

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÔLE DE L'ÉRYTHROPOÏÉTINE ORIGINNAIRE DES MACROPHAGES DANS
L'ÉRYTHROPOÏÈSE BASALE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
À LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
GENÈVE PERRON-DESHAIES

MAI 2021

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.04-2020). 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

Merci à ma très chère professeure, Tatiana Scorza, pour sa joie de vivre, son aide lors des grosses journées de laboratoire, son support moral, son habileté à trouver du temps à m'accorder malgré son horaire chargé, ses discussions stimulantes sur la biologie, les sucreries, les barbecues et ses anecdotes sur Cholita. Faire une maîtrise avec Tatiana est une superbe expérience que je souhaiterais à tout le monde de pouvoir vivre. Merci à Philippe St-Louis pour sa compagnie, son aide si précieuse, son calme, sa facilité d'approche et son amitié. Je ne sais pas ce que j'aurais fait sans toi! Merci à Arleth Pozo et Paula Silvestrini pour les leçons d'espagnol. Merci à Denis Flipo pour son aide au cytofluoromètre et au confocal. Il a toujours trouvé le temps de répondre à mes questions avec le sourire. C'est impossible d'être de mauvaise humeur auprès de Denis, même quand l'Accuri bloque! Merci à Marie-Josée Carbonneau, Daniel Lemieux et Serge Paquet, avec qui j'ai eu le plaisir de travailler lors de mes contrats d'auxiliaire de laboratoire. Vous avez tous les trois égayé toutes les journées où j'ai eu la chance de vous voir! Merci à Barbara Augustin, ma professeure de microbiologie du Cégep. Tu m'as fait découvrir un nouveau monde qui n'a jamais arrêté de me fasciner depuis. Tu es un modèle à suivre, non seulement en tant que scientifique, mais aussi en tant que femme. Ta force, ta compassion et ton amour pour tes étudiants se ressentent dans chacun de tes cours.

Merci à mon conjoint, Mathieu, de m'avoir encouragée et supportée pendant mes années d'études. Merci de ta présence, grâce à laquelle je sais que peu importe les circonstances, au moins, j'ai un Mathieu qui m'aime. Merci à mes sœurs, Maude, Audrey et Lili, d'exister et de me donner une raison de sourire quand je m'ennuie. Et

finalement, merci à mes parents, Andréanne et Raymond, d'avoir cru en moi et de m'avoir encouragée à aller à l'université!

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	viii
RÉSUMÉ	ix
ABSTRACT.....	x
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I ÉTAT DES CONNAISSANCES, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS ..	4
1.1. État des connaissances.....	4
1.1.1. L'érythropoïèse	4
1.1.2. Les îlots érythropoïétiques	7
1.1.3. Le macrophage central de l'îlot érythropoïétique	8
1.1.4. Régulation de la production d'érythrocytes	9
1.1.5. L'érythropoïétine.....	10
1.2. Questions de recherche, hypothèses et objectifs.....	12
CHAPITRE II ARTICLE PUBLIÉ : RÔLE DE L'ÉRYTHROPOÏÉTINE ORIGINAIRE DES MACROPHAGES DANS L'ÉRYTHROPOÏÈSE BASALE CHEZ LA SOURIS.....	14
2.1. Introduction.....	16
2.2. Results	17
2.2.1. BMDM Conditioned with Apoptotic Cell-Derived Media Have Improved Ability to Sustain Erythropoiesis In Vitro	17
2.2.2. Detection of EPO in ex-vivo EBI Macrophages by IF and Confocal Imagery	19
2.2.3. Impact of Macrophage Depletion with Clodronate Liposomes on Murine Erythropoiesis	21
2.2.4. Restoration of Erythropoiesis by Exogenous EPO in Depleted Mice.....	23

2.3. Discussion.....	25
2.4. Materials and Methods	29
2.4.1. In Vitro Experiments.....	29
2.4.2. In Vivo Assays	32
2.4.3. Detection of EBI Macrophage Intracellular EPO by IF and Confocal Imagery	34
2.4.4. Statistical Analysis.....	34
Abbreviations	35
References	36
 CHAPITRE III RECHERCHE NON-PUBLIÉE : ÉTUDE COMPARATIVE DES RÉPONSES INDUITES PAR L'EPO DANS LA MOELLE OSSEUSE ET LA RATE CHEZ LA SOURIS	 40
3.1. Introduction	44
2.5. Matériel et méthodes.....	45
2.5.1. Matériel biologique	45
2.5.2. Injections d'EPO	45
2.5.3. Suivi de l'érythropoïèse	45
2.5.4. Cytofluorométrie	46
2.5.5. Analyses statistiques	46
2.6. Résultats.....	48
2.7. Discussion.....	55
 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	 59
RÉFÉRENCES.....	61

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
0.1. Schématisation des prédictions.....	3
1.1. Analyse des populations erythroblastiques d'une moelle osseuse murine par cytofluorométrie (tiré de Liu et al., 2006)	6
2.1. Bone marrow-derived macrophages produce EPO and stimulate erythroid cells differentiation <i>in vitro</i>	18
2.2. Analysis of EPO concentrations in bone marrow cell lysates from mice depleted of macrophages, and confirmation of EPO expression in erythroblastic island (EBI)-associated macrophages.....	20
2.3. Impact of clodronate liposomes on blood hemoglobin, reticulocytes and serum levels of EPO	21
2.4. Effect of macrophage depletion on bone marrow and splenic erythroid cells.....	23
2.5. Effect of exogenous EPO on bone marrow and splenic erythroblasts populations from mice treated with clodronate liposomes.....	25
2.6. Strategy to evaluate apoptotic cells in the bone marrow and spleen by flow cytometry	40
2.7. Assessment of total Ter119+ CD71+ cells and apoptosis levels in control mice and in mice treated with clodronate liposomes.....	41
2.8. Gating strategies for the exclusion of debris and dead cells.....	42
2.9. Gating strategies for identification of ProE, EryA, EryB and EryC.....	43

3.1. Effet de l'EPO sur le taux de réticulocytes et l'hémoglobine dans le sang périphérique	48
3.2. Effet de l'EPO sur la composition des populations de cellules Ter119 ⁺ dans la MO et la rate	50
3.3. Effet de l'EPO sur l'apoptose des érythroblastes dans la MO et la rate.....	51
3.4. Relation entre la proportion de cellules Ter119 ⁺ et leur apoptose dans la MO de souris BALB/c	52
3.5. Effet de l'ablation des macrophages et de 5 UI d'EPO sur l'apoptose des cellules érythroblastiques de la MO et la rate.....	54

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

BFU-E : « Blast Forming Unit – Erythroid »

CFU-E : « Colony Forming Unit – Erythroid »

ELISA : « Enzyme-Linked Immunosorbent Assay »

EPO : Érythropoïétine

EPO-R : Récepteur à l'érythropoïétine

EryA : Érythroblaste basophile

EryB : Érythroblaste polychromatique

EryC : Erythroblaste orthochromatique

FACS : « Fluorescence Activated Cell Sorting »

HSC : « Hematopoietic Stem Cell »

IE : Îlot érythroblastique

IF : Immunofluorescence

KO : « Knock-out »

MC : Macrophage central

MO : Moelle osseuse

ProE : Proérythroblaste

SCF : « Stem Cell Factor »

WB : « Western Blot »

RÉSUMÉ

L'érythropoïèse est un processus hautement régulé qui remplace deux millions d'érythrocytes chaque seconde. En conditions basales, l'érythropoïèse est caractérisée par un fort taux d'apoptose, régulée par la densité des érythroblastes en différenciation. La production d'érythrocytes est assurée par l'érythropoïétine (EPO), une hormone anti-apoptotique qui protège une quantité de cellules en différenciation proportionnelle à sa concentration. Au sein des îlots érythropoïétiques (IE), les macrophages soutiennent les érythroblastes en leur fournissant du fer et en éliminant les noyaux extrudés. Le rôle de l'EPO dans l'érythropoïèse a été largement étudié en contextes pathologiques, mais moins caractérisé en conditions homéostatiques. Chez la souris, la moelle osseuse (MO) est responsable de la majorité de la production basale d'érythrocytes, la rate étant plutôt impliquée dans l'érythropoïèse de stress. Il a été documenté que l'élimination de macrophages par traitements chimiques ou modifications génétiques inhibe l'érythropoïèse basale chez la souris. Une étude publiée en 2016 a démontré une production d'EPO par des macrophages péritonéaux murins. En nous basant sur ces faits, nous avons émis l'hypothèse que les macrophages des îlots érythropoïétiques murins sont une source d'EPO *in situ*. Notre objectif central est d'évaluer la contribution relative de cette protéine sur l'érythropoïèse homéostatique et l'apoptose. Nous avons premièrement validé l'expression intracellulaire d'EPO chez des macrophages issus d'IE de souris par immunofluorescence. Pour estimer l'impact de l'EPO dérivée des macrophages sur l'érythropoïèse basale, nous avons déplété les macrophages murins par injection de liposomes de clodronate, puis injecté de l'EPO recombinante dans une gamme de concentrations physiologiques (1 unité internationale (UI), 5 UI et 10 UI). Nous avons analysé les populations d'érythroblastes de la MO et de la rate par cytofluorométrie (composition, apoptose). Une diminution significative des taux d'érythroblastes basophiles et polychromatiques, stades répondant à l'EPO, a été mise en évidence dans la MO et la rate des souris déplétées. L'administration d'EPO a partiellement rétabli ces populations, de manière dose-dépendante. La déplétion de macrophages a causé une diminution importante de l'apoptose chez les érythroblastes sensibles à l'EPO dans la MO et la rate. Ces effets ont persisté chez les souris traitées à l'EPO recombinante malgré la restauration de l'érythropoïèse et la densité d'érythroblastes. Nos résultats démontrent que les macrophages soutiennent en particulier les érythroblastes qui répondent à l'EPO, et qu'ils sont impliqués dans le processus menant à leur apoptose. Cette étude ouvre une nouvelle perspective de recherche qui permettra de mieux comprendre le rôle des macrophages dans l'érythropoïèse.

Mots clés : érythropoïèse, macrophage, érythropoïétine, érythroblaste, îlot érythroblastique, érythrocyte, moelle osseuse, rate, rein.

ABSTRACT

Erythropoiesis is a highly regulated process which replaces two millions of red blood cells every second. In homeostatic conditions, it is characterized by a high rate of apoptosis, regulated by the density of erythroblasts in differentiation. The production of erythrocytes is ensured by erythropoietin (EPO), an anti-apoptotic hormone. EPO protects a number of differentiating cells proportional to its concentration. In erythroblastic islands (EBI), macrophages support erythroblasts by supplying them with iron and clearing extruded nuclei. The role of EPO in erythropoiesis has been largely studied in pathological contexts, but less characterized in homeostasis. In the mouse, the majority of basal erythrocyte production occurs in the bone marrow (BM), while the spleen is mostly implicated in stress erythropoiesis. It has been documented that macrophage depletion by chemical treatments or genetic modifications inhibits erythropoiesis in the mouse. A 2016 study has shown an EPO production by murine proximal macrophages. With these informations, we hypothesized that EBI macrophages are an *in situ* source of EPO for erythroblasts. Our main objective is to evaluate the relative contribution of this protein on homeostatic erythropoiesis and apoptosis. We first validated the expression of EPO by EBI macrophages using confocal imagery. To study its impact, we next depleted murine macrophages by clodronate liposomes injections, then supplied the animals with recombinant EPO in a scale of physiological concentrations (1 IU, 5 IU & 10 IU). We analyzed erythroblastic populations of the BM and spleen by cytometry (composition and apoptosis). A significant drop in basophilic and polychromatic erythroblasts, stages which are responsive to EPO, has been found in both the BM and the spleen of the depleted mice. The administration of EPO partially restored these populations in a dose-dependent manner. Macrophage depletion also caused an important diminution of apoptosis in these erythroblasts. This effect persisted in EPO-treated animals despite the restoration of erythropoiesis and erythroblastic density. Our results show that macrophages mainly sustain EPO-responsive erythroblasts and that they are implicated in the process leading to their apoptosis. This study offers new research perspectives that could lead to a better understanding of the role of macrophages in erythropoiesis.

Keywords : erythropoiesis, macrophage, erythropoietin, erythroblast, erythroblastic island, erythrocyte, bone marrow, spleen, kidney.

INTRODUCTION

L'érythropoïèse est un processus hautement régulé qui remplace à chaque seconde environ deux millions des globules rouges responsables des échanges gazeux à travers le corps.¹ Au cœur de ce processus travaille le macrophage, une cellule très polyvalente, majoritairement connue pour son rôle dans l'immunité innée.² Lors de l'érythropoïèse, des érythroblastes se lient à un macrophage central (MC), formant des structures appelées îlots érythroblastiques (IE). Chez l'humain, ces îlots sont retrouvées dans la moelle osseuse (MO). L'érythropoïèse splénique humaine est jugée peu importante en absence de pathologie et est peu caractérisée.^{3;4} Chez la souris, il est estimé qu'environ 10% de l'érythropoïèse basale a lieu dans la rate.⁵

Dans les IE, les macrophages sont des cellules nourrices pour les érythroblastes. Ils leur fournissent du fer pour la synthèse d'hémoglobine,^{6;7} accélèrent leur cycle cellulaire et phagocytent les noyaux rejetés lors de l'énucléation.^{3;8} Le contact avec les macrophages a été à maintes reprises démontré comme étant essentiel au bon fonctionnement de l'érythropoïèse.^{2;7;9-11}

L'apoptose et les niveaux d'érythropoïétine (EPO) sont deux autres facteurs régulateurs de l'érythropoïèse. En conditions homéostatiques, des progéniteurs érythroblastiques sont produits en excès et la majorité entrent en apoptose. L'EPO permet la survie d'une proportion de ces cellules; la stratégie physiologique consiste en une production excessive d'érythroblaste, de manière à contrer plus efficacement leur déficience. En conditions de stress anémique ou hypoxique, les cellules péritubulaires des reins produisent de l'EPO, dont l'action anti-apoptotique permet la survie d'un plus grand nombre de progéniteurs.^{10;12;13} Ce mécanisme, appelé

érythropoïèse de stress, permet un ajustement rapide du nombre d'érythrocytes en circulation. Dans ces conditions, l'EPO en circulation peut augmenter de jusqu'à 1000 fois, grimant de 10 mUI/mL à jusqu'à 10 UI/mL. La régulation de la production d'EPO est primordiale : une trop grande réponse à l'EPO peut causer certaines pathologies telles que la polycythémie, une maladie caractérisée par un sang trop épais, un cœur plus gros et une durée de vie limitée.¹ À l'inverse, une quantité insuffisante d'EPO entraîne une anémie et sa déficience génétique (*knock-out*, KO), une mort embryonnaire en 13 à 15 jours.¹⁴

Le rôle de l'EPO a été largement étudié dans des contextes pathologiques, cette dernière étant un traitement couramment administré aux patients anémiques.¹⁵⁻¹⁸ Cependant, son rôle dans l'érythropoïèse basale, bien que reconnu comme essentiel, est moins compris. Nous souhaitons comprendre comment la production d'EPO est régulée en absence de stress et quel est son rôle auprès de l'érythropoïèse homéostatique.

Une étude publiée par le laboratoire de Luo *et al.* en 2016 a rapporté, chez des souris, une production d'EPO par des macrophages du péritoine stimulés par des cellules en apoptose. Selon les auteurs, l'EPO exercerait une action autocrine sur les macrophages, stimulant leur expression du récepteur à l'EPO (EPO-R) et les menant vers un phénotype anti-inflammatoire. Ce phénotype permettrait une clairance efficace des débris cellulaires, sans production de cytokines inflammatoires.¹⁹ Par le passé, un autre laboratoire aurait observé une production d'EPO par des macrophages de la MO, mais la question n'a pas été poussée davantage depuis.^{20; 21}

Suivant ces informations, nous amenons l'hypothèse que les macrophages des IE sont une source d'EPO *in situ* pour les érythroblastes, et que cette production serait régulée par le taux d'apoptose de ces derniers. Ainsi, l'EPO générée dans les IE soutiendrait efficacement l'érythropoïèse basale.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons analysé les effets d'une déplétion en macrophages sur les populations érythroblastiques des organes érythropoïétiques de la souris (composition, apoptose). De plus, nous avons évalué dans quelle mesure un apport modéré en EPO exogène rétablirait l'érythropoïèse chez des souris déplétées en macrophages. Finalement, nous avons analysé l'impact d'une déplétion en macrophages et d'un apport en EPO exogène sur le taux de renouvellement des globules rouges.

