UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IMPLICATION DE L'AXE EPO/EPOR/JAK2 DANS L'ACQUISITION D'UN PROFIL PRO-ERYTHROPOÏETIQUE CHEZ LES MACROPHAGES

MEMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

POUR LA MAITRISE EN BIOLOGIE

PAR

PHILIPPE ST-LOUIS

SEPTEMBRE 2022

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

Je veux remercier ma directrice de recherche Tatiana Scorza pour m'avoir accepté dans son laboratoire et m'avoir supporté dans les nombreux projets qui ont marqué ma maîtrise. Sa passion pour la recherche et son travail assidu m'ont inspiré à toujours travailler plus fort et ont forgé en moi une attitude positive face à la recherche, le travail et la vie en général. Pour ces raisons, je crois que je suis une meilleure personne après l'avoir côtoyé tout au long de ce périple et je lui en suis grandement reconnaissant.

Je tiens à remercier mes collègues de laboratoires qui m'ont accompagné tout au long de ma maîtrise. Arleth Pozo de Lugo pour m'avoir enseignée et assisté depuis mes premiers pas dans le laboratoire. Genève Perron-Deshais pour son aide lors des nombreuses dissections et pour sa joie de vivre qui illuminait le laboratoire. Nicolas Pouderous pour son support lors de mes expériences et les nombreux burgers que l'on a partagés après une bonne journée de travail.

Je tiens aussi à remercier l'équipe technique du pavillon des sciences biologiques pour leurs supports. En particulier, Marie-Josée Carbonneau pour sa disponibilité sans compromis à la suite de mes nombreuses requêtes et Serge Paquet pour les longues séances de discussions dans son bureau à parler de tout et de rien quand mon projet me sortait par les oreilles. J'en profite aussi pour remercier Denis Flipo de la plateforme d'analyse cellulaire. Son expertise en cytométrie en flux a été d'une aide inestimable tout au long de ma maîtrise.

Je tiens aussi à remercier ma famille qui m'a toujours supporté tout au long de mes études en passant par un détour en psychologie jusqu'aujourd'hui en biologie. Maman, Papa, Mélissa. Merci pour la présence et le support que vous m'avez donné inconditionnellement tout ce temps.

Finalement, je tiens à remercier particulièrement ma conjointe Nina Elston qui est à mes côtés depuis maintenant 11 ans. Personne n'a sacrifié autant qu'elle pour me permettre de me rendre ici aujourd'hui, surtout au moment où j'écris ces lignes, lors d'une énième longue soirée sur le campus universitaire, éloignée d'elle. Je me compte chanceux d'avoir en elle quelqu'un d'aussi compréhensive et patiente lorsque je retourne finalement à la maison.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS ii

LISTE DES FIGURES v

LISTE DES TABLEAUX vi

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES vii

RÉSUMÉ ix

ABSTRACT x

INTRODUCTION 1

CHAPITRE 1 ÉTATS DES CONNAISSANCES 3

1.1 Les macrophages 3

1.1.1 Le développement des macrophages 3
1.1.2 La polarisation M1 et M2 5
1.1.2.1 Activation classique M1 5
1.1.2.2 Activation alternative M2 6
1.1.3 Les MΦ résidentiels et les niches 7

1.2 Érythropoïèse par les macrophages centraux et de la pulpe rouge 8

1.2.1 L'érythropoïèse basale 8
1.2.2 L'érythropoïèse de stress 8
1.2.3 Le macrophage central et l'îlot érythroblastique 9
1.2.3.1 Le rôle des molécules d'adhésions 9
1.2.4 Les macrophages de la pulpe rouge 10

1.3 Le conditionnement des macrophages avec le milieu apoptotique 11

1.3.1 Composition du milieu apoptotique 11
1.3.1.1 La sphingosine-1-phosphate 12

1.4 L'axe EPO/EPOR/JAK2 12

1.4.1 La signalisation JAK/STAT de l'EPOR 13
1.4.2 Effets de l'EPO sur les érythroblastes 13
1.4.3 Effets de l'EPO sur les macrophages 14

1.5 La polycythémie vera comme modèle d'EPOR actif constitutivement 16

1.5.1 Les modèles murins de PV 16
1.5.2 Le rôle des macrophages dans la PV 17

1.6 Hypothèses et objectifs 19

CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODE 20

2.1 Modèles animaux 20

2.2 Génération des BMDM et des SPDM 20
2.3 Génération des cellules de la rate apoptotiques et du milieu apoptotique 21
2.4 Conditionnement des BMDM et SPDM 23
2.5 Analyse des transcrits par RT-qPCR 23
2.6 Analyse des protéines par Western blot 24
2.7 Analyse par cytométrie en flux 24
2.8 Essai fonctionnel de coculture avec les cellules souches hématopoïétiques 26
2.9 Analyse des cytokines par ELISA 26
2.10 Analyse des nitrites par réaction de Griess 27
2.11 Récupération des cellules mononucléées périphériques. 27
2.12 Formation de colonies sur méthylcellulose 27
2.13 Analyse histologique des macrophages de la pulpe rouge 28
2.14 Statistiques 28

CHAPITRE 3 RÉSULTATS 29
3.1 Les BMDM conditionnés produisent de l'EPO 29
3.2 Les BMDM conditionnés surexpriment l'EPOR 32
3.3 Les BMDM conditionnés adoptent un profil tolérant 32
3.4 Les BMDM adoptent un phénotype semblable aux macrophages centraux 34
3.5 Le modèle murin de PV a une érythropoïèse exacerbée dans la rate 38
3.6 L'érythropoïèse exacerbée dans la rate s'accompagne d'une hausse des macrophages 42
3.7 La hausse de macrophages splénique est assurée par une hématopoïèse locale 42
3.8 La mutation Jak2/+ diminue la tolérance chez les SPDM 46
3.9 Les macrophages de la pulpe rouge prennent en charge l'érythropoïèse dans la rate 49

CHAPITRE 4 DISCUSSION 52

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 63

BIBLIOGRAPHIE 66

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Modèles de développement des macrophages 4

Figure 1.2 Modèle de polarisation M1 et M2 des macrophages sur un spectre 5

Figure 1.3 Le modèle de niche pour les macrophages résidents 7

Figure 1.4 La voie de signalisation JAK/STAT 15

Figure 1.5 Les modèles *knock in* de polycythémie vera 18

Figure 2.1 Génération des macrophages dérivés de la moelle osseuse *in vitro* 21

Figure 2.2 Analyse des splénocytes non-adhérents apoptotiques 22

Figure 3.1 Les BMDM conditionnés avec les cellules apoptotiques produisent de l'EPO 30

