahira, Y., Yoshino, T. & Monobe, Y., 1995. Very late activation antigen 4-vascular cell adhesion molecule 1 interaction is involved in the formation of erythroblastic islands. *The Journal of experimental medicine*, 181 (1), pp.411–415.
- Sawada, K., Krantz, S.B., Dessypris, E.N., Koury, S.T. & Sawyer, S.T., 1989. Human colony-forming units-erythroid do not require accessory cells, but do require direct interaction with insulin-like growth factor I and/or insulin for erythroid development. *Journal of Clinical Investigation*, 83 (5), pp.1701–1709.
- Sawyer, S.T. & Penta, K., 1994. Erythropoietin cell biology. *Hematology/oncology clinics of North America*, 8, pp.895–911.



- Schindelin, J. et al., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9 (7), pp.676–682.
- Secchiero, P., Melloni, E., Heikinheimo, M., Mannisto, S., Di Pietro, R., Iacone, A. & Zauli, G., 2004. TRAIL regulates normal erythroid maturation through an ERK-dependent pathway. *Blood*, 103 (2), pp.517–522.
- Shuga, J., Zhang, J., Samson, L.D., Lodish, H.F. & Griffith, L.G., 2007. In vitro erythropoiesis from bone marrow-derived progenitors provides a physiological assay for toxic and mutagenic compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (21), pp.8737–8742.
- Sica, A., 2010. Macrophages give Gas ( 6 ) to cancer. *Cancer*, 115 (11), pp.18–20.
- Socolovsky, M., 2013. Exploring the erythroblastic island. *Nature medicine*, 19 (4), pp.399–401.
- Socolovsky, M., Fallon, A.E.J., Wang, S., Brugnara, C. & Lodish, H.F., 1999. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a (-/-)5b (-/-) mice: A direct role for stat5 in Bcl-X (L) induction. *Cell*, 98, pp.181–191.
- Spivak, J.L., Pham, T., Isaacs, M. & Hankins, W.D., 1991. Erythropoietin is both a mitogen and a survival factor. *Blood*, 77, pp.1228–1233.
- Spring, F. a., 2001. Intercellular adhesion molecule-4 binds alpha4beta1 and alphaV-family integrins through novel integrin-binding mechanisms. *Blood*, 98 (2), pp.458–466.
- Stopka, T., Zivny, J.H., Stopkova, P., Prchal, J.F. & Prchal, J.T., 1998. Human hematopoietic progenitors express erythropoietin. *Blood*, 91 (10), pp.3766–3772.
- Tordjman, R., Delaire, S., Plouët, J., Ting, S., Gaulard, P., Fichelson, S., Roméo, P.-

- H. & Lemarchandel, V., 2001. Erythroblasts are a source of angiogenic factors. *Blood*, 97 (7), pp.1968–74.
- Weinberg, R.S., 1997. In vitro erythropoiesis in polycythemia vera and other myeloproliferative disorders. *Seminars in hematology*, 34 (1), pp.64–69.
- Whyatt, D.J. et al., 1997. The level of the tissue-specific factor GATA-1 affects the cell-cycle machinery. *Genes and function*, 1 (1), pp.11–24.
- Wilson, I. a & Jolliffe, L.K., 1999. The structure, organization, activation and plasticity of the erythropoietin receptor. *Current opinion in structural biology*, 9 (6), pp.696–704.
- Winterbourn, C.C., 1990. Oxidative reactions of hemoglobin. *Methods in Enzymology*, 186, pp.265–272.
- Wu, H., Liu, X. & Jaenisch, R., 1995. Generation of Committed Erythroid BFU-E and CFU-E Progenitors Does Not Require Etythropoietin or the Etythropoietin Receptor. , 63, pp.59–67.
- Wynes, M.W. & Riches, D.W.H., 2003. Induction of Macrophage Insulin-Like Growth Factor-I Expression by the Th2 Cytokines IL-4 and IL-13. *The Journal of Immunology*, 171 (7), pp.3550–3559.
- Yokoyama, T., Etoh, T., Kitagawa, H., Tsukahara, S. & Kannan, Y., 2003. Migration of erythroblastic islands toward the sinusoid as erythroid maturation proceeds in rat bone marrow. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 65 (4), pp.449–452.
- Yoshida, H., Kawane, K., Koike, M., Mori, Y., Uchiyama, Y. & Nagata, S., 2005. Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature*, 437 (7059), pp.754–758.

Zamai, L., Secchiero, P., Pierpaoli, S., Bassini, a, Papa, S., Alnemri, E.S., Guidotti, L., Vitale, M. & Zauli, G., 2000. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human erythropoiesis. *Blood*, 95 (12), pp.3716–24.

Zermati, Y., Fichelson, S., Valensi, F., Freyssinier, J.M., Rouyer-Fessard, P., Cramer, E., Guichard, J., Varet, B. & Hermine, O., 2000. Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors. *Experimental Hematology*, 28 (8), pp.885–894.