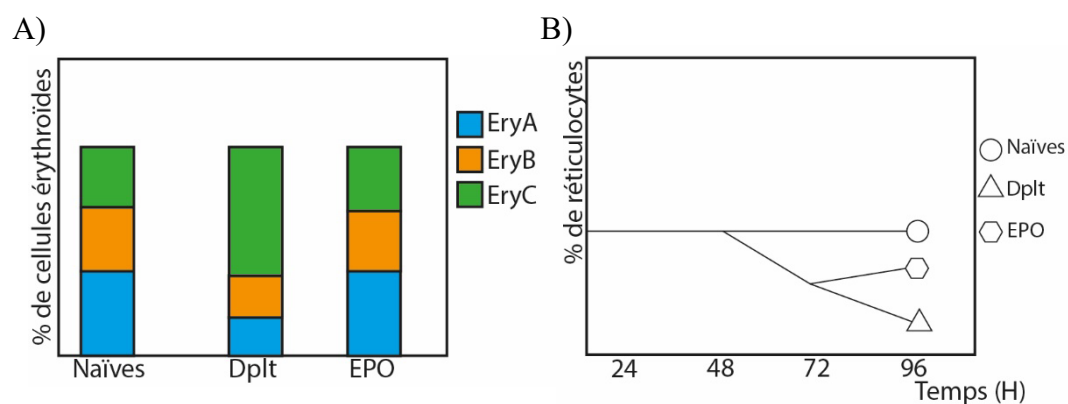


Figure 0.1. - Schématisation des prédictions

A) Prédiction associée aux objectifs 1 et 2 (exemple pour le critère de composition des populations seulement). Dplt représente les souris déplétées en macrophages, EPO représente celles déplétées puis traitées à l'EPO. La déplétion cause une chute des taux d'EryA et d'EryB, l'EPO rétablit ces populations. B) Prédiction associée à l'objectif 3. Le taux de réticulocytes chute chez les souris déplétées à partir de 48h. Après 96h de traitement, les souris traitées à l'EPO affichent un rétablissement, alors que l'érythropoïèse des souris déplétées est toujours déficiente.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

1.1. État des connaissances

1.1.1. L'érythropoïèse

L'érythropoïèse est un processus hautement régulé, qui assure la production des globules rouges nécessaires aux échanges gazeux à travers le corps. Un homme adulte et en santé possède environ 20 à 30 billions d'érythrocytes en circulation. Environ 1% de ces cellules est remplacé à chaque jour ; une production constante de nouveaux globules rouges est nécessaire pour maintenir l'homéostasie. Chez l'humain, l'érythropoïèse basale a lieu dans la moelle osseuse (MO) dans des structures appelées îlots érythropoïétiques (IE), constituées d'un macrophage central et de précurseurs érythroblastiques.^{1; 3} Chez la souris, environ 10% de l'érythropoïèse basale a lieu dans la rate, la plupart du processus se déroulant dans la MO.⁵

Les globules rouges sont issus de cellules souches hématopoïétiques (*Hematopoietic Stem Cells*, HSC). Chaque stade de leur différenciation est identifié en laboratoire par la présence de certains récepteurs à la surface des cellules, ainsi que par leur capacité à croître dans un milieu semi-solide en présence de cytokines spécifiques.^{1;}

La première étape de différenciation pro-érythrocytaire est la prise par les HSC de la voie des progéniteurs myéloïdes communs. Ceux-ci deviennent ensuite des progéniteurs bipotents, pouvant accéder aux voies menant aux granulocytes et macrophages, ou aux érythroïdes et mégacaryocytes. *In vitro*, ces cellules sont appelées *Colony-Forming Units – Granulocyte, Erythrocyte, Macrophage, Megakaryocyte* (CFU-GEMM). Elles sont caractérisées par l'expression du récepteur du facteur cellule souche (C-Kit R, récepteur du *Stem Cell Factor*, SCF) et de la transferrine (CD71), un récepteur couramment employé en cytométrie en flux pour identifier les précurseurs érythrocytaires. Ces stades ne sont pas encore sensibles à l'EPO.^{1; 22; 23}

Lorsqu'ils se divisent en *Blast-Forming Unit – Erythroid* (BFU-E), les précurseurs sont commis à la voie érythroïde. Le stade immature des BFU-E est mobile et se divise rapidement pour donner des colonies allant jusqu'à quelques milliers de cellules.⁴ Celles-ci expriment toujours les récepteurs c-Kit R et CD71, et les stades plus tardifs débutent l'expression du récepteur à l'EPO (EPO-R) et la synthèse d'hémoglobine.¹ En réponse à l'EPO, ils deviennent des *Colony-Forming Unit – Erythroid* (CFU-E), qui ont une capacité de division moindre que les BFU-E, mais ont une forte expression de CD71 et EPO-R.^{1; 4}

Les stades suivant la division d'un CFU-E en pro-érythroblastes (Pro-E) présentent des différences morphologiques identifiables. Au cytofluoromètre, ces stades peuvent être distingués en analysant la taille cellulaire et leurs expressions de CD71 et de Ter119, une protéine associée à la glycophorine-A présente sur les cellules érythroïdes à partir du stade de Pro-E.^{1; 4; 24}

Les ProE sont caractérisés par une forte expression de CD71 et une expression moyenne de Ter119. Chez une souris saine, les ProE sont plus nombreux dans la MO que dans la rate,²⁴ expriment très fortement l'EPO-R et synthétisent activement de l'hémoglobine. Ils traversent plusieurs étapes de maturation, devenant des

érythroblastes basophiles (EryA), polychromatiques (EryB), puis orthochromatiques (EryC). Ces trois stades sont caractérisés par une acidification du cytoplasme causée par l'accumulation d'hémoglobine, une diminution de la taille, une condensation du noyau et une expansion limitée.^{1, 24} Les Ery B tardifs et les stades subséquents ne sont plus sensibles à l'EPO ni au SCF.¹

Liu *et al.* (2006) ont développé une méthode simple de distinction de ces quatre stades au cytofluoromètre, basée sur la sélection des cellules Ter119^{high} et l'analyse de leur taille et expression de CD71 (voir Figure 1.1). Cette distinction permet d'évaluer facilement les changements dans l'expression de protéines transmembranaires pour chacun de ces stades, ainsi que la modulation de la composition des populations érythroblastiques dans les organes.

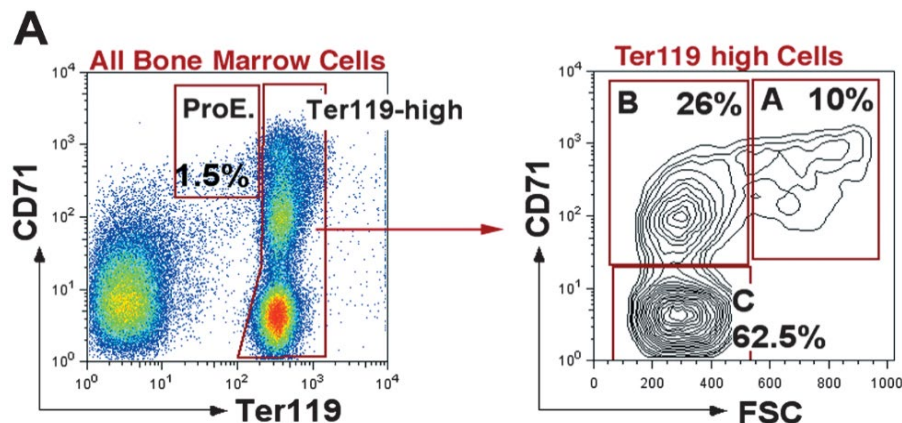


Figure 1.1. : analyse des populations érythroblastiques d'une moelle osseuse murine par cytofluorométrie (tiré de Liu et al., 2006).

Les ProE sont caractérisés par une expression forte de CD71 et moyenne de Ter119. L'analyse des cellules Ter119^{high} selon leur taille et leur expression de CD71 permet de discriminer les érythroblastes. Les EryA (basophiles) sont CD71⁺ et de grande taille. Les EryB (polychromatiques) sont CD71⁺ et plus petits. Les EryC (orthochromatiques) perdent graduellement l'expression de CD71.

et l'énucléation de l'érythroblaste. Le réticulocyte ainsi formé quitte la MO et entre dans la circulation. À cette étape, la production d'hémoglobine n'est pas encore terminée et se poursuit dans le sang périphérique. En environ une semaine, les

réticulocytes finissent leur maturation et deviennent des érythrocytes, qui vivront ensuite en moyenne 120 jours avant d'entrer en sénescence et d'être éliminés par les macrophages de la pulpe rouge de la rate. Comme les réticulocytes expriment toujours CD71, ils peuvent être distingués des globules rouges matures, qui perdent cette expression.^{1; 4; 25} Chez un animal en santé, la production de réticulocytes journalière est égale à l'élimination de globules rouges sénescents. Le pourcentage de réticulocytes en circulation est un paramètre couramment mesuré lors d'études sur l'érythropoïèse ou l'EPO.²⁶⁻³⁰

1.1.2. Les îlots érythropoïétiques

La majeure partie de l'érythropoïèse a lieu dans les IE, situés dans la MO et dans la pulpe rouge de la rate (chez la souris). Ces îlots sont formés lorsqu'un CFU-E répondant à l'EPO s'attache à un macrophage résident et subit de 4 à 5 divisions, donnant des îlots de 16 à 32 érythroblastes autour du macrophage central. Ces îlots se forment aussi *in vitro* lorsque ces cellules sont cultivées ensemble dans des conditions favorisant l'érythropoïèse.^{10; 31}

Trois mécanismes essentiels à l'érythropoïèse et impliquant les interactions avec des macrophages ont été identifiés dans les IE : la promotion de l'énucléation, la stimulation de la prolifération et l'inhibition de l'apoptose.¹⁰ Ces mécanismes sont liés au contact du macrophage central avec les érythroblastes, et impliquent plusieurs molécules d'adhésion.³ Une interaction adhésive importante est celle de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ des érythroblastes et VCAM-1 des macrophages, qui joue un rôle essentiel au maintien de la stabilité des îlots. C'est également le cas du couple ICAM-4 (érythroblaste) et intégrine α_v (macrophage). Une forme sécrétée d'ICAM-4 (ICAM-4S) est produite lors de la différenciation érythrocytaire terminale et contribue au détachement des réticulocytes en compétitionnant avec le récepteur α_v ; il s'agit d'un

bon exemple de régulation fine de la liaison entre les macrophages et les érythroblastes.^{3; 10}

1.1.3. Le macrophage central de l'îlot érythropoïétique

Les macrophages centraux des IE murins sont identifiés par leur expression du récepteur de sialoadhésine (CD169).³² Ils expriment aussi la protéine de surface F4/80, qui est commune aux macrophages de souris et auraient une fonction dans la tolérance immunitaire.^{33; 34} Les macrophages des IE sont des résidents des tissus hématopoïétiques et peuvent être distingués des macrophages dérivés des monocytes par l'absence d'expression de l'intégrine alpha M (ou CD11b).^{3; 35}

La distribution du fer aux érythroblastes est une des fonctions associées aux macrophages des IE.⁸ Les macrophages peuvent internaliser de l'hémoglobine et des particules de fer libres grâce au récepteur d'ébouage CD163. Par la suite, ils synthétisent de la ferritine et la libèrent par exocytose. Cette ferritine est ensuite utilisée par les érythroblastes pour synthétiser de l'hème.⁶⁻⁸

Les macrophages contribuent aussi à l'érythropoïèse par la phagocytose des noyaux expulsés par les EryC. Lors de l'énucléation, la protéine d'adhésion EMP et l'intégrine β_1 sont redistribuées sur la fine couche de membrane plasmique entourant les noyaux, appelés pyrénocytes après leur extrusion, afin que ceux-ci conservent leur contact avec les macrophages. Environ 10 minutes après l'énucléation, les pyrénocytes exposent de la phosphatidylsérine, un signal de « mangez-moi » pour les macrophages, et sont phagocytés. L'ADN qu'ils contiennent est dégradé par la DNase II des macrophages, mécanisme essentiel à la survie des phagocytes et au maintien de l'érythropoïèse basale.^{3; 8; 25; 36; 37}

L'adhésion des érythroblastes aux macrophages conduit à une accélération de leur cycle cellulaire par la réduction du temps de transit entre les phases G₀ et G₁.^{10; 31} Les macrophages ont aussi un rôle dans la rétention des HSC par les cellules stromales.³⁵ De plus, certains auteurs ont observé par le passé une expression d'EPO par des macrophages de la MO de souris, mais son importance fonctionnelle n'a pas été investiguée davantage.^{20; 21; 38}

Une étude publiée en 2016 centrée sur les mécanismes qui préservent l'homéostasie chez des macrophages éboueurs a démontré que les cellules en apoptose stimulent *in vitro* la production d'EPO par les macrophages péritonéaux.¹⁹ Les cellules apoptotiques libèrent de la sphingosine-1-phosphate (S1P), un lipide agissant comme signal de « trouvez-moi » pour les macrophages. La S1P enclenche chez ces derniers une cascade de signalisation menant à la production d'EPO et à l'expression d'EPO-R.¹⁹ L'EPO a également une action autocrine, favorisant ainsi l'expression d'EPO-R chez les phagocytes qui la produisent.³⁹ Cette activation et production d'EPO par les macrophages permettent une tolérance immunitaire face aux cellules apoptotiques (phénotype anti-inflammatoire), empêchant le déclenchement d'une réponse immunitaire en conditions homéostatiques.¹⁹ Dans la MO, cette tolérance est capitale, puisque les cytokines inflammatoires sont disruptives pour l'érythropoïèse.¹⁷

1.1.4. Régulation de la production d'érythrocytes

Des mécanismes de régulation négative de production d'érythroblastes sont également nécessaires pour le maintien de l'homéostasie. Un de ces mécanismes est l'expression du récepteur Fas (ou CD95), dont la liaison par son ligand (Fas-L ou CD178), induit l'apoptose de la cellule qui l'exprime. Le récepteur engagé bloque la différenciation et active la caspase-3, qui clive le facteur de transcription GATA-1. Ce facteur est essentiel à la maturation des érythroblastes, qui restent coincés au stade d'EryA en son absence. Nos données démontrent que chez la souris, autant Fas que

Fas-L sont exprimés davantage par les érythroblastes précoces (EryA et EryB), et très peu par les EryC. L'apoptose des érythroblastes pourrait ainsi être ajustée en fonction de la densité cellulaire : plus d'érythroblastes menant à plus de contact entre Fas et son ligand. L'EPO protège les érythroblastes de l'apoptose normalement induite par l'interaction entre Fas et Fas-L, mais n'empêche pas l'activation de la caspase-3.⁴⁰ En effet, cette dernière joue un rôle essentiel et contrôlé dans la différenciation terminale des cellules érythroïdes, différent de son rôle apoptotique en absence d'EPO.^{41; 42} La caspase-3 clive notamment les protéines lamine B et acinus, processus requis pour la condensation de la chromatine et le remodelage de la membrane nucléaire, deux procédés nécessaires à l'énucléation.^{41; 43} L'expression de Fas peut également augmenter en présence de cytokines inflammatoires comme le *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) et l'interféron- γ (IFN- γ), toutes deux identifiées comme disruptives de l'érythropoïèse dans des cas d'anémie d'origine inflammatoire.^{3; 17; 44} L'IFN- γ induirait la sécrétion de *TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand* (TRAIL), qui serait entre autres impliqué, comme le TNF- α , dans le clivage de GATA-1.⁴⁰

1.1.5. L'érythropoïétine

L'EPO est une glycoprotéine de 34 kDa qui permet la survie et la prolifération des progéniteurs érythroblastiques du stade de CFU-E jusqu'à celui d'EryB.^{1; 13; 45; 46} À l'âge adulte, la majorité de l'EPO est produite par les cellules péri-tubulaires des cortex rénaux. Sa concentration basale moyenne dans le plasma de l'humain adulte est de 6 à 32 UI/L (39,6 à 211,2 pg/mL).¹² Chez la souris, Sakata *et al.* ont mesuré une concentration basale moyenne de 18.3 UI/L (120,8 pg/mL).⁴⁷

La production d'EPO est régulée au niveau transcriptionnel par le facteur de transcription GATA-2, qui réprime son promoteur en conditions basales.⁴⁸ Dans ces conditions, la concentration d'EPO est trop faible pour permettre la survie de tous les progéniteurs.⁴⁵ Cette régulation est importante, car une production excessive d'EPO

peut mener à certaines pathologies telles que l'érythrocytose, où l'hématocrite (le pourcentage du volume sanguin occupé par les érythrocytes) augmente au-delà des niveaux normaux. Ceci mène à une viscosité excessive du sang, une augmentation de la taille du cœur et à une mort prématurée.⁴⁹ En période de stress, soit lors d'un manque d'oxygène, d'une perte de sang et/ou d'une diminution d'hémoglobine en circulation, la production d'EPO peut être augmentée de jusqu'à 1000 fois.¹ Ce processus, appelé érythropoïèse de stress, est caractérisé par une production accrue d'EPO par les cellules rénales, qui participent en plus grand nombre à sa synthèse.⁵⁰ L'EPO protège les CFU-E de l'apoptose, augmentant leur nombre jusqu'à 10 fois afin de compenser rapidement le manque d'oxygène en circulation.

Dans ces conditions, les niveaux de GATA-2 diminuent et la diminution du taux d'oxygène en circulation empêche la dégradation de l'amplificateur d'EPO *Hypoxia Inducible Factor* (HIF), menant à une hausse de sa production par les reins.^{12; 13; 51-53}

La réponse des cellules à l'EPO est déclenchée par sa liaison à EPO-R, dont l'expression débute chez les BFU-E tardifs. Des études ont démontré que ni l'EPO, ni EPO-R ne sont requis pour qu'un progéniteur se commette à la voie érythroïde. En absence de ces protéines, cependant, la différenciation des érythroblastes embryonnaires s'arrête au stade de Pro-E.^{1; 22; 54} L'expression d'EPO R est perdue chez les réticulocytes et les érythrocytes, qui ne sont plus vulnérables à l'apoptose.^{1; 55} La liaison de l'EPO à EPO-R mène à l'activation de la voie JAK2-STAT5, qui module l'expression de plusieurs gènes d'importance, dont celle de GATA-1.⁵⁶ Ce dernier est essentiel à la survie des érythroblastes et favorise sa propre expression, celle d'EPO-R, ainsi que la production de la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L.⁵⁷⁻⁵⁹ L'interaction EPO/EPO-R, ainsi que la production de GATA-1 et Bcl-X_L, protègent conjointement les érythroblastes de l'apoptose.^{45; 60} La nécessité de cette protection est mise en

lumière lorsque ces gènes sont supprimés. Une absence ou une expression insuffisante de GATA-1 cause la mort embryonnaire de souris après 10.5 à 11.5 jours de gestation.^{61;}
⁶² Les embryons murins mutants déficients en EPO ou EPO-R meurent d'anémie après 13 à 15 jours de gestation.^{14; 22; 60} Il en va de même lors d'un *knock-out* de Bcl-X_L, qui est létal au jour 13.⁶³

1.2. Questions de recherche, hypothèses et objectifs

Mon projet de maîtrise a été divisé en deux volets. Le premier volet porte sur le rôle des macrophages auprès des érythroblastes dans la MO et la rate. Le deuxième volet, secondaire, explore les différences notées dans l'érythropoïèse ayant lieu dans la MO et dans la rate

Pour le volet 1, mon hypothèse de travail était que les macrophages sont une source d'EPO *in situ* dans les organes érythropoïétiques en conditions basales, et que cette EPO soutient l'érythropoïèse homéostatique. Les objectifs associés à cette hypothèse étaient de :

1. Analyser les effets d'une déplétion en macrophages sur l'érythropoïèse splénique et de la MO de la souris (composition des populations, niveaux d'apoptose, taux de réticulocytes)
2. Évaluer dans quelle mesure un apport exogène en EPO peut rétablir l'érythropoïèse déficiente lors d'une déplétion de macrophages
3. Par microscopie confocale, valider visuellement la présence d'EPO intracellulaire dans des macrophages d'IEs de MO de souris.