Figure 3.2 L'EPO produite par les macrophages agit de façon paracrine 31

Figure 3.3 Les BMDM conditionnés surexpriment l'EPOR 33

Figure 3.4 Sécrétions des cytokines chez les BMDM suite aux conditionnements et la polarisation M1 .. 35

Figure 3.5 Expression des marqueurs de macrophage central chez les BMDM et SPDM conditionnés 36

Figure 3.6 Expression d'IGF-1 chez les BMDM conditionnés 37

Figure 3.7 Sélection des souris Jak2/+..... 39

Figure 3.8 Cellularité de la rate et la moelle osseuse des souris Jak2/+ 40

Figure 3.9 Profil d'érythroblastes chez les souris Jak2/+ 41

Figure 3.10 Profil des macrophages chez les souris Jak2/+ 43

Figure 3.11 Stratégie d'analyse des précurseurs myéloïdes par cytométrie en flux 44

Figure 3.12 Taux de progéniteurs chez les souris Jak2/+ 45

Figure 3.13 Les précurseurs dans la rate des souris Jak2/+ sont plus aptes à former des macrophages... 47

Figure 3.14 Polarisation des BMDM et SPDM Jak2/+ 48

Figure 3.15 la fraction des macrophages de la pulpe rouge contient des îlots érythroblastiques chez les souris Jak2/+. 50

Figure 3.16 Expressions des molécules d'adhésions chez les macrophages des souris Jak2/+. 51

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Liste des anticorps et marqueurs utilisés lors des expériences de cytométrie en flux 25

Tableau 4.1 Type de colonies myéloïdes en hausse chez les souris Jak2/+ 62

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

BFU-E : « Blast Forming Unit – Erythroids »

BMDM : Macrophages Dérivés de la Moelle Osseuse

CD71 : Récepteur de la Transferrine

CD106 : «Vascular Cell Adhesion Molecule» (Vcam-1)

CD163 : «Scavenger Receptor Cysteine-Rich Type 1 Protein»

CD169 : Siglec-1

CFU-E : «Colony Forming Unit - Erythroids»

CFU-G : «Colony Forming Unit - Granulocytes»

CFU-GM : «Colony Forming Unit - Granulocytes Monocytes»

CFU-GEMM : «Colony Forming Unit - Granulocytes Erythroids Monocytes Megakaryocytes»

CFU-M : «Colony Forming Unit - Monocytes»

CMP : «Common Myeloid Progenitor»

EPO : Érythropoïétine

EPOR : Récepteur de l'Érythropoïétine

ÉryA : Érythroblaste Basophiles

ÉryB : Érythroblaste Polychromatiques

ÉryC : Érythroblaste Orthochromatiques

GATA : «GATA Binding Protein»

GM-CSF : «Granulocyte Monocyte Colony-Stimulating Factor»

GMP : «Granulocyte - Monocyte Precursor»

HIF-1α : «Hypoxia Induced Factor 1 Alpha»

ICAM : «Intercellular Adhesion Molecule»

IGF : «Insulin Growth Factor»

IL : Interleukine

INF-γ : Interféron Gamma

iNOS : «Inducible Nitric Oxide Synthase»

JAK : «Janus Activated Kinase»

LPS : Lipopolysaccaride

M-CSF: «Monocytes Colony-Stimulating factor »

MDP : «Monocytes – Dendritic Progenitor»

MEP : «Megakaryocyte - Erythroid Progenitor»

MΦ : Macrophage

$M\Phi_C$: Macrophage Central

$M\Phi_P$: Macrophage de la Pulpe Rouge

PS : Phosphatidylsérine

PV : Polycythémie Vera

S1P : Spingosine-1-Phosphate

SPDM : Macrophages dérivées de la rate

STAT : «Signal Transducers and Activator of Transcription»

TNF-α : «Tumor Necrosis Factor Alpha»

RÉSUMÉ

Les macrophages (MΦ) résidents jouent plusieurs rôles en fonction des tissus qu'ils occupent. Parmi eux, le macrophage central ($MΦ_C$) forme une niche qui soutient le développement des érythroblastes. De récentes évidences montrent que ces cellules expriment le récepteur à l'érythropoiétine (EPOR) et pourraient produire de l'érythropoïétine (EPO) en réponse au contact avec des cellules apoptotiques dans les îlots érythroblastiques. L'EPOR est associé à JAK2, une kinase intercellulaire impliquée dans la prolifération et la tolérance chez les MΦ. Cependant, peu est connu sur les événements impliquant JAK2 qui mènent à l'adoption du profil de $MΦ_C$. La *polycythémie vera* (PV) est une maladie génétique rare causée principalement par la mutation V617F du gène jak2 qui rend le récepteur d'EPOR actif de façon constitutive, et ligand indépendant. Les personnes qui souffrent de cette maladie ont un hématocrite élevé et développent une splénomégalie en raison de l'engagement biaisé des précurseurs myéloïdes en érythroblastes. Les modèles murins de cette pathologie reproduisent ces symptômes et sont intéressants pour étudier cette voie de signalisation dans le contexte de l'érythropoïèse chez les MΦ. Ce projet avait pour but d'explorer l'axe EPOR/EPO/JAK2 dans l'acquisition d'un profil pro-érythropoïétique/tolérant chez les MΦ qui est un phénomène méconnu. L'acquisition de ce profil chez les MΦ dérives de la moelle osseuse (BMDM) conditionnés avec des cellules apoptotiques ou avec la mutation $Jak2^{VF}$ a été évaluée. Les BMDM conditionnés avec les cellules apoptotiques produisaient plus d'EPO et exprimaient plus l'EPOR. Les MΦ conditionnés avec le milieu apoptotique étaient plus tolérants et exprimaient davantage le *insulin growth factor* 1 (IGF-1). Les souris Jak2/+ avaient plus de MΦ au niveau de leurs rates et soutenaient l'érythropoïèse en formant des îlots érythroblastiques grâce à la surexpression de CD106. En conclusion, l'axe EPO/EPOR/JAK2 est une voie de signalisation novatrice chez les MΦ dans l'acquisition d'un profil pro-érythropoïétique.