Pour le volet 2, mon hypothèse de travail était que la rate, étant majoritairement un organe érythropoïétique de stress, serait plus sensible aux variations d'EPO de

l'organisme. Si cette hypothèse se confirme, je m'attends à voir une réponse plus marquée dans la rate que dans la MO lors d'injections d'EPO chez la souris. Mes objectifs associés à cette hypothèse sont les suivants :

1. Évaluer les différences entre l'érythropoïèse dans la MO et la rate à la suite d'injections d'EPO à différentes concentrations (compositions des populations, niveaux d'apoptose, taux de réticulocytes en circulation).
2. Analyser la réponse des macrophages d'IEs de MO et de rate suivant des apports en EPO exogène à différentes concentrations

CHAPITRE II

ARTICLE PUBLIÉ : RÔLE DE L'ÉRYTHROPOÏÉTINE ORIGINALE DES MACROPHAGES DANS L'ÉRYTHROPOÏÈSE BASALE CHEZ LA SOURIS

Contribution de l'étudiante à la rédaction d'un article

J'ai rédigé la première version de l'article et effectué la révision en collaboration avec la P^{re} Scorza. Les manipulations pour la partie *in vitro* ont été faites par Philippe St-Louis. J'ai fait les manipulations *in vivo* combinant la déplétion de macrophages et l'injection d'EPO, ainsi que l'étude d'îlots par microscopie confocale. Denis Flipo a ajusté le microscope confocal et pris les photos ; je les ai ensuite travaillées pour la publication. Hugo Roméro a réalisé certaines expériences de déplétion sans traitement avec l'EPO. Tatiana Scorza a fait les dosages d'hémoglobine et les ELISA d'EPO présentés dans l'article. J'ai effectué les analyses statistiques pour tous les résultats, et P^{re} Scorza a fait les figures. Le journal a été choisi car, si accepté, l'article ferait partie d'un volume spécial dédié à la régulation de l'érythropoïèse.

*Article*

Impact of Erythropoietin Production by Erythroblastic Island Macrophages on Homeostatic Murine Erythropoiesis

Genève Perron-Deshaies ¹, Philippe St-Louis ¹, Hugo Romero ^{1,2} and Tatiana Scorza ^{1,*}

¹ Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal H3C 3P8, Canada; perron-deshaies.geneve@courrier.uqam.ca (G.P.-D.); st-louis.philippe.2@courrier.uqam.ca (P.S.-L.); hugo.romero.pro@gmail.com (H.R.)

² CHU Sainte-Justine Research Centre, Montreal H3T 1C5, Canada

* Correspondence: scorza.tatiana@uqam.ca; Tel.: +1-514-9873000 (ext. 1918)

Received: 1 November 2020; Accepted: 23 November 2020; Published: 25 November 2020.

Abstract: Erythropoietin (EPO) is an essential hormone for erythropoiesis, protecting differentiating erythroblasts against apoptosis. EPO has been largely studied in stress or pathological conditions but its regulatory role in steady state erythropoiesis has been less documented. Herein, we report production of EPO by bone marrow-derived macrophages (BMDM) *in vitro*, and its further enhancement in BMDM conditioned with media from apoptotic cells. Confocal microscopy confirmed EPO production in erythroblastic island (EBI)-associated macrophages, and analysis of mice depleted of EBI macrophages by clodronate liposomes revealed drops in EPO levels in bone marrow (BM) cell lysates, and decreased percentages of EPO-responsive erythroblasts in the BM. We hypothesize that EBI macrophages are an *in-situ* source of EPO and sustain basal erythropoiesis in part through its secretion. To study this hypothesis, mice were injected with clodronate liposomes and were supplied with exogenous EPO (1–10 IU/mouse) to evaluate potential rescue of the deficiency in erythroid cells. Our results show that at doses of 5 and 10 IU, EPO significantly rescues BM steady state erythropoiesis in mice deficient of macrophages. We propose existence of a mechanism by which EBI macrophages secrete EPO in response to apoptotic erythroblasts, which is in turn controlled by the numbers of erythroid precursors generated.

Keywords: steady state erythropoiesis; macrophages; EPO; apoptosis; EBI

2.1. Introduction

The role of macrophages in the sustainment of erythropoiesis is an active field of study. Since the discovery of erythroblastic islands (EBI) by M. Bessis in 1958 [1], several functions have been described for central macrophages, including stimulation of erythroblastic proliferation, iron distribution and phagocytosis of extruded nuclei [2–6]. Macrophages have also been shown to promote erythroblastic survival, but the mechanism implicated in the process is poorly understood [6].

A study published in 1988 reported erythropoietin (EPO) expression by bone marrow (BM) macrophages [7], but its pertinence in erythropoiesis was not further studied. More recently, a paper published by Luo et al. (2016) reported secretion of EPO by proximal macrophages when stimulated by apoptotic cell-derived sphingosine-1-phosphate (S1P). This EPO production had an autocrine effect on the macrophage, stimulating expression of EPO-receptor (EPO-R) and inducing an M2-like phenotype in these cells, which enhanced their phagocytic properties (activation) and production of anti-inflammatory cytokines [8].

Erythropoiesis is regulated in part by the apoptosis of erythroblasts. In homeostatic conditions, progenitors are produced in excess, and *in situ* EPO concentrations allow for the survival of only a few of these cells, the remaining undergoing apoptosis. Based on this information, we hypothesized that EBI central macrophages are an *in-situ* source of EPO and that its production is regulated by surrounding apoptotic cells.

To study this hypothesis, bone marrow derived macrophages (BMDM) were conditioned with apoptotic cell media and were assessed for EPO production *in vitro*. EBI were isolated from mice for detection of intracellular EPO by confocal imagery (immunofluorescence, IF). Finally, the ability of physiological doses of recombinant human EPO (rHuEPO) to restore the deficient erythropoietic response in clodronate-treated mice was investigated.

2.2. Results

2.2.1. BMDM Conditioned with Apoptotic Cell-Derived Media Have Improved Ability to Sustain Erythropoiesis In Vitro

Interaction of murine peritoneal macrophages with apoptotic cells induces EPO secretion by macrophages, which in turn stimulates phagocytosis and elimination of apoptotic cells [8]. Considering that elevated numbers of bone marrow and spleen Ter119⁺ cells enter apoptosis in steady stage conditions (Supplementary Figure S1(A–E)), we investigated whether conditioning of BMDM with supernatants from ~50% apoptotic cells (Supplementary Figure S1F) rendered these cells more apt to support erythroid differentiation. For this, Lin⁻Sca1⁺cKit⁺ stem cells (LSK) were enriched by negative selection and cultured in media without the addition of exogenous EPO in the absence or presence of control or conditioned BMDM at a ratio of 4:1 ratio, respectively, for five days. Co-culture of LSK with BMDM resulted in the appearance of Ter119⁺CD71⁺ cells in the culture (Figure 1A, B), the effect being enhanced when BMDM were preconditioned with media from apoptotic splenocytes for 16 h, and significantly abrogated by an EPO neutralizing antibody (Figure 1B). In accordance with these results, EPO protein was confirmed in lysates from BMDM and its expression was increased two-fold in conditioned BMDM (Figure 1C). The fact that an EPO specific ELISA was not sensitive enough to detect EPO in BMDM-derived supernatants suggest that this hormone is secreted at relatively low levels (less than 1 pg/mL; data not shown). These results suggest that BMDM-derived EPO stimulates the differentiation of LSK into Ter119⁺CD71⁺ cells under the *in vitro* conditions tested, and that the effect is further enhanced in BMDM preconditioned with apoptotic cell media.

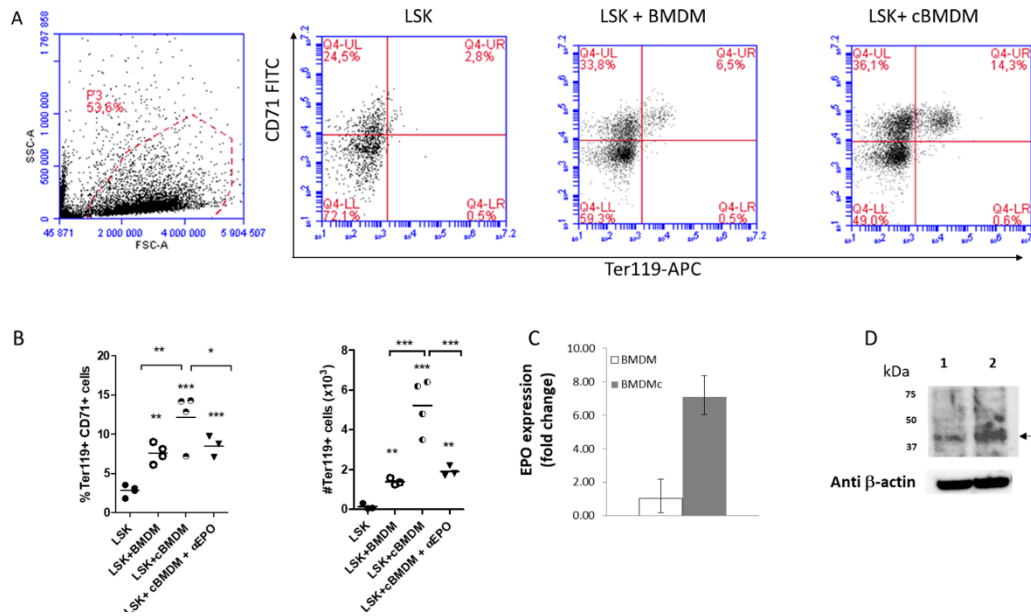


Figure 2.1. Bone marrow-derived macrophages produce EPO and stimulate erythroid cells differentiation *in vitro*. (A) Lineage⁻cKit⁺Sca1⁺ (LSK) cells were cultured for 5 days in an erythropoietic media without exogenous EPO, alone or in the presence of BMDM or BMDM conditioned with media from apoptotic splenocytes (cBMDM). CD71/Ter119 expression was analyzed by flow cytometry. (B) Data from three independent experiments show higher percentages and numbers of Ter119⁺ cells in BMDM-LSK co-cultures, an effect significantly enhanced when cBMDM were used, and partially abrogated by an EPO neutralizing antibody. (C) Enhanced expression of EPO-specific mRNA as measured in cBMDM when compared to BMDM in two independent qRT-PCR assays. (D) Western blot analysis of EPO production from control BMDMs (1) and cBMDMs (2), densitometry analysis indicating two-fold EPO expression in the latter. B-actin was used as a reference gene. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

2.2.2. Detection of EPO in ex-vivo EBI Macrophages by IF and Confocal Imagery

Having confirmed *in vitro* production of EPO by BMDM, we assessed the impact of clodronate liposomes on EPO levels in the BM, five days following their administration. Clodronate-treated mice had significantly lower percentages of F4/80⁺ cells and F4/80⁺CD11b⁻ cells (a phenotype associated with EBI macrophages) in femoral BM (Figure 2A, $p < 0.001$). EPO content in supernatants from BM cell lysates was assessed by ELISA, and was found to be significantly lower in clodronate treated mice (Figure 2B, $p < 0.05$), suggesting that macrophages are an important source of EPO in the BM. The specific contribution of EBI macrophages as EPO producers was confirmed by confocal microscopy (Figure 2C), with EPO being detected in macrophages surrounded by erythroblasts. Altogether, these results confirm that EBI-associated macrophages represent an *in-situ* source of EPO for differentiating erythroblasts.

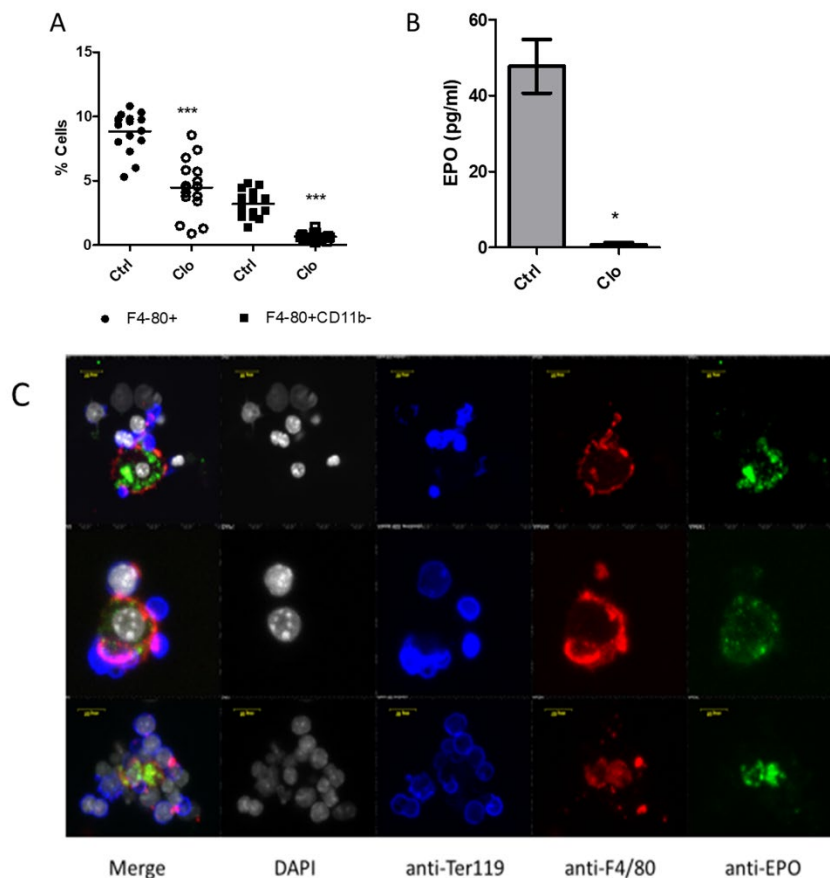


Figure 2.2. Analysis of EPO concentrations in bone marrow cell lysates from mice depleted of macrophages, and confirmation of EPO expression in erythroblastic island (EBI)-associated macrophages. **(A)** Analysis of F4-80+ and F4-80+CD11b- cells in the bone marrow (BM) 7 days post-administration of clodronate or PBS-containing liposomes in mice. **(B)** Twenty million BM cells were lysed in RIPA buffer and EPO concentration was assayed by ELISA. **(C)** Total femur cells were flushed and treated with Brefeldin A for 4 hours. Adherent cells were stained with anti-Ter119 Alexa 488 (blue) and anti-F4/80 Alexa 594 (red). Cells were fixed and permeabilized, then stained with anti-EPO Alexa 647 (green) and DAPI (grey). EBI macrophages were identified as F4/80+ cells surrounded by Ter119+ cells. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$.

2.2.3. Impact of Macrophage Depletion with Clodronate Liposomes on Murine Erythropoiesis

Several studies have reported impaired steady state erythropoiesis in mice deprived of macrophages by clodronate liposomes or genetic ablation [3,9]. We compared the impact of one or two injections of clodronate liposomes in mice on hemoglobin and reticulocyte concentrations in peripheral blood. Clodronate was administered once per week, and mice were sacrificed 7 or 14 days later. Blood analysis confirmed comparable drops in hemoglobin concentrations in clodronate-treated mice, when compared to mice receiving PBS-containing liposomes (Figure 3A, $p < 0.05$). Analysis by flow cytometry revealed significant drops in blood CD71+ cells at days 2 and 5 post administration of clodronate liposomes, confirming impaired steady state erythropoiesis (Figure 3B). From day 7 on, the percentages of reticulocytes gradually increased, becoming significantly higher in mice that received a second injection of clodronate liposomes at days 12 and 14 when compared to control mice (Figure 3B). As expected, the enhanced reticulocytosis was accompanied by ~4-fold increases in serum EPO levels at day 14 (Figure 3C, $p < 0.01$), suggesting induction of stress erythropoiesis.

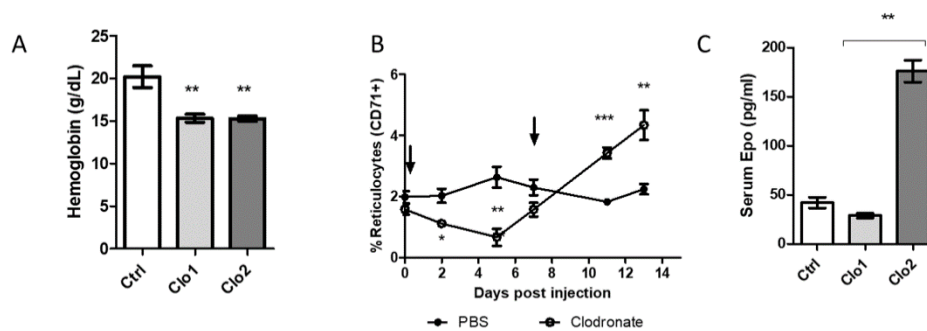


Figure 2.3. Impact of clodronate liposomes on blood hemoglobin, reticulocytes and serum levels of EPO. Macrophages were ablated by a single (1 week length) or two (2 weeks length) injections of clodronate liposomes. **(A)** Hemoglobin levels in peripheral blood were measured with the Drabkin method. **(B)** Percentages of

circulating reticulocytes were quantified in blood with an anti-CD71 antibody. (C) Serum EPO concentrations were determined by ELISA. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

Detailed analysis of erythroid cells was then done with BM and splenic cells, following co-staining with anti-Ter119 and anti-CD71 antibodies and discrimination of Ter119^{high} cells by size and expression of CD71, as initially reported by Liu et al. [10] (see gating strategies in Figure A2). Proerythroblasts (ProE), distinguished as cells with moderate expression of Ter119 and high CD71 expression, dropped significantly in the BM and spleen 7 days after a first clodronate injection (Figure 4A), their percentages being restored at day 14 in the BM and significantly increased in the spleen (Figure 4A). Discrimination of basophilic (EryA) as Ter119^{high}CD71⁺FSC^{high} cells confirmed their reduction in the BM and spleen a week after clodronate administration (Figure 4B). A comparable effect was measured in polychromatic (EryB) erythroblasts (Ter119^{high}CD71⁺FSC^{low} cells), which dropped significantly at day 7 post injection (Figure 4C). Our data indicate complete restoration of ProE and partial restoration of EryA and EryB cells in the BM when serum EPO levels rise, despite persisting low numbers of F4/80⁺CD11b⁻ cells (Figure 4D).

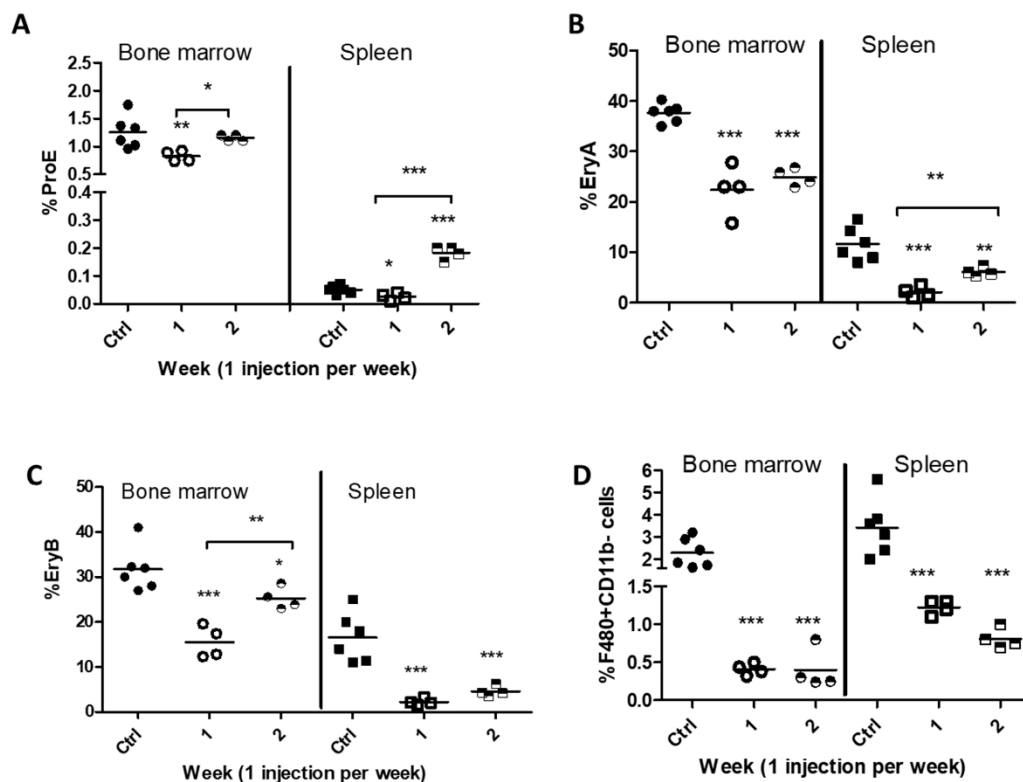


Figure 2.4. Effect of macrophage depletion on bone marrow and splenic erythroid cells. (A) Percentages of proerythroblasts (ProE) in the BM and spleen one (1) or two (2) weeks following administration of clodronate liposomes with respect to control mice that received PBS-containing liposomes. (B) Percentages of polychromatic (EryA) and (C) orthochromatic (EryB) erythroblasts within the Ter119^{high} population in the BM and spleen. (D) Percentages of F4-80+CD11b⁻ cells in the BM and spleen. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

2.2.4. Restoration of Erythropoiesis by Exogenous EPO in Depleted Mice

The data so far presented is indicative of impaired steady state erythropoiesis in mice ablated of macrophages for one week, and induction of a stress response in the spleen if macrophage ablation is sustained for two weeks, characterized by increased percentages of ProE cells and accompanied by a 4-fold increase in blood EPO levels and enhanced reticulocytosis.

Our next objective aimed at assessing the ability of exogenous EPO to restore the deficient erythropoietic response caused by short term depletion of EBI (F4-80+CD11b-) macrophages. For this, three different doses of EPO were administered in mice at day 1 and day 2 following a single clodronate liposome injection. All three doses were physiologically relevant and significantly lower than those used to induce a potent stress response.

As shown in Figures 4 and 5, administration of clodronate liposomes caused significant drops in the ProE, EryA and EryB populations, which are stages expressing the EPO-R, ProE being the most responsive to EPO [10]. At 1 IU, EPO did not reestablish ProE in the BM or spleen (Figure 5A–C), but a 5 IU dose efficiently restored ProE in the BM, and enhanced their production in the spleen of clodronate-treated mice when compared to untreated controls. The 10 IU EPO dose was stimulatory in both organs when compared to naïve mice (Figure 5A). A similar restoration was measured for EryA in the BM and spleen when compared to clodronate-treated mice. With respect to EryB, although their proportion gradually increased in the BM and spleen in correlation with EPO concentrations, complete restoration was not observed. It is important to mention that F4-80+CD11b- cells remained significantly low for all conditions tested (Figure 5D). In agreement with these data, reticulocytosis was restored following administration of 5 IU EPO in clodronate-treated mice and enhanced above control levels by the largest dose tested.

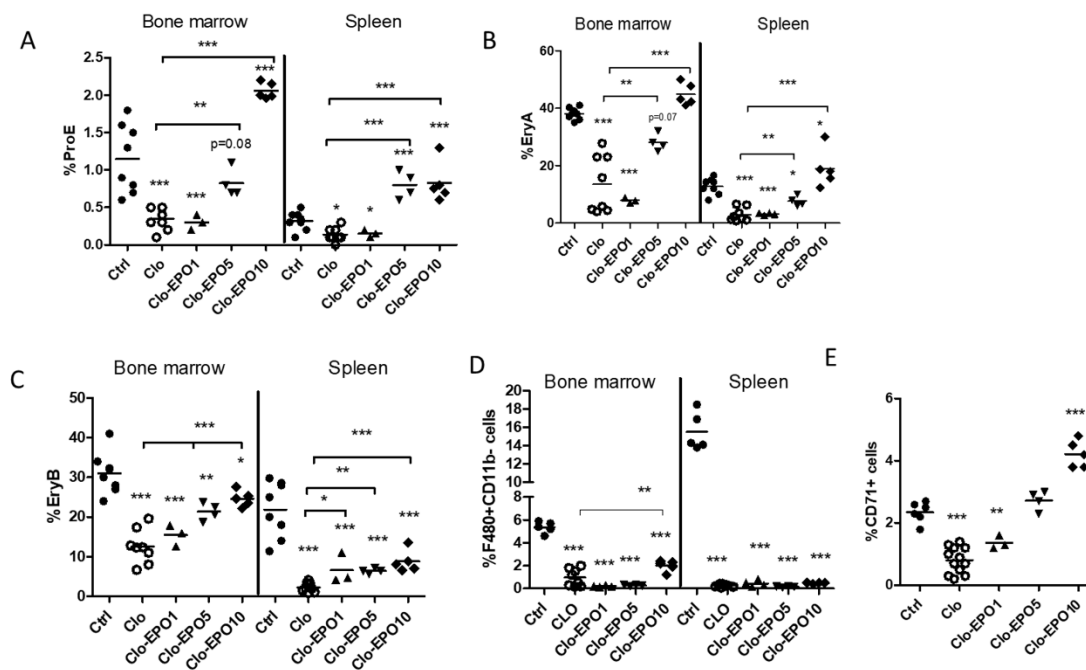


Figure 2.5. Effect of exogenous EPO on bone marrow and splenic erythroblasts populations from mice treated with clodronate liposomes. Proportions of (A) ProE, (B) EryA, and (C) EryB in the bone marrow and the spleen from control (Ctrl), clodronate-treated (Clo) mice, and clodronate-treated mice receiving rHuEPO at 1 IU (Clo-EPO1), 5 IU (Clo-EPO5) or 10 IU (Clo-EPO10) doses. (D) Percentages of F4-80+CD11b⁻ cells in the BM and spleen. (E) Reticulocytes (CD71⁺ cells) in blood at day 4 post-treatment. BALB/c mice were injected with a single dose of clodronate liposomes and treated with rHuEPO 24 and 48 h after. Mice were sacrificed at day 4. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

2.3. Discussion

EPO has been extensively studied in the past years in the context of anemia therapies or erythrocytosis [11–18]. The role of EPO in stress erythropoiesis has been well documented, with renal peritubular cells being the major source for this hormone [19]. While it is accepted that EPO is necessary to maintain homeostatic erythropoiesis [4,20–22], its source under basal conditions has been mainly attributed to the kidney.

Basal erythropoiesis is regulated by the rate of apoptosis of erythroblasts and the elimination of senescent RBC by red pulp macrophages. In steady state conditions, most erythroid progenitors die. During hypoxic or anemic stress, the lack of oxygen is detected by the kidney and EPO production is activated by hypoxia-inducible transcription factors (HIF). The resulting heightened concentrations of EPO allow survival of more progenitors, quickly increasing the production of erythrocytes [4,23].

A study published in 2016 revealed a link between macrophages, apoptosis, and EPO production. Luo et al. demonstrated that sphingosine 1 phosphate (S1P) from apoptotic cells induces EPO production in proximal peritoneal macrophages, which in turn acts in an autocrine manner to promote uptake and elimination of apoptotic cells [8]. These actions are valuable within erythropoietic niches in steady state conditions, first because of the relative elevated rate of apoptotic erythroblasts, and second, because of the important action that EPO has on ProE, EryA and EryB, which are the stages entering apoptosis [10]. It is therefore expected that discrete amounts of EPO, released by central macrophages in response to erythroblast apoptosis, may affect EPO-R expressing erythroblasts in close contact, thus providing survival signals.

To investigate this possibility, we first evaluated the pro-erythropoietic effects of BMDM. Our results indicated that on their own, BMDM sustain differentiation of LSK cells into Ter119⁺ cells, and that this is further enhanced in BMDM preconditioned with media from apoptotic cells. The latter produced more EPO, as confirmed by qRT-PCR and Western Blot. However, unlike the data obtained with peritoneal macrophages by Luo et al. [8], the amounts of EPO released by BMDM were undetectable by ELISA, suggesting that BMDM produce small amounts of this hormone. However, the relative contribution for BMDM-derived EPO on erythropoiesis was confirmed with an EPO neutralizing antibody, which abrogated, although not completely, the pro-erythropoietic action of BMDM conditioned with apoptotic media. An interesting study by Rhodes et al. [24] with splenic macrophages and erythroid cells demonstrated the importance of adherence between macrophages

and erythroblasts on erythroid differentiation. Although addition of EPO was shown to be relevant for the survival of erythroblasts, the presence of macrophages resulted in three-fold increases in the numbers of erythroblasts in culture, demonstrating that factors such as cell adhesion molecules also contribute to these effects.

Having collected evidence linking macrophage-derived EPO with erythropoiesis *in vitro*, we then assessed the impact of macrophage ablation with clodronate-liposomes on steady state BM erythropoiesis. Our first observation was that EPO levels were significantly lower in BM-derived cell lysates from mice ablated of F4/80⁺CD11b⁻ cells for seven days, which suggests that clodronate liposomes eliminate possible sources of EPO in the BM. Considering that no major effects were measured in plasmatic EPO concentrations, the impact of clodronate-liposomes in BM-derived EPO seems independent of systemic down regulation of EPO levels. Second, confocal imagery confirmed intracellular EPO in F4/80⁺ macrophages in closed contact with Ter119⁺ cells in the BM, suggesting that ablation of macrophages maybe a cause of decreased EPO levels in the BM.

In vivo data from clodronate-treated mice showed a common trend in the BM and spleen: early, EPO-R expressing erythroblasts (ProE, EryA and EryB) are the most affected by macrophage depletion. Elimination of macrophages for one week resulted in impaired BM erythropoiesis, as shown by the drops in reticulocyte and hemoglobin concentrations in peripheral blood. If sustained for two weeks, macrophage ablation led to increased levels of EPO in sera as well as enhanced reticulocytosis, indicating induction of a stress response. The spleen was probably involved in the latter, as reflected by rises in ProE and relative restoration of EryA in this organ. The drops in early erythroblastic populations, and the ensuing stress response, may thus be in part attributed to deficient EPO in erythropoietic niches.

A second set of *in vivo* experiments were conducted to evaluate the extent to which early administration of EPO rescued the deficient erythropoiesis in clodronate-treated mice. For this, clodronate-depleted mice were injected with physiologically relevant

doses of rHuEPO (1 IU, 5 IU and 10 IU per mice). Homeostatic EPO levels are around 0.010 IU/mL of blood. During severe stress (like anemia or hypoxia) kidney peritubular cells heighten EPO concentrations to as high as 10 IU/mL. [16,20]. By injecting a maximum of 10 IU per mouse, we ensured that our treatment would not go beyond physiological EPO levels.

The BM and spleen showed complete restoration of ProE and EryA populations after treatment with 10 IU rHuEPO whereas EryB were significantly restored. A probable explanation for incomplete recovery in EryB may be the time point at which mice were sacrificed for analysis. We did not assess the numbers of Burst forming units-erythroid (BFU-E) or Colony forming units-erythroid cells (CFU-E). About 48 h are presumed to be required for a CFU-E to differentiate into an EryB [25,26]. The total length of the EPO treatment being of 72 h, new EPO-stimulated CFU-E might be short on time to get to that stage, especially in conditions deprived of macrophages.

An additional interesting point concerns EBIs on their own. We did not assess the extent to which EBI are restored in EPO-treated mice deprived of macrophages, which is an interesting issue that may involve cells other than macrophages or special adaptations to poor macrophage conditions.

The fact that soluble factors derived from apoptotic cells enhance the ability of BMDM to support erythropoiesis (also confirmed with S1P-conditioned BMDM, data not shown) allows for proposing the existence of a fine-tuned mechanism, triggered and sustained by an excessive production of erythroblasts *in vivo*. The fact that significantly lower rates of apoptotic Ter119+CD71+ cells were measured in clodronate-treated mice, which generate significantly lower numbers of erythroblasts, reinforces the important association between erythroblast numbers and apoptosis (Supplementary Figure S2). In this respect, EPO is not the sole regulator of erythroblast apoptosis. An additional element concerns the interactions between the cell-death receptor Fas (CD95) and its ligand (Fas-L, CD95L, CD178). Activation of Fas trigger apoptosis of cells expressed through the caspase-3 apoptotic complex. [27] This

complex plays an important role in terminal erythroid differentiation and EPO prevents apoptosis downstream of the caspase activation [27,28]. Since these two proteins are expressed by early erythroblasts [10] a fast and massive drop in EryA and EryB numbers, would decrease the density of the erythroid cell population, reducing Fas-FasL interaction, and thus, decreasing apoptosis.

Certain aspects of our study, especially those concerning the structure of EBI in macrophage-deficient conditions, would be interesting to further explore. The differences between splenic and BM EBI, which are possibly linked to different signals operating during the murine stress response in the spleen, are also an interesting subject that has been extensively explored and has been discussed in excellent reviews [2,23].

In conclusion, we have shown that EBI macrophages are an *in-situ* source of EPO for erythroblasts, and that this EPO contributes to the regulation of homeostatic erythropoiesis. We propose the existence of a mechanism by which EBI macrophages secrete EPO in response to apoptotic erythroblasts, which is in turn controlled by the numbers of erythroid precursors generated.

2.4. Materials and Methods

2.4.1. In Vitro Experiments

2.4.1.1. Generation of BMDM

BMDMs were generated from non-adherent bone marrow cell suspension from BALB/c mice. Bone marrow was flushed from the femur and tibia by centrifugation 5 min at $3000\times g$ in a microcentrifuge, pooled and cultured for 4 h to eliminate differentiated macrophages. Non-adherent cells were counted and plated in a 96 well plate at a density of 0.375×10^6 cells per mL in 0.2 mL of DMEM supplemented with 10% FBS, 100 IU/mL penicillin/streptomycin and 20% L929-enriched medium. Cells

were cultured for 7 days with a change of media on day 3 to generate a pure BMDM population.

2.4.1.2. Generation of Apoptotic Splenocyte, Apoptotic Media and Conditioning of BMDMs

Whole splenocytes were harvested from spleen of BALB/c mice by mechanical disruption. Whole spleen was plated in tissue culture treated flask (Sarstedt, Newton, MA) at a density of 4×10^6 cells/mL for 4 h and non-adherent cells were transferred into a new vessel. Natural apoptosis was induced by culture for 48 h and verified by Annexin V/7AAD apoptosis detection kit (Biolegend, San Diego, CA). For conditioning with apoptotic media, the supernatant was filtered using a 0.22-micron filter and used as is. For conditioning with apoptotic splenocytes, cells were counted and put in co-culture with BMDMs at a ratio of 5 apoptotic cells per BMDM.

2.4.1.3. Hematopoietic Stem Cells Co-Culture with BMDM

Differentiated BMDMs were conditioned with apoptotic media overnight. The following day, bone marrow from a BALB/c mouse was harvested and hematopoietic stem cells were enriched by negative selection (Stemcell technologies, Vancouver, Canada). Elimination of Ter119⁺ cells was confirmed by FC. BMDMs were washed three times with PBS and LSKs were added to the wells at a ratio of 4 LSK cells per BMDM in an erythropoietic media modified from Shuga et al. (2007) [30], consisting of IMDM (Wisent, Montreal, Canada) supplemented with FBS 10%, P/S 50U/mL (Sigma Aldrich, Oakville, Canada), holotransferin 200 ug/mL (SigmaAldrich), insulin 10ug/mL (Sigma Aldrich), β -mercaptoethanol 10^{-4} M (Sigma Aldrich), dexamethasone 10^{-5} M (Vetoquinol, Lavaltrie, Canada), SCF 10ng/mL (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and IGF-1 (R&D Systems). After 5 days of co-culture, non-adherent cells were analyzed by FC for erythroblastic engagement using anti-CD71 FITC, anti-Ter119 APC and 7AAD (Biolegend). EPO neutralization used the rat IgG2a

monoclonal anti-EPO antibody, clone 148,436 (Invitrogen) at a 0.75 ug/mL concentration during the five days of culture.