Mots clés : macrophages centraux, macrophages de la pulpe rouge, érythropoïétine, JAK2, polycythémie vera

ABSTRACT

Residential macrophages (MΦ) have many functions depending on the tissue they occupy. In particular, the central macrophage ($MΦ_C$) is responsible for the formation of the erythroblastic isle, a niche that supports the development of erythroblasts. Recent evidence shows that these cells express the erythropoietin receptor (EPOR) and produce EPO in response to apoptotic cells in the erythroblastic isle. EPOR is associated to JAK2, an intracellular kinase that induces proliferation and tolerance in MΦ. However, the events involving JAK2, leading to the development of $MΦ_C$ are still unknown. Polycythaemia vera (PV) is a rare disease caused mainly by a punctual mutation of jak2 that makes the EPOR activated constitutively in a ligand independent manner. People suffering from this disease have a high hematocrit and develop a splenomegaly caused by the biased development of myeloid cells in erythroblasts. Mouse models of this disease replicate these symptoms, making them interesting for the study of the JAK2 signaling in MΦ. In this study, we examined the role of the EPO/EPOR/JAK2 signalisation in the acquisition of a pro-erythropoietic profile in bone marrow derived macrophages (BMDM) when conditioned with apoptotic cells or with the $Jak2^{VF}$ mutation. BMDM conditioned with apoptotic cells produced more EPO and expressed EPOR to a higher degree. When conditioned with apoptotic cell media, they became tolerant and produced more IGF-1. Jak2/+ mice had more MΦ in their spleens. These MΦ expressed a high amount of CD106 and formed erythroblastic isles. In conclusion, the EPO/EPOR/JAK2 signalisation is a novel target in the acquisition of pro-erythropoietic functions in MΦ.

Keywords : central macrophages, red pulp macrophages, erythropoietin, JAK2, polycythaemia vera

INTRODUCTION

Les MΦ sont des cellules hautement plastiques et surtout connues pour leurs rôles de défense immunitaire contre les pathogènes. Cependant, dans pratiquement tous les tissus, il y a des populations de MΦ résidents qui prennent en charge des fonctions spécifiques à l'organe ou le tissu qu'ils occupent (Gordon et Plüddemann, 2017). Les $MΦ_C$ sont un type de MΦ résident qui est responsable du développement des érythroblastes dans une niche appelée îlot érythroblastique dans la moelle osseuse. Ils expriment des molécules d'adhésions qui assurent l'intégrité de l'îlot, sécrètent des facteurs de croissance qui favorisent la différenciation et la prolifération des érythroblastes et agissent comme une source de fer pour ces derniers afin qu'ils puissent synthétiser l'hémoglobine (Klei *et al.* 2017).

Cependant, peu est encore connu sur les circonstances nécessaires qui permettent à un MΦ naïf de devenir un $MΦ_C$ pour assurer la formation des îlots. Récemment, un modèle murin qui exprime le récepteur à l'érythropoïétine (l'EPOR) fusionné à la GFP sous son promoteur endogène à permit de mettre en évidence que les MΦ de la moelle surexprimant ce récepteur forment des îlots érythroblastiques composés de plusieurs érythroblastes, comparés à ceux qui expriment peu l'EPOR. Ce récepteur est associé à une paire de molécules Janus kinase 2 (JAK2) qui sont responsable d'initier la signalisation cellulaire suite au contact du ligand EPO au récepteur. L'analyse du transcriptome de ces MΦ a permis de stipuler que ces MΦ expriment les protéines nécessaires pour remplir les fonctions des îlots, mais favorisent aussi un profil tolérant de type M2, en réprimant l'expression de gènes impliqués dans la défense immunitaire ainsi que l'inflammation (Li *et al.,* 2019). Cette découverte met en lumière le rôle potentiel de l'axe EPO/EPOR/JAK2 dans l'acquisition et le maintien des fonctions pro-érythropoïétiques des MΦ.

Plus tôt, le groupe de recherche de Li a démontré que les MΦ du péritoine expriment l'EPOR et que leur conditionnement avec des cellules apoptotiques stimule leur production d'EPO. Ce même groupe de chercheurs a montré que cette EPO peut agir de façon autocrine afin d'induire un profil tolérant chez les MΦ, et les rendre plus aptes à éliminer les cellules par phagocytose (Luo *et al.,* 2016). Or, dans l'îlot érythroblastique, l'apoptose des érythroblastes en maturation est un mécanisme qui assure que les taux d'érythrocytes en circulation soient maintenus à des niveaux optimaux, pour fournir l'oxygène à toutes les cellules de l'organisme. Puisque l'EPO est une hormone clé dans l'engagement des cellules souches myéloïdes dans la voie érythroblastique, nous avons voulu investiguer cette voie de signalisation chez les

macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM). Nous avons ensuite étudié l'adoption d'un profil pro-érythropoïétique chez ces MΦ à la suite du conditionnement avec des cellules apoptotiques et l'EPO. Ce profil a été basé sur les analyses de transcriptome de Li *et al.* (2019). Plus précisément, nous avons investigué l'adoption d'un profil tolérant et l'expression des gènes nécessaires pour former les îlots et assister le développement des érythroblastes.

Afin d'évaluer l'axe EPO/EPOR/JAK2 chez les MΦ, nous avons aussi utilisé un modèle murin de PV qui se caractérise par la mutation V617F dans le gène de la tyrosine kinase jak2 (Mullally *et al.,* 2010). Cette kinase intracellulaire est associée à des récepteurs comme l'EPOR et rend active leur voie de signalisation de façon constitutive, et ligand indépendante. Il en résulte que ces souris ont un hématocrite élevé qui résulte d'une érythropoïèse exacerbée dans la rate et la splénomégalie. Chez ces souris, l'élimination des MΦ de façon systémique rétablit l'hématocrite et atténue la splénomégalie, indiquant le rôle important que ces cellules jouent dans les symptômes de la PV (Ramos *et al.,* 2013). L'érythropoïèse exacerbée dans la PV partage des similitudes avec l'érythropoïèse de stress qui s'engage chez les souris dans cet organe en cas d'anémie, durant laquelle une autre population de MΦ résidents, les $MΦ_P$ prennent en charge la production de globules rouges (Liao *et al.,* 2018). Traditionnellement, les $MΦ_P$ ont comme fonction l'élimination des érythrocytes sénescents. Nous avons donc évalué la capacité des $MΦ_P$ et $MΦ_C$ à soutenir l'érythropoïèse dans ce modèle de PV.

CHAPITRE 1

ÉTATS DES CONNAISSANCES

1.1 Les macrophages

Les MΦ sont des cellules d'origine myéloïde qui assurent de nombreuses fonctions au sein de l'organisme. Ce type cellulaire à la particularité d'être hautement plastique, lui permettant de jouer des rôles tant dans la défense immunitaire que dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. Les MΦ sont distribués dans l'ensemble du corps et ont des fonctions toutes aussi variées que les tissus dans lesquels ils se retrouvent (Gordon et Plüddemann, 2017). Entre autres, les MΦ soutiennent la production et destruction de globules rouges. Dans la moelle osseuse, des $MΦ_C$ procurent une niche aux érythroblastes, tandis qu'à la fin de la vie des globules rouges, ce sont les $MΦ_P$ qui les éliminent, et les actions de ces deux populations myéloïdes sont coordonnées afin de garantir une balance adéquate en érythrocytes (Klei *et al.*, 2017).