2.4.1.4. Analysis of EPO Transcript by RT-qPCR

BMDMs were conditioned with apoptotic media or DMEM culture media for 4 h. Afterwards, total RNA was obtained using the Aurum Total RNA mini kit (Bio-Rad, Mississauga, Canada) and 1 ug was turned into cDNA using iScript reverse transcription supermix for RT-qPCR (Bio-Rad). qPCR was performed with 50 ng of cDNA in an ABI7300 system (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) with 30 s of activation at 95 °C followed by a 40 cycles 2 step program of 15 s denaturation at 95 °C and 60 s of annealing. SsoAdvanced universal SYBR Green supermix was used as a probe with primePCR assay primers for EPO (Bio-Rad #10025636) and GADPH (Bio-Rad #10025636). A meltcurve analysis was done afterward to ensure single product amplification. Expression of EPO was normalized to GADPH and analysed using 7300 system software (Applied Biosystems).

2.4.1.5. EPO Detection by Western Blot

BMDMs were conditioned overnight with apoptotic cells or DMEM culture media. The next day, BMDMs were washed three times with PBS and were incubated with Brefeldin A (Biolegend) for 4 h. Afterwards, cells were lysed with RIPA buffer (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, NP40 1%, sodium deoxycholate 0.5%, SDS 0.1%). Protein concentration was determined with DC protein assay (Bio-Rad) and 10 µg of total protein was added per wells for SDS-PAGE. Transfer was performed with transblot turbo (Bio-Rad) using manufacturer standard semi-dry transfer protocol onto PVDF membrane (Millipore, Oakville, Canada). Membrane was blocked overnight with 3% BSA in TBS-T and probed with 1:1000 anti-EPO (Santa Cruz, Dallas, TX, USA, cat#SC-5290) overnight at 4 °C. After revelation, the membrane was stripped, blocked, and probed with 1:50,000 anti-beta actin (Sigma Aldrich) for 1 h at room temperature.

Femto super signal ECL (Pierce, Waltham, MA, USA) was used as substrate and revelation was captured using the Chemidoc MP imaging system (Bio-Rad). Densitometry analysis were performed using image lab software (Bio-Rad) and EPO expression was normalized to beta-actin.

2.4.2. In Vivo Assays

2.4.2.1. Biological Model

For all in vivo experiments, 4 to 6-week-old female BALB/c mice were obtained from Charles River Laboratories (Canada). All protocols using animals were approved by the Animal Protection Institutional Comity (CIPA) and followed the Canadian Council on Animal Care (CCAC) guidelines. (Protocols 01518-944, 01 May 2018 and 0519-944, 01 May 2019).

2.4.2.2. Short and Long-Term Macrophage Depletion

Macrophage depletion was induced by intravenous (iv) injection of 150 μ L clodronate (20 mg/mL) liposomes (Clophosome-A, FormuMax, Sunnyvale, CA, USA). Control mice received PBS-containing anionic liposomes prepared by the same company. Two experimental groups were studied: 1-week (group 1, $n = 10$) and 2-weeks (group 2, $n = 4$) depletion length. Liposomes were injected on day 0. Mice from the first group were sacrificed on day 7. Group 2 mice received a second clodronate injection on day 7 and were sacrificed on day 14.

2.4.2.3. Determination of EPO Concentration in Bone Marrow from Clodronate Treated Mice by ELISA

Whole bone marrow was recovered from naïve or clodronate treated BALB/c mice. Forty million (4×10^6) BM cells were lysed in 200 μ L RIPA buffer and EPO concentration was determined by ELISA (Biolegend, cat#442707).

2.4.2.4. Restoration of Macrophage-Depleted Mice Erythropoiesis by EPO

The restoration of the erythropoiesis in macrophage depleted mice was studied by supplying exogenous EPO (R&D systems, cat#287-TC-500). Animals received an intravenous injection of clodronate or PBS-containing liposomes on day 0, followed by subcutaneous (sc) injections of recombinant human EPO (rhuEPO) or PBS on days 1 and 2. Doses of EPO between 50 and 500 IU/Kg body weight, corresponding to 1 IU, 5 IU and 10 IU per mice, were administered, diluted in PBS. Four to five mice were used for each dose, with equal numbers of naïve, EPO-treated, and clodronate-treated animals. Animals were sacrificed on day 4.

2.4.2.5. Flow Cytometry

BM was extracted from the femur and tibia by centrifugation for 5 min at $6500 \times g$. Spleen cells were prepared by gentle crushing in RPMI. Cells were counted and 5×10^5 cells were stained in PBS. For analysis of the macrophage population, the following antibodies were used: anti-CD11b (clone M1/70, Biolegend, cat#101206) conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-F4/80 (clone BM8, StemCell Technologies, cat#60027PE) conjugated with phycoerythrin (PE), 7AAD (Biolegend, cat#420404). For analysis of the erythroblastic population and of its apoptosis, anti-CD71 FITC (clone R17217, Biolegend, cat#113806), anti-Ter119 PE (clone TER119, Biolegend, cat#116208), 7AAD and Annexin V (Biolegend, cat#640920 conjugated with Allophycocyanin (APC) were used. Cells were stained on ice and protected from light for 1 h. Data acquisition was made with a BD Accuri C6 (BD Biosciences, Franklin Lake, NJ, USA). A gate excluding debris was made with a FSC-SSC dot plot, and 10,000 events inside that gate were collected from each sample. Data was analyzed with the BD Accuri C6 Software. Gating strategies are available in the supplementary data (Figures A1 and A2).

2.4.3. Detection of EBI Macrophage Intracellular EPO by IF and Confocal Imagery

BM cells were extracted from naïve BALB/c mice aged 4–8 weeks. Briefly, femurs were flushed with 3 mL of IMDM through 20 G needles, washed and collected by sedimentation in RPMI+ 30% FBS. Cells were seeded on an 8-well slide (Ibidi, Gräfelfing, Germany, cat#80826) and treated with Brefeldin A for 4 h. Non-adherent cells were removed, and the remaining cells were stained with anti-F4/80 Alexa fluor 596 (Clone BM8, Biolegend, cat#123140) and anti-Ter119 Alexa fluor 488 (clone TER119, StemCell Technologies, cat#60033AD). Cells were fixed and permeabilized with the RnD systems Fix-Perm kit (cat#FC012-100) and stained for intracellular EPO with anti-EPO Alexa fluor 647 (clone B-4, Santa Cruz, cat#SC-5290-AF647). Finally, cells were stained with DAPI (Santa Cruz) and analyzed by confocal microscopy using a Nikon A1R plus confocal microscope.

2.4.4. Statistical Analysis

All except one statistical analysis were performed with R version 3.6.2. Proportions of populations were analyzed with generalized linear models with a quasibinomial family, which best suits the binomial distribution of the data. Cell counts were analyzed with a generalized linear model with a quasipoisson family, which best suits the Poisson distribution of count data. When applicable, two models were used: (1) comparison of every treatment against the control group and (2) comparison of every treatment against the clodronate-depleted group. Hemoglobin was analyzed with a linear model. EPO in the serum and lysates was analyzed with GraphPad Prism 5 using a one-way ANOVA.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: Gating strategies for exclusion of debris and dead cells and quantification of erythroid cells; Figure S2: Strategy to evaluate apoptotic

cells in the bone marrow and spleen by flow cytometry; Figure S3: Assessment of total Ter119+ CD71+ cells and apoptosis levels in control mice and in mice treated with clodronate liposomes.

Author Contributions: Conceptualization, G.P.-D. and T.S.; methodology, G.P.-D., P.S.-L., H.R. and T.S.; software, G.P.-D.; validation, T.S.; formal analysis, G.P.-D., T.S.; investigation, G.P.-D., P.S.-L., H.R., and T.S.; resources, T.S.; data curation, G.P.-D. and T.S.; writing—original draft preparation, G.P.-D.; writing—review and editing, G.P.-D. and T.S.; visualization, T.S.; supervision, T.S.; project administration, T.S.; funding acquisition, T.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC), grant 311589. G.P.-D. was the recipient of an Alexander Graham Bell Canada Graduate Scholarship (CGS-M) from NSERC. P.S. was the recipient of an undergraduate student research awards (USRA) from NSERC.

Acknowledgments: We would like to express special thanks to Denis Flipo for his valuable support and expertise in confocal microscope imagery.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Abbreviations

EPO	Erythropoietin
EBI	Erythroblastic island
BM	Bone marrow
BMDM	Bone marrow derived macrophages
EPO-R	Erythropoietin-receptor
FC	Flow cytometry

IF	Immunofluorescence
WB	Western Blot
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
qrtPCR	Quantitative reverse-transcriptase polymerase chain-reaction
rHuEPO	Recombinant human erythropoietin
S1P	Sphingosine-1-phosphate
IV	Intravenous
SC	Subcutaneous
BMDM	Bone marrow-derived macrophage
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide gel electrophoresis

2.5. References

1. Bessis, M. Erythroblastic island, functional unity of bone marrow. *Rev. d'hematologie* **1958**, *13*, 8–11.
2. Chasis, J.A.; Mohandas, N. Erythroblastic islands: Niches for erythropoiesis. *Blood* **2008**, *112*, 470–478, doi:10.1182/blood-2008-03-077883.
3. Chow, A.; Huggins, M.; Ahmed, J.; Hashimoto, D.; Lucas, D.; Kunisaki, Y.; Pinho, S.; Leboeuf, M.; Noizat, C.; Van Rooijen, N.; et al. CD169+ macrophages provide a niche promoting erythropoiesis under homeostasis and stress. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 429–436, doi:10.1038/nm.3057.
4. Dzierzak, E.; Philipsen, S. Erythropoiesis: Development and Differentiation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2013**, *3*, a011601, doi:10.1101/cshperspect.a011601.
5. Kawane, K. Requirement of DNase II for Definitive Erythropoiesis in the Mouse Fetal Liver. *Science* **2001**, *292*, 1546–1549, doi:10.1126/science.292.5521.1546.
6. Sadahira, Y.; Mori, M. Role of the macrophage in erythropoiesis. *Pathol. Int.* **1999**, *49*, 841–848, doi:10.1046/j.1440-1827.1999.00954.x.

7. Rich, I.N.; Vogt, C.; Pentz, S. Erythropoietin gene expression in vitro and in vivo detected by in situ hybridization. *Blood Cells* **1988**, *14*, 505–520.
8. Luo, B.; Gan, W.; Liu, Z.; Shen, Z.; Wang, J.; Shi, R.; Liu, Y.; Liu, Y.; Jiang, M.; Zhang, Z.; et al. Erythropoietin Signaling in Macrophages Promotes Dying Cell Clearance and Immune Tolerance. *Immunity* **2016**, *44*, 287–302, doi:10.1016/j.immuni.2016.01.002.
9. Ramos, P.; Casu, C.; Gardenghi, S.; Breda, L.; Crielaard, B.J.; Guy, E.; Marongiu, M.F.; Gupta, R.; Levine, R.L.; Abdel-Wahab, O.; et al. Macrophages support pathological erythropoiesis in polycythemia vera and β -thalassemia. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 437–445, doi:10.1038/nm.3126.
10. Liu, Y.; Pop, R.; Sadegh, C.; Brugnara, C.; Haase, V.H.; Socolovsky, M. Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. *Blood* **2006**, *108*, 123–133, doi:10.1182/blood-2005-11-4458.
11. Chang, K.-H.; Stevenson, M.M. Comparison of murine Epo ELISA and Epo bioassays in detecting serum Epo levels during anemia associated with malaria infection. *J. Immunol. Methods* **2002**, *262*, 129–136, doi:10.1016/s0022-1759(02)00012-1.
12. Millot, S.; Andrieu, V.; Letteron, P.; Lyoumi, S.; Hurtado-Nedelec, M.; Karim, Z.; Thibaudeau, O.; Bennada, S.; Charrier, J.-L.; Lasocki, S.; et al. Erythropoietin stimulates spleen BMP4-dependent stress erythropoiesis and partially corrects anemia in a mouse model of generalized inflammation. *Blood* **2010**, *116*, 6072–6081, doi:10.1182/blood-2010-04-281840.
13. Morceau, F.; Dicato, M.; Diederich, M. Pro-Inflammatory Cytokine-Mediated Anemia: Regarding Molecular Mechanisms of Erythropoiesis. *Mediat. Inflamm.* **2009**, *2009*, 1–11, doi:10.1155/2009/405016.
14. Winterbourn, C.C. Oxidative denaturation in congenital hemolytic anemias: The unstable hemoglobins. *Semin. Hematol.* **1990**, *27*, 41–50.

15. Zeigler, B.; Vajdos, J.; Qin, W.; Loverro, L.; Niss, K. A mouse model for an erythropoietin-deficiency anemia. *Dis. Model. Mech.* **2010**, *3*, 763–772, doi:10.1242/dmm.004788.
16. Jelkmann, W. Regulation of erythropoietin production. *J. Physiol.* **2011**, *589*, 1251–1258, doi:10.1113/jphysiol.2010.195057.
17. Jelkmann, W. Molecular Biology of Erythropoietin. *Intern. Med.* **2004**, *43*, 649–659, doi:10.2169/internalmedicine.43.649.
18. Wagner, K.F.; Katschinski, D.M.; Hasegawa, J.; Schumacher, D.; Meller, B.; Gembruch, U.; Schramm, U.; Jelkmann, W.; Gassmann, M.; Fandrey, J. Chronic inborn erythrocytosis leads to cardiac dysfunction and premature death in mice overexpressing erythropoietin. *Blood* **2001**, *97*, 536–542, doi:10.1182/blood.v97.2.536.
19. Koury, S.T.; Koury, M.J.; Bondurant, M.C.; Caro, J.; Graber, S.E. Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization: Correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration. *Blood* **1989**, *74*, 645–651.
20. Elliott, S.G.; Foote, M.; Molineux, G. *Erythropoietins, Erythropoietic Factors, and Erythropoiesis: Molecular, Cellular, Preclinical, and Clinical Biology*; Springer Science & Business Media: Berlin/Heidelberg, Germany, 2009.
21. Gregoli, P.A.; Bondurant, M.C. The roles of Bcl-XL and apopain in the control of erythropoiesis by erythropoietin. *Blood* **1997**, *90*, 630–640.
22. Lee, R.; Kertesz, N.; Joseph, S.B.; Jegalian, A.; Wu, H. Erythropoietin (Epo) and EpoR expression and 2 waves of erythropoiesis. *Blood* **2001**, *98*, 1408–1415, doi:10.1182/blood.v98.5.1408.
23. Paulson, R.F.; Shi, L.; Wu, D.-C. Stress erythropoiesis: New signals and new stress progenitor cells. *Curr. Opin. Hematol.* **2011**, *18*, 139–145, doi:10.1097/moh.0b013e32834521c8.

24. Rhodes, M.M.; Kopsombut, P.; Bondurant, M.C.; Price, J.O.; Koury, M.J. Adherence to macrophages in erythroblastic islands enhances erythroblast proliferation and increases erythrocyte production by a different mechanism than erythropoietin. *Blood* **2008**, *111*, 1700–1708, doi:10.1182/blood-2007-06-098178.
25. Chen, K.; Liu, J.; Heck, S.; Chasis, J.A.; An, X.; Mohandas, N. Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 17413–17418, doi:10.1073/pnas.0909296106.
26. Hattangadi, S.M.; Wong, P.; Zhang, L.; Flygare, J.; Lodish, H.F. From stem cell to red cell: Regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. *Blood* **2011**, *118*, 6258–6268, doi:10.1182/blood-2011-07-356006.
27. Carlile, G.W.; Smith, D.H.; Wiedmann, M. Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. *Blood* **2004**, *103*, 4310–4316, doi:10.1182/blood-2003-09-3362.
28. De Maria, R.; Zeuner, A.; Eramo, A.; Domenichelli, C.; Bonci, D.; Grignani, F.; Srinivasula, S.M.; Alnemri, E.S.; Testa, U.; Peschle, C. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nat. Cell Biol.* **1999**, *401*, 489–493, doi:10.1038/46809.
29. Shuga, J.; Zhang, J.; Samson, L.D.; Lodish, H.F.; Griffith, L.G. In vitro erythropoiesis from bone marrow-derived progenitors provides a physiological assay for toxic and mutagenic compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 8737–8742, doi:10.1073/pnas.0701829104.

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

2.6. Supplementary figures.

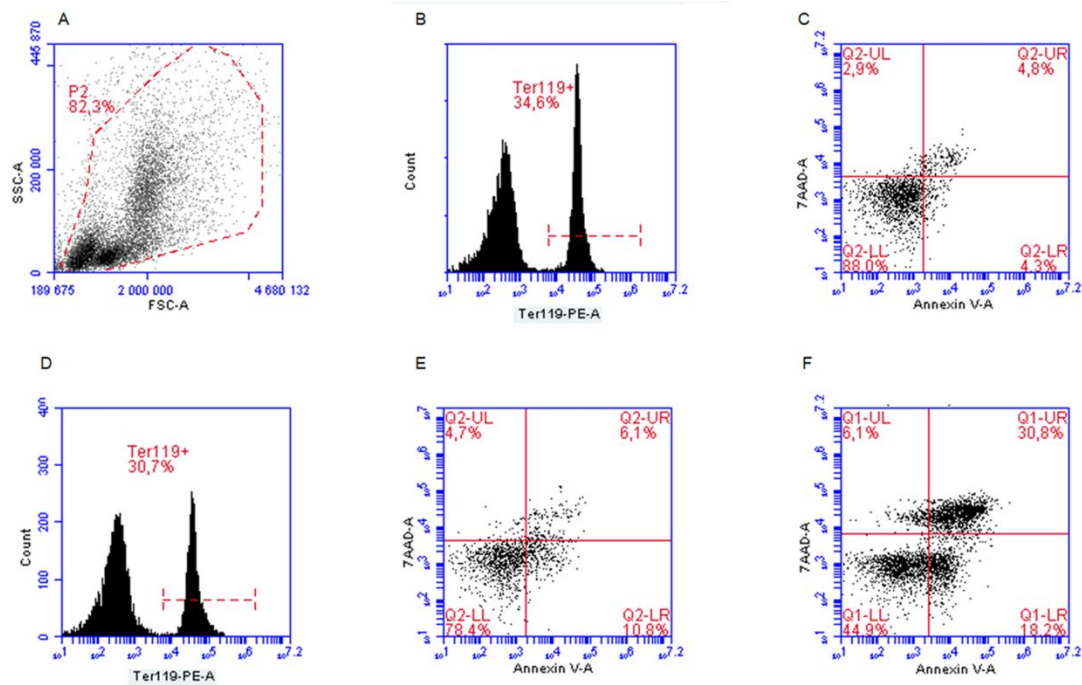


Figure 2.6. Strategy to evaluate apoptotic cells in the bone marrow and spleen by flow cytometry. Bone marrow and splenic cells were stained with anti Ter119 antibody, Annexin V and 7AAD. (A) Gate to exclude debris. (B) Selection of Ter119⁺ cells in the BM and (C) assessment of Annexin V⁺ and Annexin V⁺7AAD⁺ cells within BM Ter119⁺ cells. (D) Selection of Ter119⁺ in the spleen and (E) analysis the percentages of annexin V⁺ and annexinV⁺7AAD⁺ cells within Ter119⁺ cells in the spleen. (F) Splenic apoptotic erythroblasts following 48 hours in culture; supernatants from these cells were used to condition BMDM prior to their co-culture with LSK cells for evaluation of pro-erythropoietic activity.

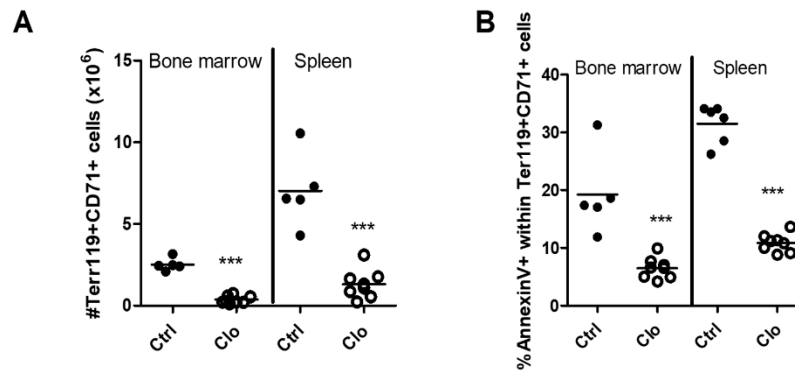


Figure 2.7. Assessment of total Ter119+ CD71+ cells and apoptosis levels in control mice and in mice treated with clodronate liposomes. (A) Compilation of Ter119+CD71+ cell numbers in the BM and spleen from control (Ctrl) and clodronate-treated (Clo) mice one week after injection of liposomes; significantly lower numbers of Ter119+ cells are found in mice ablated of macrophages. (B) The percentages of apoptotic annexin V+ Ter119+CD71+ cells significantly decreased in the BM and spleen from clodronate treated mice. *** $P < 0.001$.

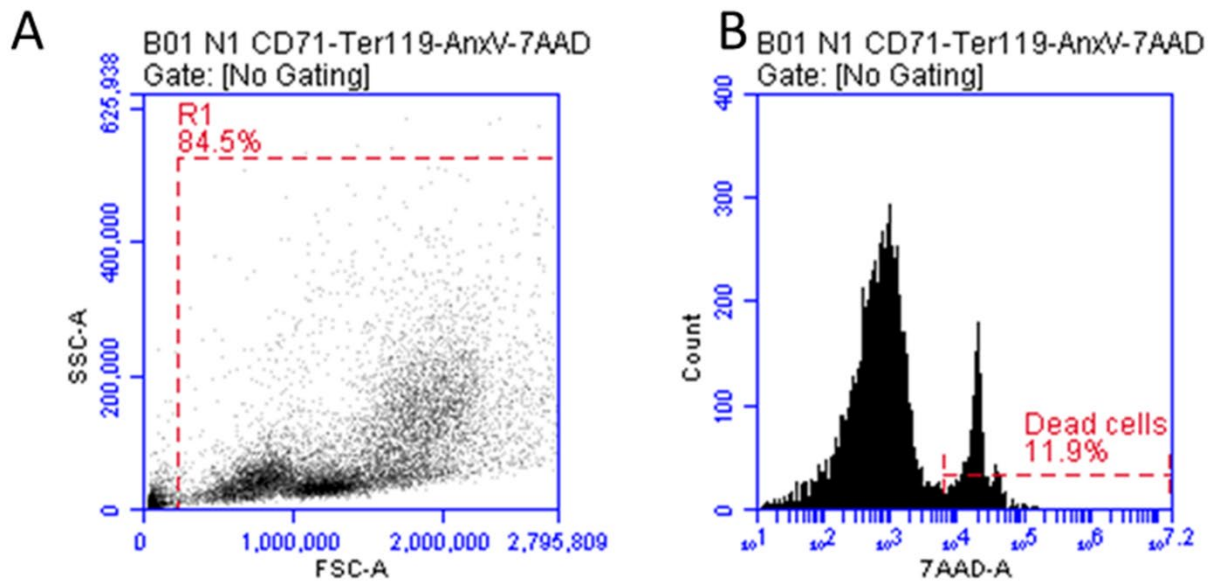


Figure 2.8. Gating strategies for the exclusion of debris and dead cells. (A) A gate was created broadly to include cells but exclude debris. For each sample, 10 000 events were collected inside this gate. (B) 7AAD⁺ cells were selected on a histogram plot for exclusion in later analysis.

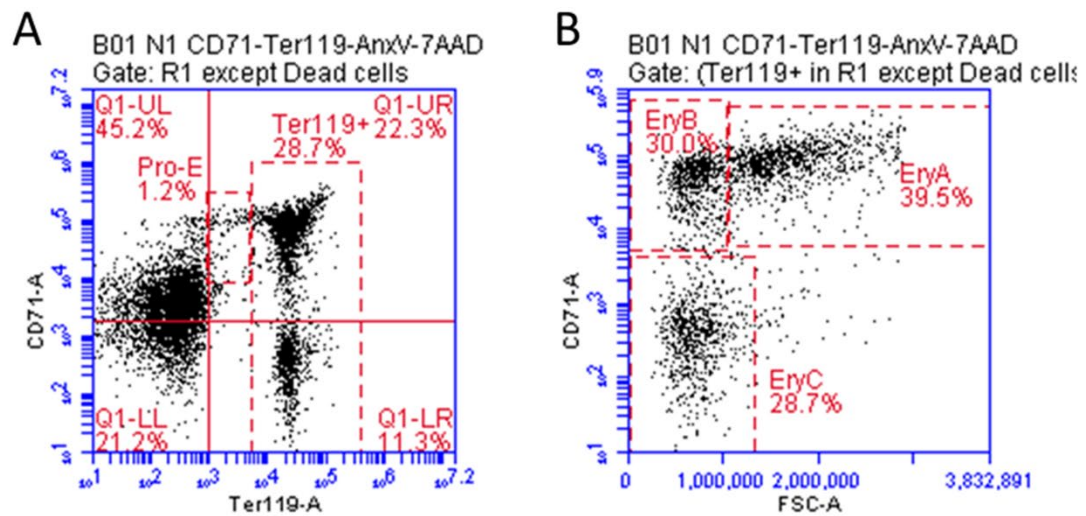


Figure 2.9. Gating strategies for identification of ProE, EryA, EryB and EryC. (A) Live cells were analyzed by expression of Ter119 and CD71. CD71^{high}Ter119^{med} cells were identified as proerythroblasts (ProE). A gate was created to select all Ter119^{high} cells. (B) Ter119^{high} cells were analyzed by size (FSC) and expression of CD71. EryA were identified as CD71^{high}FSC^{high}, EryB as CD71^{high}FSC^{low} and EryC as CD71^{low}FSC^{low}.

CHAPITRE III

RECHERCHE NON-PUBLIÉE : ÉTUDE COMPARATIVE DES RÉPONSES INDUITES PAR L'EPO DANS LA MOELLE OSSEUSE ET LA RATE CHEZ LA SOURIS

3.1. Introduction

Tel que mentionné précédemment, chez l'humain, l'érythropoïèse a principalement lieu dans la MO. Une érythropoïèse splénique peut cependant avoir lieu lors de certaines pathologies.^{1; 16} Lors d'une anémie ou d'une hypoxie, le manque d'oxygène détecté par les reins mène à une augmentation des niveaux d'EPO sériques.^{1; 12} La hausse en EPO permet la survie d'un plus grand nombre de progéniteurs érythropoïétiques et augmente rapidement le nombre d'érythrocytes en circulation.¹⁶ Dans des cas de stress élevé, la stimulation de l'érythropoïèse mène à une hyperplasie de la MO, et il a été suggéré que lors de certaines pathologies chroniques, une résorption osseuse peut avoir lieu afin de générer l'espace nécessaire.⁶⁴ Chez la souris, l'EPO mène à une migration de progéniteurs de stress et de macrophages de la MO vers la rate, pour optimiser la production d'érythrocytes.⁵¹

La rate est un organe qui, en condition basale, contribue modestement à l'érythropoïèse homéostatique de la souris.⁵ Le fait que la hausse systémique en EPO en réponse à l'hypoxie ou l'anémie stimule efficacement l'érythropoïèse splénique, suggère que les précurseurs de la MO et la rate répondent distinctivement à l'EPO, et ont des sensibilités distinctes pour cette hormone. Dans la perspective de comparer les

réponses de ces deux organes, des groupes de souris ont été traitées avec des doses d'EPO de 2.5 et 5 UI/souris. Nous avons analysé les proportions des cellules Ter119⁺CD71⁺ (érythroblastes immatures) ainsi que leur degré d'apoptose, en intégrant aussi les expériences réalisées dans le contexte d'ablation de macrophages et la réplétion par l'EPO, pour mieux comparer ces deux organes.

3.2. Matériel et méthodes

3.2.1. Matériel biologique

Toutes les expériences ont été effectuées chez des souris BALB/c femelles âgées de 4 à 6 semaines. Les animaux utilisés provenaient de l'élevage de *Charles Rivers* (Canada).

3.2.2. Injections d'EPO

L'effet de l'EPO sur la rate et la MO a été évalué en effectuant des injections sous-cutanée (SC) d'EPO recombinante Humaine (rHuEPO, RnD) diluée dans du PBS. Deux doses ont été étudiées : une dose moyenne (2.5 UI/souris) et élevée (5 UI/souris). Pour chaque groupe, 6 individus traités et 6 témoins ont été étudiés (n = 6 pour chaque groupe). Les doses et la voie d'injection ont été sélectionnées à la suite d'une revue de littérature exhaustive sur l'utilisation d'EPO chez la souris. Chaque souris a reçu deux doses d'EPO à 24h d'intervalle (jour 0 et jour 1). Les animaux ont été sacrifiés 48h après avoir reçu la dernière dose (jour 3).

3.2.3. Suivi de l'érythropoïèse

Des mesures d'hémoglobine et de réticulocytes dans le sang périphérique ont été prises à chaque jour afin d'évaluer l'effet de l'EPO sur l'érythropoïèse des souris. Les niveaux d'hémoglobine ont été mesurés par spectrophotométrie. Brièvement, du sang

périphérique a été dilué dans du réactif de Drabkin, puis mis dans une plaque ELISA et lu au lecteur de plaque à 480 nm. Le taux de réticulocytes en circulation a été évalué par analyse cytofluorométrique de sang périphérique marqué avec un anticorps anti-CD71 couplé à du FITC.

3.2.4. Cytofluorométrie

Les cellules de MO des fémurs et tibias des souris ont été extraites en centrifugeant les os nettoyés dans des eppendorfs contenant du RPMI. Les cellules de rate ont été récoltées en écrasant les organes dans un pétri contenant du RPMI. Les cellules ont été comptées à l'hémacytomètre et 5×10^5 cellules/organe de chaque souris ont été prélevées pour chacun des 5 marquages à effectuer. Les cellules ont été marquées avec les anticorps suivants :

1. Témoin non-marqué
2. Analyse de la composition des populations et de l'apoptose : CD71-FITC, Ter119-PE, 7AAD, Annexine V APC
3. Analyse des populations de macrophages : CD11b-FITC, F4/80-PE, 7AAD, VCAM-1 APC
4. Analyse de l'expression de Fas : CD71-FITC, Fas-PE, 7AAD, Ter119-APC
5. Analyse de l'expression de Fas-L : CD71-FITC, Fas-L-PE, 7AAD, Ter119-APC

Pour chaque marquage, 10 000 événements ont été récoltés au BD Accuri C6, après exclusion des débris cellulaires et des cellules 7AAD⁺ (sauf pour le marquage 2, le 7AAD étant nécessaire à l'analyse de l'apoptose). Les stratégies d'analyse sont disponibles en annexe.

3.2.5. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été menées avec le logiciel R, version 3.6.2. Pour les données de proportion, des modèles linéaires généralisés (*Generalized Linear*

Model, GLM) avec distribution quasibinomiale ont été bâtis. Les données de comptes ont été testées avec des GLM et une distribution quasipoisson. Pour les données d'hémoglobine, un modèle linéaire à distribution normale a été sélectionné. Dans tous les cas, les différents traitements d'EPO ont été comparés au groupe contrôle.

3.3. Résultats

Afin d'étudier les différences entre l'érythropoïèse de la MO et de la rate, nous avons injecté des doses d'EPO croissantes à des souris. Pour évaluer le taux d'érythropoïèse effective, nous avons mesuré les réticulocytes et l'hémoglobine dans le sang périphérique. Le traitement à 5 UI d'EPO a augmenté le pourcentage de réticulocytes en circulation à partir de 48h comparé aux souris naïves (Figure 3.1 A, 48h : $P < 0.01$, 72h : $P < 0.001$), indiquant la stimulation de l'érythropoïèse. Le taux de réticulocytes en circulation chez les souris contrôles était variable et se situait généralement entre 0.5 et 1.5%. Bien que les taux de réticulocytes des souris traitées à l'EPO n'augmentent pas au-delà des valeurs observées chez les souris naïves, ils se distinguent par leur tendance à la hausse, uniforme entre les individus. Nous avons rencontré des problèmes

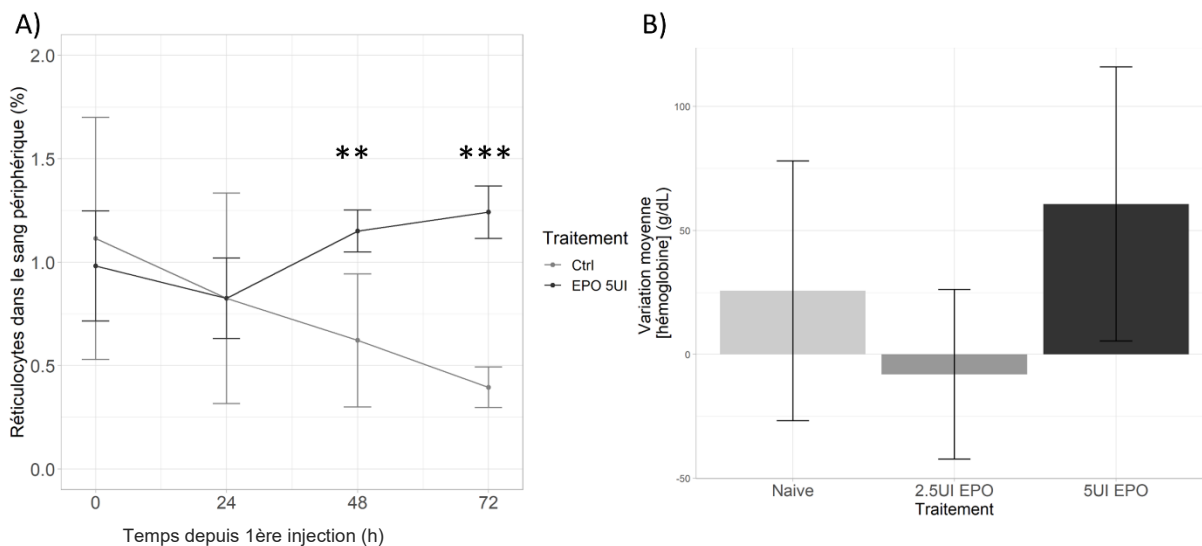


Figure 3.1 – Effet de l'EPO sur le taux de réticulocytes et l'hémoglobine dans le sang périphérique

A) Taux de cellules CD71⁺ et B) variation de la concentration d'hémoglobine (g/dL) dans le sang périphérique de souris BALB/c traitées à l'EPO. *** = $P < 0.001$, ** = $P < 0.01$. Ctrl = Naive.

avec les lectures cytofluorométriques des réticulocytes pour le traitement à 2.5 UI d'EPO et pour cette raison, les données n'ont pas été considérées. Les mesures

d'hémoglobines présentées sont les variations moyennes observées entre le jour 0 et le jour 3 pour chaque groupe. Une grande variation entre les individus a rendu ces mesures peu informatives (Figure 3.1 B).

Nous avons évalué par cytofluorométrie les proportions de cellules Ter119⁺ et des trois stades d'érythroblastes (EryA, EryB et EryC) dans la MO et la rate des souris traitées à l'EPO. Dans la MO, l'EPO n'a causé une augmentation de cellules Ter119⁺ qu'avec la dose de 5 UI (Figure 3.2 A). Cette augmentation était accompagnée d'une diminution des EryC, les érythroblastes les plus matures, suggérant que la hausse du pourcentage de cellules Ter119⁺ serait probablement attribuée aux EryA et EryB. C'est l'effet constaté pour les EryA, mais le taux d'EryB s'est plutôt retrouvé à la baisse. La tendance est plus claire dans la rate (Figure 3.2 B). Les proportions de Ter119⁺ augmentent de façon très significative à partir de 2.5 UI ($P < 0.001$). L'analyse détaillée des stades d'érythroblastes a révélé une hausse des EryA et EryB pour ces groupes ($P < 0.001$), accompagnée d'une diminution de la proportion d'EryC, qui se sont retrouvés en sous-nombre après le traitement ($P < 0.001$).