1.1.1 Le développement des macrophages

Les MΦ dérivent de cellules hématopoïétiques dans la moelle osseuse, engagées dans la voie de différentiation myéloïde et monocytaire. Les cellules souches hématopoiétique (HSC) répondent au *stem cell factor 1* (SCF-1) dans les niches hématopoïétiques et génèrent par division asymétrique, des précurseurs myéloïdes communs (CMP), aussi appelés *Colony forming unit – Granulocytes Erythroids Monocytes and megakaryocytes* (CFU-GEMM). Ces derniers sont pluripotents et peuvent donner lieu à tous les types de cellules myéloïdes. Au stade suivant, ils deviennent des précurseurs de granulocytes et MΦ (GMP), aussi appelés CFU-GM. Ces cellules maintiennent leur pluripotence, pouvant générer des monocytes, neutrophiles ou cellules dendritiques (Trzebanski et Jung, 2020), à partir du stade de progéniteurs de monocytes et cellules dendritiques (MDP). Ce n'est qu'en présence du facteur de croissance M-CSF ou GM-CSF que ces précurseurs deviennent des CFU-M. Ces facteurs de croissance activent des voies de signalisation PI3K-Akt et MEK-ERK qui mènent au remodelage du cytosquelette, l'adhésion cellulaire, la survie et la prolifération (Kurotaki *et al.*, 2017).

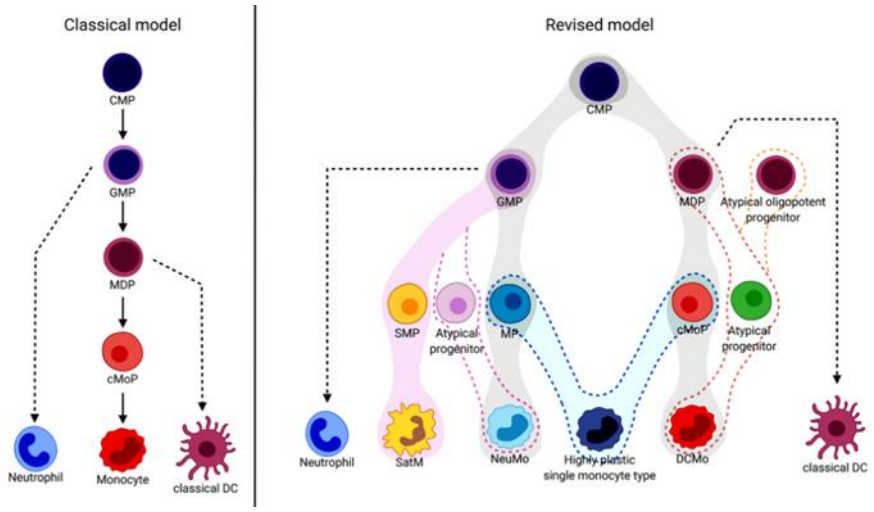

Figure 1.1 Modèles de développement des macrophages

Dans le modèle classique, les précurseurs myéloïdes traversent les stades GMP et MDP avant de devenir des monocytes. Dans le modèle révisé, Les CMP s'engagent soit en GMP qui aboutit à des monocytes de type neutrophile où il se spécialise en MDP qui donne des monocytes de types dendritiques. Figure tirée de Trzebanski et Jung. (2020)

Ce modèle classique a été révisé à la suite des nouvelles découvertes. Dans un nouveau modèle, le CMP peut devenir un GMP qui donne naissance à des monocytes de type neutrophiles (MP) ou un MDP qui donne naissance à des monocytes de types dendritiques (cMoP) (Figure 1.1). Cette classification provient d'expériences de transplantations qui montrent que les GMP se différencient en neutrophiles ou monocytes et les MDP en cellules dendritiques ou monocytes. Ils expriment les mêmes marqueurs, mais leurs transcriptomes diffèrent l'un de l'autre, se rapprochant de celui des neutrophiles ou cellules dendritiques, respectivement (Yáñez *et al.*, 2017) Ces monocytes entrent dans la circulation où leur destinée dépend des signaux et des signaux des niches de différents organes et tissus qu'ils rencontreront. Laissés à eux-mêmes, ces monocytes ont une demi-vie d'environ 20h (Trzebanski et Jung, 2020).

En cas d'inflammation, les monocytes sont recrutés et répondent à différents signaux pour combattre l'invasion par des pathogènes en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et en phagocytant des intrus, ou pour réparer des tissus et éliminer les corps apoptotiques et débris cellulaires (Guilliams *et al.*, 2018). Dans d'autres circonstances, les monocytes peuvent intégrer des niches au sein de différents organes et tissus en présence de signaux relâchés par des cellules locales. Ce processus permet leur différenciation en MΦ résidents, si une niche est accessible (Guilliams et Scott, 2017).

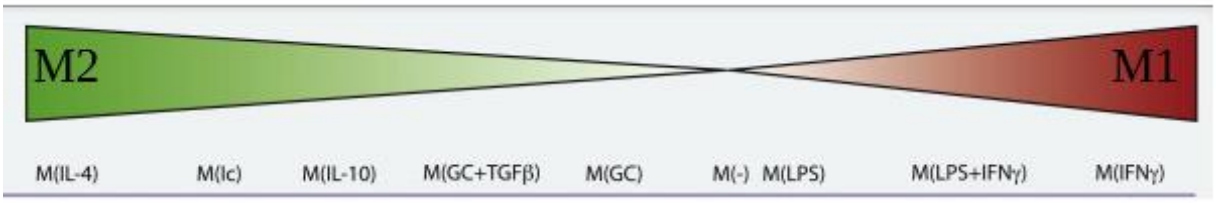

Figure 1.2 Modèle de polarisation M1 et M2 des macrophages sur un spectre

L'activation des MΦ vers un profil M1 pro-inflammatoire (droite) et M2 anti-inflammatoire (gauche) se catégorise sur un spectre d'intensité, selon les signaux d'activations. Ainsi, un MΦ activé avec IFN-γ est plus pro-inflammatoire qu'un MΦ activé avec LPS. De plus, ce modèle permet de mieux expliquer la plasticité des MΦ. Ainsi un MΦ M2 peut tout de même répondre au LPS et devenir M1. Figure adaptée de Murray et al. (2014).