Finalement, nous avons analysé les taux d'apoptose des populations d'érythroblastes afin d'expliquer la variation dans la population. L'EPO étant une hormone anti-apoptotique, nous nous attendions à observer une diminution de l'apoptose chez les souris traitées. C'est le résultat obtenu à 2.5 UI dans la MO (Figure 3.3 A). Un point intéressant est la chute de l'apoptose chez les EryC, qui peut difficilement être attribuée uniquement à l'EPO puisque ces cellules n'expriment plus EPO-R. La perte d'apoptose

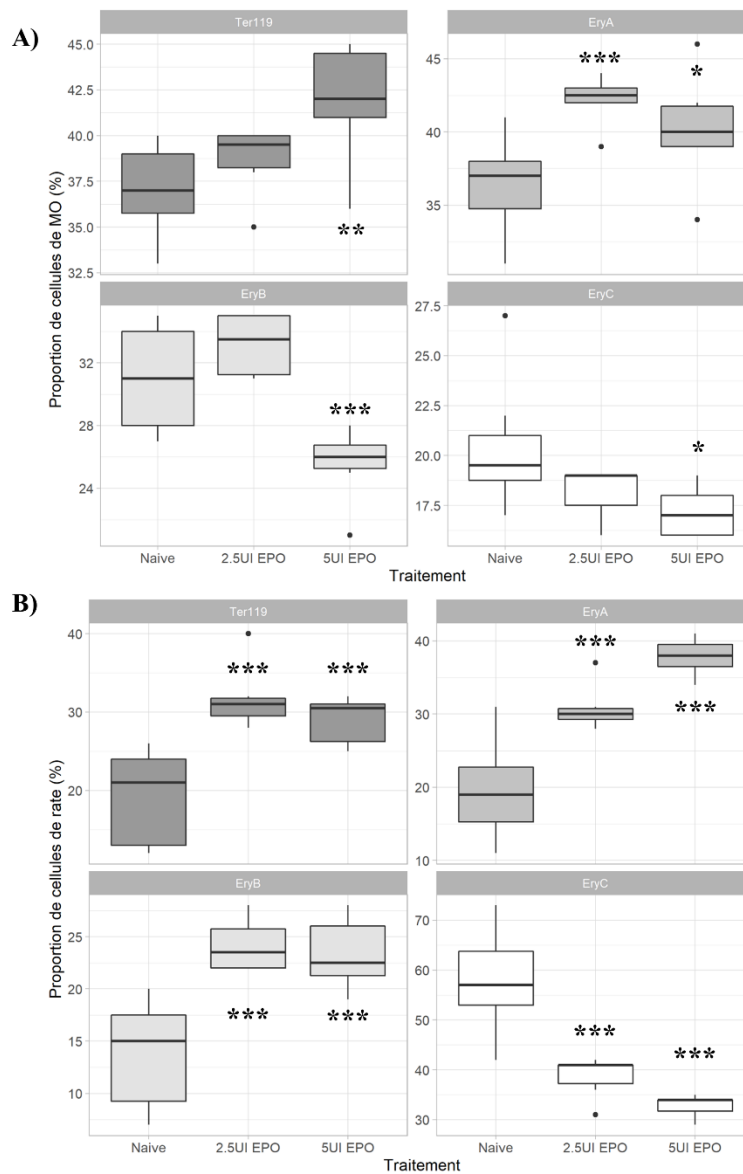


Figure 3.2 – Effet de l'EPO sur la composition des populations de cellules Ter119⁺ dans la MO et la rate.

Taux de cellules Ter119⁺ et composition de la population dans A) la moelle osseuse (MO) et B) la rate de souris BALB/c. EryA : érythroblastes basophiles CD71^{high}FSC^{high}. EryB : érythroblastes polychromatiques CD71^{high}FSC^{low}. EryC : érythroblastes orthochromatiques CD71^{low}FSC^{low}. *** = P < 0.001, ** = P < 0.01, * = P < 0.05.

chez les érythroblastes dans la MO ne semble pas proportionnelle à l'EPO reçue, puisque le groupe traité à 5 UI semble perdre cet effet. Les résultats les plus intéressants ont été observés dans la rate, où l'apoptose des cellules Ter119⁺ a augmenté après le traitement à 5 UI d'EPO (Figure 3.3 B, $P < 0.001$).

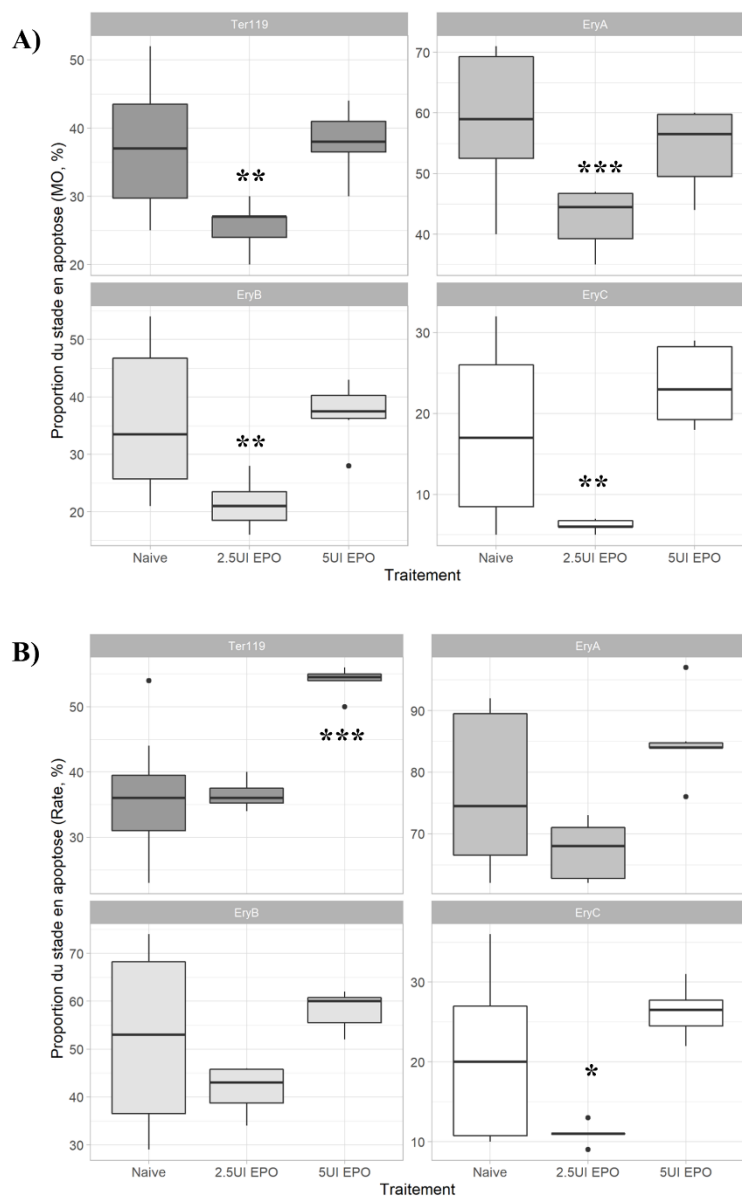


Figure 3.3 – Effet de l'EPO sur l'apoptose des érythroblastes dans la MO et la rate.

Taux de cellules Annexine V⁺ parmi les Ter119⁺, EryA, EryB et EryC de A) la MO et B) la rate de souris BALB/c. EryA : érythroblastes basophiles CD71^{high}FSC^{high}. EryB : érythroblastes polychromatiques CD71^{high}FSC^{low}. EryC : érythroblastes orthochromatiques CD71^{low}FSC^{low}. *** = $P < 0.001$, ** = $P < 0.01$, * = $P < 0.05$.

En utilisant une banque de données récoltées au cours de plusieurs expériences, nous avons évalué la relation entre le pourcentage de cellules Ter119⁺ dans la MO et leur taux d'apoptose (Figure 3.4). Bien que le coefficient de corrélation soit faible, notre analyse révèle qu'environ 20% des variations dans l'apoptose des cellules Ter119⁺ peut être attribuée au pourcentage de la population qu'elles représentent ($R^2 = 0.204$).

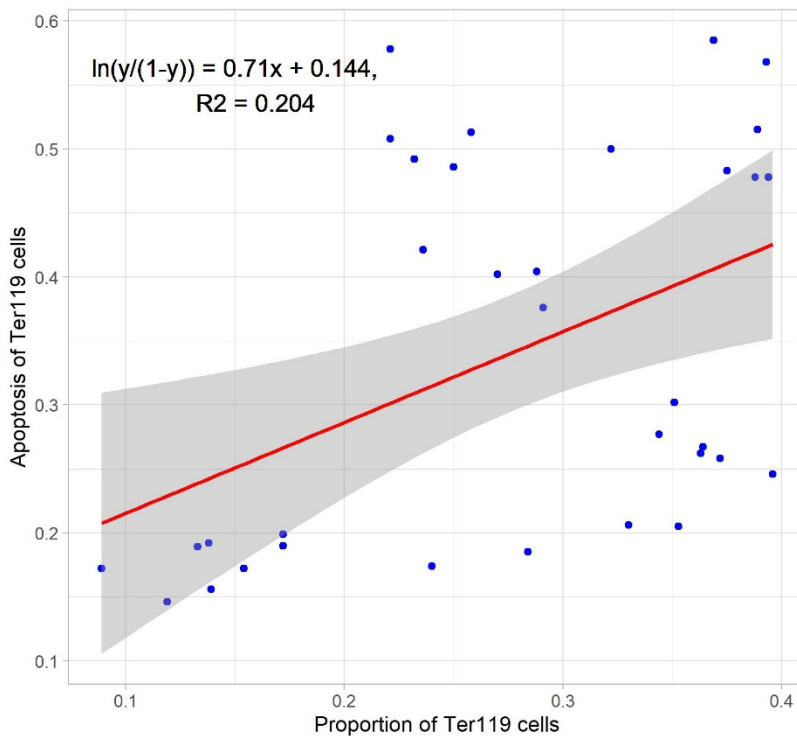


Figure 3.4 – Relation entre la proportion de cellules Ter119⁺ et leur apoptose dans la MO de souris BALB/c.

Les taux et l'apoptose de cellules Ter119⁺ dans la MO de souris BALB/c naïves et traitées au clodronate issues de plusieurs expériences ont été réunies pour une analyse à plus grande échelle de la relation entre ces deux variables (n=34).

Enfin, pour mieux comprendre la relation entre les macrophages et l'apoptose des érythroblastes, nous avons analysé le taux de cellules érythroblastiques apoptotiques chez des souris déficientes en macrophages et subséquemment traitées à 5 UI d'EPO (Figure 3.5). Les résultats observés dans la MO et la rate étaient très similaires. Une chute de macrophages a causé une diminution de l'apoptose pour tous les stades étudiés, à l'exception des EryC de la MO. Dans la MO, l'EPO n'a pas affecté de façon significative l'apoptose par rapport aux souris traitées au clodronate seulement (Figure 3.5 A). Cependant, bien que non-significative, une légère tendance à la hausse est visible pour tous les stades. Dans la rate, l'injection d'EPO a causé une diminution supplémentaire de l'apoptose chez les EryA et les EryB ($P < 0.05$, Figure 3.5 B).

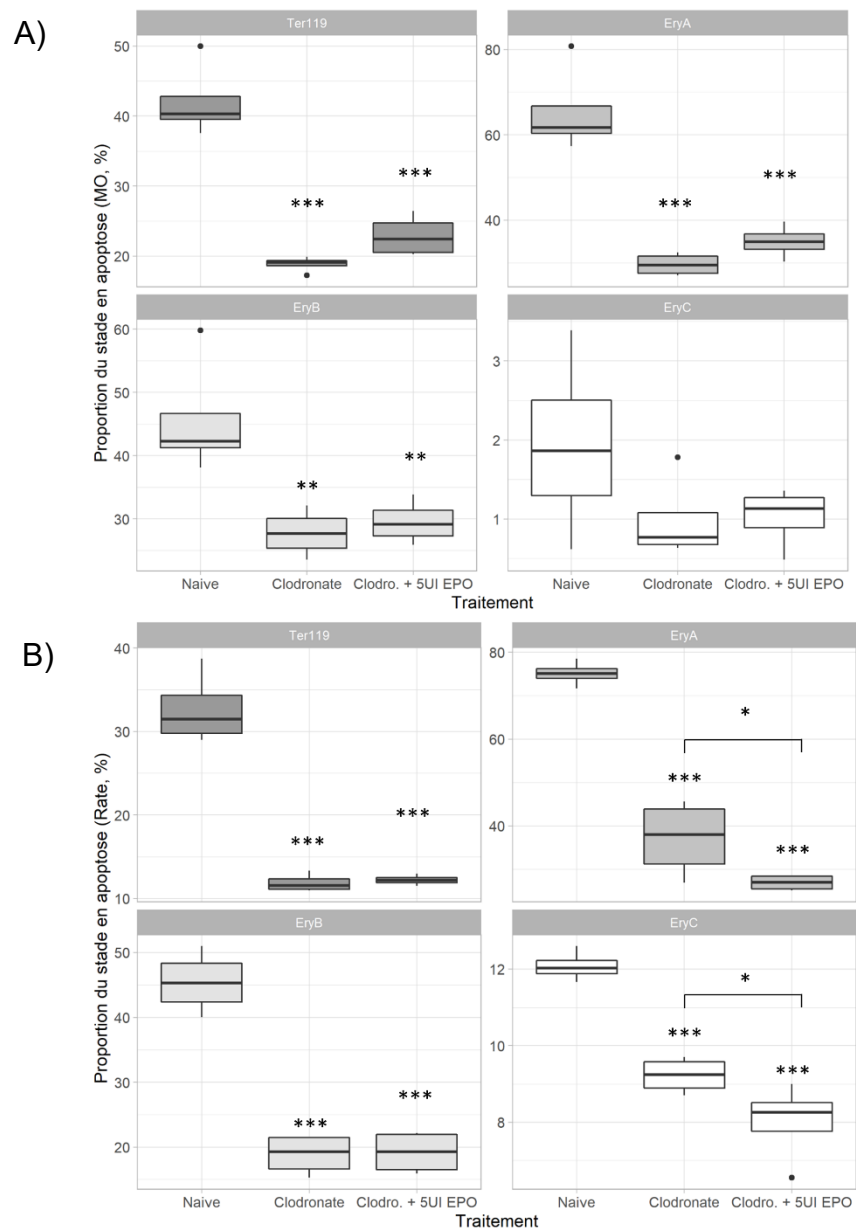


Figure 3.5 – Effet de l’ablation des macrophages et de 5 UI d’EPO sur l’apoptose des cellules érythroblastiques de la MO et la rate

Taux de cellules Annexine V⁺ parmi les Ter119⁺, EryA, EryB et EryC de A) la MO et B) la rate de souris BALB/c déplétées en macrophages par injection de clodronate, avec et sans apport subséquent en EPO. *** = P < 0.001, ** = P < 0.01, * = P < 0.05.

3.4. Discussion

En condition basale, l'érythropoïèse est principalement régulée par l'apoptose des érythroblastes. Lors d'un stress anémique ou hypoxique, la production d'EPO par les cellules péri-tubulaires rénales augmente et l'hormone permet la survie d'un plus grand nombre d'érythroblastes qu'en homéostasie.^{4; 10; 12; 13} En injectant chez des souris des doses d'EPO qui se situent dans les limites physiologiques des animaux¹, nous voulions suivre de quelle façon l'EPO module l'érythropoïèse dans la MO et dans la rate.

Notre analyse des taux de réticulocytes en circulation nous permet de valider que l'EPO injectée aux animaux a bel et bien stimulé sur l'érythropoïèse. Cependant, les causes spécifiques de cet effet sont difficiles à cerner.

Les populations d'érythroblastes de la MO et de la rate sont affectées différemment par l'EPO. Dans la MO, bien que les EryA soient plus nombreux dès 2.5 UI, le taux de Ter119⁺ dans l'organe n'augmente qu'à partir de 5 UI. La rate s'est révélée comme étant plus sensible à la hausse en EPO, avec un effet marqué dès la dose de 2.5 UI.

La rate, un organe lymphoïde secondaire, intervient majoritairement dans l'érythropoïèse de stress : seule une faible quantité d'érythrocytes y sont produits en conditions basales.^{5; 16} Dans la MO, cependant, l'érythropoïèse a lieu en tout temps afin de remplacer les deux millions d'érythrocytes sénescents qui sont éliminés chaque seconde.¹ Il est possible que la rate soit plus sensible aux variations d'EPO en circulation dans l'organisme. En temps normal, une quantité d'EPO telle que nous avons injecté n'est présente dans un animal que lors d'un stress hypoxique ou anémique, qui requiert une production accrue et rapide d'érythrocytes. C'est dans ces conditions que l'érythropoïèse splénique prend de l'ampleur.¹ De plus, l'EPO agit aussi sur les CFU-E, un stade plus précoce que les EryA. Ces cellules, qui ne peuvent être identifiées par cytofluorométrie, ont une plus forte capacité de division que les stades

subséquents et nécessitent eux aussi de l'EPO pour assurer leur survie.¹ Selon Paulson *et al.*, les BFU-E (stade précédent le CFU-E) spléniques font de plus grandes colonies que ceux de la MO, et ce, plus rapidement.⁵¹ Cette caractéristique permettrait à la rate de former plus rapidement un *pool* de CFU-E sensibles à l'EPO, et ainsi d'avoir une réponse au stress plus rapide que la MO. La mesure de la variation dans les taux de CFU-E et une étude un peu plus longue auraient permis une meilleure analyse des effets de l'EPO sur l'érythropoïèse de la MO et de la rate.

Pour comprendre le mécanisme par lequel les populations érythroblastiques répondent à l'EPO, nous avons évalué leur taux d'apoptose. Le rôle principal de l'EPO dans l'érythropoïèse est de protéger des érythroblastes de l'apoptose qui a lieu en conditions homéostatiques. Cette protection est essentielle, même en absence de stress, tel que démontré par les modèles de souris KO à l'EPO ou son récepteur, qui causent une mort embryonnaire en deux semaines.⁵⁸⁻⁶⁰ L'apoptose des érythroblastes est initiée par l'interaction entre le récepteur Fas et son ligand, deux protéines membranaires exprimées par les EryA et les EryB. Un niveau d'apoptose adéquat maintient une érythropoïèse saine. Trop d'érythroblastes mène à une condition appelée érythrocytose, caractérisée par un sang trop épais et une mort prématurée.⁴⁹ Nos données montrent qu'à 2.5 UI, dose où le taux de Ter119⁺ dans la MO n'est pas affecté, la proportion d'érythroblastes apoptotiques diminue fortement. À cette dose, bien que le taux de Ter119⁺ ne montre aucun changement significatif, un plus grand pourcentage d'EryA est noté, et ceux-ci présentent moins d'apoptose que chez les souris naïves. À 5 UI, cependant, l'apoptose retourne à des valeurs normales. Dans la rate, l'effet est encore plus marqué : l'apoptose augmente chez les Ter119⁺ à 5 UI.