1.1.2 La polarisation M1 et M2

La plasticité des MΦ se réfère à leur capacité de devenir des cellules pro-inflammatoires en réponse à des pathogènes envahisseurs, pour engager une réponse immunitaire, ainsi que de réparer des dommages tissulaires et éliminer des cellules apoptotiques, dans un état considéré comme tolérant ou anti-inflammatoire (Lawrence et Natoli, 2011). La classification des MΦ en M1 pro-inflammatoire et M2 anti-inflammatoire est utile pour caractériser leurs fonctions à la suite de stimuli précis. Cette nomenclature s'inspire de celle des cellules T auxiliaires Th1 et Th2 dues à la similitude des cytokines polarisant leur phénotype, soit les IFN de type I et II pour M1, et l'interleukine 4 (IL-4) et l'IL-13 pour M2. (Murray *et al.*, 2014). Historiquement, les états d'activation M1 et M2 étaient vus comme des catégories à part afin de définir la polarisation du MΦ à la suite de son activation (Stein *et al.*, 1992). Des travaux récents montrent plutôt que l'activation des MΦ s'explique mieux avec un modèle basé sur un spectre, avec la polarisation M1/M2 de part et d'autre (Figure 1.2). Plus précisément, les MΦ ne passent pas d'un état M1 à M2 subitement ; cette transition se fait progressivement et est dépendante du stimulus qui est à l'origine de la stimulation. Ainsi, un MΦ activé par le lipopolysaccaride (LPS) penche vers le profil M1, mais sera dans un état moins pro-inflammatoire qu'un MΦ activé avec de l'IFN-γ et LPS (Murray *et al.*, 2014).

1.1.2.1 Activation classique M1

L'activation classique M1 des MΦ se caractérise par l'adoption d'un profil pro-inflammatoire, permettant l'élimination des pathogènes dans l'organisme. Cet état d'activation est caractérisé par une reprogrammation métabolique vers la glycolyse (Viola et al., 2019). Le lipopolysaccharide (LPS) bactérien

est la molécule la plus utilisée lors des essais de polarisation M1 (Mosser et Edwards, 2008). La présence de LPS est rapidement détectée par le récepteur de type Toll 4 (TLR-4) qui engage une voie de signalisation via la protéine de domaine 88 (MYB88) et mène à l'activation et l'entrée du facteur nucléaire kappa B (NF-κβ) dans le noyau. Ce facteur de transcription stimule l'expression de gènes pro-inflammatoires comme l'enzyme synthase du monoxyde d'azote inductible (iNOS), et les cytokines pro-inflammatoires comme le *tumor necrosis factor alpha* (TNF-α), IL-12 et IL-15 (Orecchioni et al., 2019). Parmi les marqueurs membranaires, les protéines co-stimulatrices B7.1 et B7.2 (CD80 et CD86) sont aussi surexprimées chez les cellules polarisées vers le phénotype M1 (Liu et al., 2020).

L'IFN-γ est aussi une cytokine polarisante M1. Le récepteur d'IFN-γ est associé à un hétérodimère JAK1/JAK2 qui s'autophosphoryle en présence du ligand. Ceci permet l'activation par phosphorylation de STAT1 et son exportation au noyau, afin d'exprimer des gènes pro-inflammatoires tels le TNF-α, l'IL-6 et l'IL-12, ainsi que l'enzyme iNOS (Zhou et al., 2014). La voie de signalisation JAK/STAT est modulée par des protéines régulatrices comme le Supressor of cytokine signaling 1 (SOCS1), un puissant régulateur de la polarisation M1. Sa présence inhibe la production d'oxyde nitrique et d'IL-6 même en présence de LPS (Whyte et al., 2011).

1.1.2.2 Activation alternative M2

À l'opposé des cellules M1, les MΦ M2 sont caractérisés par l'adoption d'un profil anti-inflammatoire qui permet la réparation des tissus et le maintien de l'homéostasie. La cytokine polarisante M2 la plus étudiée est l'IL-4 (Murray et al., 2014). Son récepteur existe sous trois formes selon les associations de différentes chaînes. Le type 1 se trouve sur les cellules T et NK, le type II sur les fibroblastes et le type III sur les cellules B et les MΦ. Le type III est composé des chaînes IL4rα, IL13rα et IL2rγc et est associé à un hétérodimère JAK1/JAK3 qui mène à la phosphorylation de STAT6 (Suzuki et al., 2015). Comme pour STAT1, STAT6 phosphorylé entre dans le noyau, mais permet la production de cytokines anti-inflammatoires telles l'IL-10, et de molécules anti-apoptotiques comme bcl-2. STAT6 mène aussi à l'expression du récepteur de mannose (CD206) et de l'enzyme arginase I (Arg-1) (Lawrence et Natoli, 2011). L'utilisation préférentielle de l'arginine par l'Arg-1 est un marqueur important de la polarisation M2 et mène à un métabolisme de type anabolique, par la production d'urée (Orecchioni et al., 2019).

Le modèle sur spectre explique mieux la plasticité observée chez les MΦ. Ainsi, un MΦ M2 peut quand même devenir pro-inflammatoire en présence de LPS, mais des changements d'expression génique et de métabolisme doivent s'opérer avant, faisant de lui une cellule plus tolérante (Murray et al., 2014).

1.1.3 Les MΦ résidentiels et les niches

Certains MΦ appelés résidents occupent des niches au sein de différents tissus et organes où ils jouent des rôles particuliers en fonction de cet endroit. Ces MΦ sont classifiés comme de type M2 et maintiennent l'homéostasie tissulaire (Davies et al., 2013). Les organes ou tissus que ces MΦ occupent comportent des microenvironnements qui forment des niches uniques, caractérisées par les cellules qui l'occupent et les facteurs qu'elles sécrètent. De plus, les niches peuvent être accessibles ou pas aux MΦ en circulation (Guilliams et Scott, 2017). Dans les niches accessibles, comme celle des poumons occupés par des MΦ alvéolaires, des monocytes en circulation générés dans la moelle osseuse peuvent s'y intégrer et adopter le phénotype de MΦ alvéolaire (van de Laar et al., 2016). La moelle osseuse et la rate contiennent des MΦ résidents qui occupent des niches accessibles (Guilliams et Scott, 2017) (Figure 1.3). Ce travail porte sur deux populations de MΦ résidents intimement lié aux globules rouges, soit les MΦC de la moelle osseuse et les $MΦ_P$ dans la rate (Klei et al., 2017).