Une analyse de l'apoptose des cellules Ter119⁺ chez plusieurs souris démontre que le taux de Ter119⁺ affecte le taux d'apoptose. Une explication serait qu'une augmentation de la densité d'érythroblastes favoriserait les interactions entre les cellules

qu'expriment Fas et Fas-L. Bien que l'EPO protège de l'apoptose en aval de l'activation de Fas^{40; 42}, une plus grande densité cellulaire pourrait faciliter les interactions entre Fas et Fas-L, exprimés par les cellules de la population, et limiter l'accessibilité de ces cellules à l'EPO d'origine externe. Ceci expliquerait l'augmentation d'apoptose en présence d'une quantité élevée d'EPO. La diminution d'apoptose due à l'effet de l'hormone, telle qu'observée après une injection de 2.5 UI d'EPO, serait contrebalancée par une augmentation due à la densité cellulaire. Cette hypothèse est supportée par une étude publiée en 2011 par Koulis *et al.*⁶⁵, qui suggère que l'expression de Fas chez les EryA est inversement proportionnelle à leur fréquence. Ainsi, bien que certains auteurs notent une régulation négative de l'expression de Fas et de Fas-L par l'EPO²⁴, le rétablissement de l'érythropoïèse qui accompagne la hausse d'EPO en circulation peut entraîner une augmentation de l'expression de Fas et, ce faisant, une augmentation de l'apoptose.

Finalement, nous avons analysé des données récoltées lors de notre expérience de déplétion en macrophages pour étudier de quelle façon une déficience en macrophages influence l'apoptose. Nous croyions observer une hausse importante de l'apoptose en absence de macrophages, compte tenu de leur soutien aux érythroblastes et de leur possible contribution comme source d'EPO. Pourtant, dans la MO et la rate, une perte de macrophages a été accompagnée d'une diminution de l'apoptose pour tous les stades étudiés. Dans les IE, les macrophages et les érythroblastes sont en contact étroit par l'entremise de plusieurs protéines d'adhésion, telles que l'EMP et le couple VCAM-1/intégrine $\alpha 4\beta$.^{3; 10; 11} La proximité cellulaire associée à ce contact pourrait faciliter l'interaction entre les protéines membranaires Fas et Fas-L des érythroblastes, menant ainsi à plus d'apoptose.

La régulation de l'érythropoïèse est complexe et encore peu comprise. Le maintien de l'homéostasie demande un équilibre fin entre l'apoptose et la survie des érythroblastes,

et plusieurs facteurs autres que l'EPO et Fas sont impliqués dans ce processus. Contrairement à notre hypothèse initiale, les quelques résultats ici présentés semblent montrer que la rate est plus sensible que la MO aux variations d'EPO dans l'organisme. Ils ne révèlent toutefois aucun mécanisme ou relation précise entre les différentes variables étudiées. Pour développer une meilleure vue d'ensemble, il serait intéressant d'analyser les CFU-E et BFU-E, et de mener une étude plus longue. Une étude plus complète et poussée sur la façon dont l'EPO influence l'érythropoïèse dans la MO et la rate amènerait une meilleure compréhension de l'érythropoïèse de stress et, peut-être, une vision plus complète des nombreuses hématopathologies qui nous affectent.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le rôle des macrophages dans l'érythropoïèse est étudié depuis plusieurs années. Plusieurs fonctions leur ont été attribuées depuis la découverte des IE par Bessis, notamment la phagocytose des pyrénocytes et l'apport de fer aux érythroblastes.³ Nous avons démontré que les macrophages des IE de la MO soutiennent aussi les érythroblastes en produisant de l'EPO. Cette nouvelle découverte s'oppose au modèle précédemment accepté selon lequel l'EPO n'est produite que par les reins.¹

Plusieurs pathologies sont associées à une dérégulation de l'érythropoïèse, que ce soit à la hausse ou à la baisse. Une bonne compréhension fondamentale de ce processus est essentielle à l'étude de ses pathologies. Bien que notre étude souligne un rôle de l'EPO macrophagique dans le maintien de l'érythropoïèse basale, l'étendue de ce rôle reste à déterminer. Le mécanisme de régulation de cette production d'EPO doit lui aussi être étudié davantage. Le nouveau modèle que nous proposons est que les macrophages des IE produisent de l'EPO en réponse à la S1P libérée par les érythroblastes en apoptose. L'apoptose des érythroblastes serait ainsi régulée par la densité cellulaire, facilitant le contact entre Fas et Fas-L chez les EryA et EryB, et par l'EPO macrophagique.

Plusieurs perspectives restent à explorer. La majorité de notre nouveau modèle est toujours sous forme d'hypothèse : les conditions menant à la sécrétion d'EPO par les macrophages doivent être découvertes. L'importance de l'apoptose dans l'érythropoïèse est bien connue, mais sa régulation est encore nébuleuse, tel que nous le soulignons dans notre étude. De plus, plusieurs informations contradictoires circulent sur le rôle de Fas et son interaction avec l'EPO. Selon certains, l'EPO réduit

l'expression de Fas.²⁴ Selon d'autres, Fas est essentielle à la différenciation des érythroblastes.⁶⁶ Il serait intéressant de mener une étude portant sur la régulation de l'expression de Fas et de Fas-L chez les érythroblastes, ainsi que sur le mode de prévention de l'apoptose par l'EPO et son interaction avec Fas et la caspase-3. Le suivi de l'expression de Fas et de Fas-L après une ablation des macrophages pourrait répondre à certaines questions soulevées lors de notre étude. Finalement, l'hypoxie est une condition que nous n'avons pas inclus dans nos travaux de recherche, mais qui est fortement impliquée dans la production d'EPO et l'érythropoïèse de stress. Évaluer l'effet de l'hypoxie sur l'expression de Fas et Fas-L, avec ou sans déplétion de macrophages, nous donnerait une meilleure vue d'ensemble sur la régulation fine de l'érythropoïèse et sur l'importance des reins et des macrophages dans ce processus.

RÉFÉRENCES

- Elliott, S. G., Foote, M., & Molineux, G. (2009). *Erythropoietins, erythropoietic factors, and erythropoiesis: molecular, cellular, preclinical, and clinical biology*: Springer Science & Business Media.
- Gordon, S. (2007). The macrophage: past, present and future. *European journal of immunology*, 37(S1), S9-S17.
- Chasis, J. A., & Mohandas, N. (2008). Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood*, 112(3), 470-478.
- Dzierzak, E., & Philipsen, S. (2013). Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(4), a011601.
- Pantel, K., Loeffler, M., Bungart, B., & Wichmann, H. (1990). A mathematical model of erythropoiesis in mice and rats. Part 4: Differences between bone marrow and spleen. *Cell Proliferation*, 23(4), 283-297.
- Fabrick, B. O., Dijkstra, C. D., & van den Berg, T. K. (2005). The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology*, 210(2-4), 153-160.
- 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), 1211-1218.
- An, X., & Mohandas, N. (2011). Erythroblastic islands, terminal erythroid differentiation and reticulocyte maturation. *International journal of hematology*, 93(2), 139-143.
- 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), 2940-2950.
- Sadahira, Y., & Mori, M. (1999). Role of the macrophage in erythropoiesis. *Pathology international*, 49(10), 841-848.
- Soni, S., Bala, S., Gwynn, B., Sahr, K. E., Peters, L. L., & Hanspal, M. (2006). Absence of erythroblast macrophage protein (Emp) leads to failure of erythroblast nuclear extrusion. *Journal of Biological Chemistry*, 281(29), 20181-20189.
- Jelkmann, W. (2011). Regulation of erythropoietin production. *The Journal of physiology*, 589(6), 1251-1258.
- Jelkmann, W. (2004). Molecular biology of erythropoietin. *Internal medicine*, 43(8), 649-659.
- Suzuki, N., Ohneda, O., Takahashi, S., Higuchi, M., Mukai, H. Y., Nakahata, T., . . . Yamamoto, M. (2002). Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality. *Blood*, 100(7), 2279-2288.

- Chang, K.-H., & Stevenson, M. M. (2002). Comparison of murine Epo ELISA and Epo bioassays in detecting serum Epo levels during anemia associated with malaria infection. *Journal of immunological methods*, 262(1-2), 129-136.
- Millot, S., Andrieu, V., Letteron, P., Lyoumi, S., Hurtado-Nedelec, M., Karim, Z., . . . Lasocki, S. (2010). Erythropoietin stimulates spleen BMP4-dependent stress erythropoiesis and partially corrects anemia in a mouse model of generalized inflammation. *Blood*, 116(26), 6072-6081.
- Morceau, F., Dicato, M., & Diederich, M. (2009). Pro-inflammatory cytokine-mediated anemia: regarding molecular mechanisms of erythropoiesis. *Mediators of inflammation*, 2009.
- Zeigler, B. M., Vajdos, J., Qin, W., Loverro, L., & Niss, K. (2010). A mouse model for an erythropoietin-deficiency anemia. *Disease models & mechanisms*, 3(11-12), 763-772.
- Luo, B., Gan, W., Liu, Z., Shen, Z., Wang, J., Shi, R., . . . Zhang, Z. (2016). Erythropoietin signaling in macrophages promotes dying cell clearance and immune tolerance. *Immunity*, 44(2), 287-302.
- Rich, I. N., Heit, W., & Kubanek, B. (1982). Extrarenal erythropoietin production by macrophages. *Blood*, 60(4), 1007-1018.
- Vogt, C., Pentz, S., & Rich, I. (1989). A role for the macrophage in normal hemopoiesis: III. In vitro and in vivo erythropoietin gene expression in macrophages detected by in situ hybridization. *Experimental hematology*, 17(5), 391-397.
- Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., & Lodish, H. F. (1995). Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*, 83(1), 59-67.
- 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), 429-435.
- 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), 123-133.
- Keerthivasan, G., Wickrema, A., & Crispino, J. D. (2011). Erythroblast enucleation. *Stem cells international*, 2011.
- Barbone, A. G., Aparicio, B., Anderson, D. W., Natarajan, J., & Ritchie, D. M. (1994). Reticulocyte measurements as a bioassay for erythropoietin. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 12(4), 515-522.
- Chang, K.-H., Tam, M., & Stevenson, M. M. (2004). Modulation of the course and outcome of blood-stage malaria by erythropoietin-induced reticulocytosis. *The Journal of infectious diseases*, 189(4), 735-743.
- Roeder, I., De Haan, G., Engel, C., Nijhof, W., Dontje, B., & Loeffler, M. (1998). Interactions of erythropoietin, granulocyte colony-stimulating factor, stem cell

- factor, and interleukin-11 on murine hematopoiesis during simultaneous administration. *Blood*, *91*(9), 3222-3229.
- Hayakawa, T., Wada, M., Mizuno, K., Abe, S., Miyashita, M., & Ueda, M. (1992). Simple in vivo bioassay without radioisotopes for recombinant human erythropoietins. *Biologicals*, *20*(4), 243-251.
- Barth, T., Oliveira, P. R., D'Avila, F. B., & Dalmora, S. L. (2008). Validation of the normocythemic mice bioassay for the potency evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical formulations. *Journal of AOAC International*, *91*(2), 285-291.
- Rhodes, M. M., Kopsombut, P., Bondurant, M. C., Price, J. O., & Koury, M. J. (2008). Adherence to macrophages in erythroblastic islands enhances erythroblast proliferation and increases erythrocyte production by a different mechanism than erythropoietin. *Blood*, *111*(3), 1700-1708.
- Chow, A., Huggins, M., Ahmed, J., Hashimoto, D., Lucas, D., Kunisaki, Y., . . . Van Rooijen, N. (2013). CD169+ macrophages provide a niche promoting erythropoiesis under homeostasis and stress. *Nature medicine*, *19*(4), 429.
- Lin, H.-H., Faunce, D. E., Stacey, M., Terajewicz, A., Nakamura, T., Zhang-Hoover, J., . . . Stein-Streilein, J. (2005). The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *Journal of Experimental Medicine*, *201*(10), 1615-1625.
- van den Berg, T. K., & Kraal, G. (2005). A function for the macrophage F4/80 molecule in tolerance induction. *Trends in immunology*, *26*(10), 506-509.
- Chow, A., Lucas, D., Hidalgo, A., Méndez-Ferrer, S., Hashimoto, D., Scheiermann, C., . . . Van Rooijen, N. (2011). Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *Journal of Experimental Medicine*, *208*(2), 261-271.
- 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*, *292*(5521), 1546-1549.
- Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E., & Taylor, P. R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nature immunology*, *14*(10), 986.
- Rich, I., Vogt, C., & Pentz, S. (1988). Erythropoietin gene expression in vitro and in vivo detected by in situ hybridization. *Blood cells*, *14*(2-3), 505-520.
- Luo, B., Jiang, M., Yang, X., Zhang, Z., Xiong, J., Schluesener, H. J., . . . Wu, Y. (2013). Erythropoietin is a hypoxia inducible factor-induced protective molecule in experimental autoimmune neuritis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, *1832*(8), 1260-1270.
- De Maria, R., Zeuner, A., Eramo, A., Domenichelli, C., Bonci, D., Grignani, F., . . . Peschle, C. (1999). Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*, *401*(6752), 489.

- Zermati, Y., Garrido, C., Amsellem, S., Fishelson, S., Bouscary, D., Valensi, F., . . . Hermine, O. (2001). Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *Journal of Experimental Medicine*, 193(2), 247-254.
- Carlile, G. W., Smith, D. H., & Wiedmann, M. (2004). Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. *Blood*, 103(11), 4310-4316.
- Kolbus, A., Pilat, S., Husak, Z., Deiner, E. M., Stengl, G., Beug, H., & Baccharini, M. (2002). Raf-1 antagonizes erythroid differentiation by restraining caspase activation. *Journal of Experimental Medicine*, 196(10), 1347-1353.
- Nagafuji, K., Takenaka, K., Shibuya, T., Harada, M., & Niho, Y. (1996). Fas antigen (CD95) and hematopoietic progenitor cells. *Leukemia & lymphoma*, 24(1-2), 43-56.
- Koury, M. J., & Bondurant, M. C. (1990). Control of red cell production: the roles of programmed cell death (apoptosis) and erythropoietin. *Transfusion*, 30(8), 673-674.
- Spivak, J. L., Pham, T., Isaacs, M., & Hankins, W. D. (1991). Erythropoietin is both a mitogen and a survival factor. *Blood*, 77(6), 1228-1233.
- Sakata, S., Nakatani, A., Jimaru, D., Ueda, M., Kohzuki, H., Ohga, Y., . . . Takaki, M. (1999). Measurement of mouse plasma erythropoietin by an improved ELISA. *Comparative Haematology International*, 9(2), 110-115.
- Tsuchiva, T., Okada, M., Ueda, M., & Yasukochi, Y. (1997). Activation of the erythropoietin promoter by a point mutation from GATA to TATA in the-30 region. *The Journal of Biochemistry*, 121(2), 193-196.
- Wagner, K. F., Katschinski, D. M., Hasegawa, J., Schumacher, D., Meller, B., Gembruch, U., . . . Fandrey, J. (2001). Chronic inborn erythrocytosis leads to cardiac dysfunction and premature death in mice overexpressing erythropoietin. *Blood*, 97(2), 536-542.
- Koury, S. T., Koury, M. J., Bondurant, M. C., Caro, J., & Graber, S. E. (1989). Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization: correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration. *Blood*, 74(2), 645-651.
- Paulson, R. F., Shi, L., & Wu, D.-C. (2011). Stress erythropoiesis: new signals and new stress progenitor cells. *Current opinion in hematology*, 18(3), 139.
- Wang, F., Zhang, R., Wu, X., & Hankinson, O. (2010). Roles of coactivators in hypoxic induction of the erythropoietin gene. *PLoS One*, 5(4), e10002.
- Weidemann, A., & Johnson, R. S. (2009). Nonrenal regulation of EPO synthesis. *Kidney international*, 75(7), 682-688.
- Kieran, M. W., Perkins, A. C., Orkin, S. H., & Zon, L. I. (1996). Thrombopoietin rescues in vitro erythroid colony formation from mouse embryos lacking the erythropoietin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(17), 9126-9131.

- Broudy, V. C., Lin, N., Brice, M., Nakamoto, B., & Papayannopoulou, T. (1991). Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood*, 77(12), 2583-2590.
- Cheung, J. Y., & Miller, B. A. (2001). Molecular mechanisms of erythropoietin signaling. *Nephron*, 87(3), 215-222.
- Zhao, W., Kitidis, C., Fleming, M. D., Lodish, H. F., & Ghaffari, S. (2006). Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Blood*, 107(3), 907-915.
- Gregoli, P. A., & Bondurant, M. C. (1997). The roles of Bcl-XL and apopain in the control of erythropoiesis by erythropoietin. *Blood*, 90(2), 630-640.
- Silva, M., Grillot, D., Benito, A., Richard, C., Nunez, G., & Fernandez-Luna, J. L. (1996). Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. *Blood*, 88(5), 1576-1582.
- 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), 87-96.
- Fujiwara, Y., Browne, C. P., Cunniff, K., Goff, S. C., & Orkin, S. H. (1996). Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(22), 12355-12358.
- Ohneda, K., & Yamamoto, M. (2002). Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage. *Acta haematologica*, 108(4), 237-245.
- Motoyama, N., Wang, F., Roth, K. A., Sawa, H., Nakayama, K.-i., Negishi, I., . . . Fujii, S. (1995). Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science*, 267(5203), 1506-1510.
- Eggold, J. T., & Rankin, E. B. (2019). Erythropoiesis, EPO, macrophages, and bone. *Bone*, 119, 36-41.
- Koulnis, M., Liu, Y., Hallstrom, K., & Socolovsky, M. (2011). Negative autoregulation by Fas stabilizes adult erythropoiesis and accelerates its stress response. *PLoS One*, 6(7), e21192.
- Carlile, G. W., Smith, D. H., & Wiedmann, M. (2009). A non - apoptotic role for Fas/FasL in erythropoiesis. *FEBS letters*, 583(4), 848-854.