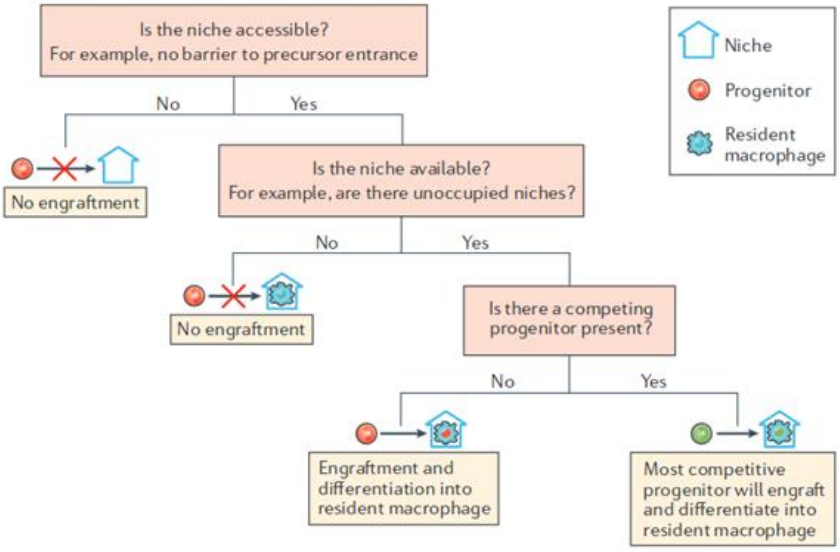

Figure 1.3 Le modèle de niche pour les macrophages résidents

Selon ce modèle, il y a deux types de niches. Si non accessible, les monocytes ne peuvent pas s'installer dans la niche. Cependant, si la niche est accessible et non occupée, les progéniteurs peuvent s'y installer et se différencier en MΦ résidents en réponse aux signaux du micro-environnement.

1.2 Érythropoïèse par les macrophages centraux et de la pulpe rouge

1.2.1 L'érythropoïèse basale

L'érythropoïèse est le processus par lequel des millions de globules rouges sont produits quotidiennement afin d'assurer l'apport en oxygène à tous les organes de l'organisme et de remplacer les érythrocytes sénescents éliminés dans la pulpe rouge de la rate. Chez la souris, ce processus se passe principalement dans la moelle osseuse, mais une érythropoïèse secondaire se déroule tout de même dans la rate (Chasis et Mohandas, 2008). Les CMP C-Kit+ CD71+ s'engagent dans la voie érythroblastique et deviennent des BFU-E. À ce stade, ces cellules commencent à exprimer l'EPOR et sont sensibles à l'EPO. L'activation d'EPOR enclenche une prolifération et donne des colonies de CFU-E qui expriment fortement l'EPOR et CD71 (Wu et al., 1995). À ce stade, ces cellules commencent à synthétiser l'hémoglobine et continuent de se diviser afin de devenir des proérythroblastes qui expriment Ter119. Ils s'associent avec un $M\Phi_C$ afin de former un îlot érythroblastique et continuer leur maturation avec leur assistance (Marsee et al., 2010). Ils passent à travers trois stades de développement. En ordre de développement, ces stades sont les érythroblastes basophiles (ÉryA), les érythroblastes polychromatiques (ÉryB) et les érythroblastes orthochromatiques/réticulocytes (ÉryC). Les ÉryA sont des cellules Ter119^{high} CD71+ de grande taille, les ÉryB sont Ter119^{high} CD71+ de petite taille et les ÉryC sont Ter119^{high} CD71- et plus petites que les ÉryB selon la classification de Liu et al. (2006). L'énucléation marque la transition vers le stade de réticulocyte où ils quittent la moelle osseuse et finissent leur maturation en érythrocyte en perdant progressivement l'expression de CD71 (Keerthivasan et al., 2011).

1.2.2 L'érythropoïèse de stress

En condition d'anémie, la demande en oxygène est plus grande que ce que les érythrocytes procurent. Il en résulte une érythropoïèse de stress qui est caractérisée par une production plus importante de globules rouges afin de répondre à la demande en oxygène. Chez la souris, ce processus s'effectue dans la rate à la suite d'une hausse de production d'EPO par les reins (Paulson et al., 2020). L'EPO engage les CMP dans la voie érythroblastique, mais il existe des populations distinctes de ces précurseurs dans la moelle et la rate (Paulson et al., 2011). En condition de stress, une population de précurseurs c-kit+ Sca-1- Lin- CD34+ est générée dans la moelle osseuse et migre vers la rate afin de produire des BFU-E de stress. Ces cellules sont plus efficaces que les BFU-E en condition basale, car elles se divisent plus rapidement afin d'atteindre les stades érythroblastiques plus rapidement (Xiang et al., 2015). Autant pour l'érythropoïèse basale que celle de stress, les MΦ sont nécessaires pour assurer la maturation des érythroblastes.

1.2.3 Le macrophage central et l'îlot érythroblastique

Au cœur de chaque îlot érythroblastique se trouve un $M\Phi_C$ qui a comme rôle d'assister la maturation des érythroblastes. Pour ce faire, il joue trois rôles importants. Premièrement, il exprime des intégrines qui agissent comme molécule d'adhésions telles CD106, CD163 et CD169 afin d'assurer l'intégrité de l'îlot. De plus, la liaison des érythroblastes via ces intégrines engage des voies de signalisation nécessaire pour le développement des érythroblastes (Rhodes et al., 2008). Deuxièmement, il sécrète des facteurs de croissance comme l'*insulin growth factor* 1 (IGF-1) qui augmente la production du facteur de transcription E2F-2 chez les érythroblastes. Ce facteur agit en synergie avec GATA-1, un facteur de transcription induit par l'EPO, afin d'assurer leur prolifération et différenciation (Muta et al., 1994). Finalement, un rôle potentiel du $M\Phi_C$ est de fournir le fer aux érythroblastes en maturation en captant la transferrine par CD71 afin de le rendre disponible aux érythroblastes en maturation. (Kadri et al., 2015 ; Leimberg et al., 2008). Outre leur apport à la maturation des érythroblastes, ils sont aussi responsables d'éliminer par phagocytose les cellules qui entrent en apoptose, ainsi que les noyaux énucléés des réticulocytes (Sadahira et Mori, 1999). Une étude récente à mis en évidence que les MΦ qui formaient des îlots comportant un plus grand nombre d'érythroblastes exprimaient fortement l'EPOR (Li et al., 2019). L'analyse du transcriptome de ces cellules montre deux tendances. Premièrement, ils surexpriment toutes les protéines mentionnées plus haut. Deuxièmement, ils ont un profil tolérant, car ils sous-expriment des catégories de gènes associés au profil M1 comme la réponse au LPS et la réponse immunitaire innée.

1.2.3.1 Le rôle des molécules d'adhésions

CD106 est une intégrine de 90 kDa qui se lie avec *intracellular adhesion molecule 4* (ICAM-4) exprimée sur les érythroblastes. Elle est essentielle à l'intégrité des îlots, car les $M\Phi_C$ ne produisent pas d'îlots quand ils sont incubés avec des anticorps bloquant CD106 (Sadahira et Mori, 1999). De plus, l'inhibition d'ICAM-4 par des peptides neutralisants réduit le nombre d'érythroblastes dans les îlots (Spring et al., 2001) et des souris KO pour ce gène ont une perte de plus de 50% de leurs îlots érythroblastiques dans la moelle osseuse (Lee et al., 2006). Dans ces deux cas, les souris souffrent d'anémie.

CD163 est une protéine transmembranaire de 130kDa exprimée spécifiquement par les MΦ. Elle est responsable de capter les complexes haptoglobine-hémoglobine qui se forment quand les érythrocytes relâchent l'hémoglobine (Etzerodt et Moestrup, 2013). Un groupe de chercheurs a montré que des anticorps spécifiques à CD163 inhibent la liaison des érythroblastes aux $M\Phi_C$. De plus ils démontrent que

la culture d'érythroblastes avec un peptide agoniste de CD163 augmente le nombre d'érythroblastes *in vitro* (Fabriek et al., 2005).

Quant à elle, CD169 est une protéine transmembranaire d'environ 185kDa qui assure l'adhésion des érythroblastes en se liant aux chaînes de sucre contenant l'acide sialique (Crocker et Gordon, 1989). Chez des souris traitées avec le facteur de croissance de colonie granulocytes (G-SCF) l'élimination des MΦ CD169+ est stimulée, et cause une inhibition subséquente de l'érythropoïèse dans la moelle osseuse (Jacobsen et al., 2014). CD169 semble jouer un rôle moins essentiel que CD106, car son élimination dans un modèle murin KO réduit le nombre d'érythroblastes dans la moelle osseuse sans pour autant causer une anémie chez la souris (Chow et al., 2013). De plus, il est rapporté que CD106 joue un rôle dans la rétention des cellules souches hématopoïétiques dans les niches hématopoïétiques de la moelle osseuse (Chow et al., 2011).

1.2.4 Les macrophages de la pulpe rouge

La fin de vie des érythrocytes est marquée par leur élimination dans la rate par les $M\Phi_P$. Cette population de cellules F4/80+ émet une auto-fluorescence à 525nm lorsqu'excitée avec un laser bleu en raison de leurs fortes concentrations en biliburdine et de porphyrine qui résulte de la dégradation de l'hème (Mitchell et al., 2010). Pour ce faire, les MΦp expriment fortement l'hème oxygénase 1 (HO-1), une enzyme impliquée dans la dégradation de l'hème pour générer aussi du monoxyde de carbone (CO) et du fer, afin de recycler ce dernier (Klei et al., 2017).

La pulpe rouge de la rate agit comme un filtre avec des mèches contenant les $M\Phi_P$. Avec l'âge, les GR sénescents perdent leurs flexibilités et ne parviennent pas à passer à travers les mèches de la pulpe rouge. C'est à ce moment qu'ils sont éliminés par les $M\Phi_P$ avoisinants (Mebius et Kraal, 2005). De plus, les $M\Phi_P$ jouent aussi des rôles dans la réparation des GR en éliminant les corps d'inclusions générés par l'accumulation de dommages causée par les espèces réactives d'oxygène (ROS) (Klei et al., 2017).

Les $M\Phi_P$ sont aussi responsables de former des îlots afin d'assurer l'érythropoïèse basale et de stress dans la rate (Lévesque et al., 2021). Leurs analyses de transcriptomes montrent qu'ils expriment plusieurs gènes en commun avec les $M\Phi_C$ de la moelle comme les molécules d'adhésion CD106, CD163 et CD169 ainsi que le récepteur de transferrine CD71 et le facteur de croissance IGF-1 (Gautier et al., 2012). Comme mentionné plus haut, ces gènes sont essentiels pour la formation des îlots érythroblastiques et le

développement des érythroblastes. L'acquisition du profil des $M\Phi_P$ dépend du facteur de transcription SpiC qui est fortement exprimé en présence d'hème lorsqu'ils phagocytent les érythrocytes sénescents (Kohyama et al., 2009). Par contre, dans la moelle, les événements qui font en sorte qu'un MΦ naïf prend en charge le rôle de $M\Phi_C$ sont méconnus. Un des objectifs de ce projet était d'explorer un mécanisme impliquant la voie EPO/EPOR/JAK2 impliqué dans l'adoption de ce rôle chez les MΦ.

1.3 Le conditionnement des macrophages avec le milieu apoptotique

L'érythropoïèse est un processus permanence actif afin d'assurer le remplacement constant des érythrocytes sénescents éliminés dans la rate. Cependant, la génération d'érythrocytes est finement régulée par l'expression du récepteur Fas et son ligand FasL chez les érythroblastes. L'activation de cette voie mène à l'apoptose des érythroblastes via la caspase 3 (De Maria et al., 1999). Ce mécanisme de contrôle fait en sorte que la niche érythroblastique est un lieu de forte apoptose et pourrait ainsi moduler les fonctions des $M\Phi_C$. Plus précisément, une étude a montré que le contact des MΦ péritonéaux avec des cellules apoptotiques engage une voie de signalisation *Hypoxia induced factor 1 alpha* (HIF-1α) dépendante menant à l'expression de l'EPO. Cette EPO agit ensuite de manière autocrine afin de rendre le MΦ tolérant et surexprimant des molécules impliquées dans l'élimination de cellules apoptotiques (Luo et al., 2016). En parallèle, l'axe EPO/EPOR/Jak2 est possiblement impliquée dans les fonctions du $M\Phi_C$ puisqu'il se trouve aussi dans un milieu riche en cellules en apoptose.

1.3.1 Composition du milieu apoptotique

Les cellules apoptotiques peuvent affecter les MΦ entre autres de deux façons. Premièrement, elles expriment des molécules de surface qui diffèrent des cellules saines. Deuxièmement, elles possèdent un sécrétome complexe. Dans les deux cas, ces molécules jouent le rôle de signaux ''trouve-moi/mange-moi'' afin que les MΦ les éliminent rapidement (Ravichandran, 2011).

Les cellules apoptotiques relâchent trois types de vésicules qui diffèrent en taille. Les corps apoptotiques sont les plus gros avec une taille de 0.05µm à 5µm. Ensuite, les microvésicules ont une taille intermédiaire allant de 0.1µm à 1µm. Finalement, les exosomes sont les vésicules les plus petites allant de 30 à 150nm (Kakarla et al., 2020). Plusieurs molécules sécrétées sont reconnues comme bioactives. Parmi elles, on retrouve des phospholipides telles la sphingosine-1-phosphate (S1P) (Luo et al., 2016), la phosphatidylsérine (PS) (Fadok et al., 1998) et la lysophosphatidylcholine (LPC) (Lauber et al., 2003), et des

protéines comme la chimiokine fractalkine (Truman et al., 2008) et les nucléotides adénine et uraciles (Elliott et al., 2009).

Autant les cellules apoptotiques que leur sécrétome peuvent affecter les MΦ. Par exemple, l'ATP extracellulaire agit comme chimioattractant pour les MΦ, mais induit l'adoption d'un phénotype M1 pro-inflammatoire (Wang et al., 2021). Cependant, l'exposition à la PS à la surface des exosomes de thymocytes (Chen et al., 2019) et de neutrophiles (Eken et al., 2013) est capable de polariser les MΦ vers un profil M2 tolérant. Dans une autre étude, le contact direct entre les MΦ péritonéaux et des thymocytes apoptotiques était suffisant pour les conditionner via le récepteur CD36 et le faire adopter un profil tolérant (Chung et al., 2007).

1.3.1.1 La sphingosine-1-phosphate

Parmi les molécules actives générées par les cellules apoptotiques, la S1P est particulièrement intéressante. Il s'agit d'un sphingolipide bioactif, agissant comme médiateur et impliqué dans le trafic cellulaire des leucocytes, la différenciation des lymphocytes et des effets anti-apoptotiques (Tsai et Han, 2016). La S1P est produite par la phosphorylation de la sphingosine et est catalysée par la sphingosine kinase (Sphk) 1 ou 2. Sa dégradation peut être catalysée de façon réversible par la sphingosine phosphatase (SPP) 1 et 2, ou de façon irréversible par la sphingosine lysase (SPL) (Aoki et al., 2016). Plusieurs cellules expriment les kinases et agissent comme source de S1P qui peut alors agir de façon autocrine ou paracrine (Maceyka et al., 2012). Il existe 5 formes du récepteur de la S1P (S1PR1-5) qui sont toutes exprimées chez les MΦ, quoique de façon hétérogène, selon les types (Weigert et al., 2006). C'est via l'activation de S1PR1 que les MΦ du péritoine produisent de l'EPO via l'activation du HIF-α (Luo et al., 2016). De plus, un modèle de souris qui exprime S1PR1 fusionné à la GFP démontre que les $MΦ_P$ endocytent davantage le S1PR1, comparés à ceux de la pulpe blanche, indiquant une plus grande disponibilité de S1P dans la pulpe rouge (Ramos-Perez et al., 2015). Étant donné que les îlots érythroblastiques sont des lieux caractérisés par une forte apoptose (Liu et al., 2006), ces données indiquent un lien possible entre les cellules apoptotiques et l'axe EPO/EPOR/JAK2 dans le rôle des $MΦ_C$ et les $MΦ_P$.

1.4 L'axe EPO/EPOR/JAK2

L'EPO est une hormone de 34kDa qui joue un rôle clé dans l'engagement des CMP dans la voie érythroblastique. Cette hormone est produite principalement par les reins en condition basale (Jelkmann,

2011). Cependant, de plus en plus d'évidences semblent indiquer que les MΦ aussi peuvent produire cette hormone (Luo et al., 2016, 2019 ; Perron-Deshaies et al., 2020).

1.4.1 La signalisation JAK/STAT de l'EPOR

L'EPO agit sur les cellules qui expriment l'EPOR en se liant à ce récepteur et en engagent des voies de signalisations JAK/STAT menant à la prolifération, la survie et la différenciation (Recio et al., 2019). L'action spécifique de cette voie sur les érythroblastes et les MΦ sera couverte à continuation.

L'EPOR est associé à un homodimère JAK2, une kinase intracellulaire qui s'autophosphoryle au niveau de différents résidus tyrosines quand l'EPO se lie au récepteur. Parmi ceux-ci, la phosphorylation des tyrosines 343 et 401 sont nécessaires pour recruter les facteurs de transcription de la famille STAT et les phosphoryler afin qu'ils se dimérisent (Zang et al., 2001). C'est sous cette forme de dimère que les STAT sont tranlocalisées dans le noyau afin de changer l'expression génique de la cellule cible (Halim et al., 2020). La voie JAK2 est modulée par des phosphatases comme la protéine tyrosine phosphatase 1 ($SHP^{-}1$) qui est recrutée par la phosphorylation de la tyrosine 429 de JAK2 (Constantinescu et al., 1999). Une autre protéine impliquée dans la régulation de JAK2 est la SOCS-1. Cette protéine est recrutée à la tyrosine 1034 et est capable d'inhiber directement JAK2 est bloquant son site actif avec son domaine d'inhibition de kinase (Liau et al., 2018). Les dimères STAT dans le noyau font la transcription du gène de SOCS-1, permettant la rétro-inhibition de la voie JAK/STAT (Figure 1.4) (Recio et al., 2019).

1.4.2 Effets de l'EPO sur les érythroblastes

L'EPO est une hormone clé dans l'engagement des CMP dans la voie érythroblastique. L'expression de l'EPOR débute chez les BFU-E et l'activation par l'EPO engage les voies de signalisations nécessaires pour leurs survies leurs proliférations et leur différenciation dans les stades érythroblastiques (Wu et al., 1995). L'expression d'EPOR s'arrête aux stades d'ÉryC et réticulocytes de sorte qu'ils sont insensibles à l'EPO (Kieran et al., 1996). Parmi les voies de signalisation, la cascade enclenchée par JAK2/STAT5 module l'expression du facteur de transcription GATA-1. Ce facteur est important pour la survie des érythroblastes, car il augmente la production d'EPOR et de la protéine *B cell lymphoma extra large* (Bcl-Xl), une protéine anti-apoptotique qui assure la survie des érythroblastes tout au long de leurs développements (Cheung et Miller, 2001).

1.4.3 Effets de l'EPO sur les macrophages

Les effets de l'EPO sur les MΦ ont été moins bien caractérisés que ceux exercés sur les érythroblastes. Des problèmes de détection de l'EPOR avec des anticorps commerciaux non spécifiques est une cause importance de ces lacunes dans la littérature (Elliott et al., 2006). L'information a été rendue maintenant disponible grâce à des modèles transgéniques qui expriment des protéines fluorescentes fusionnées à l'EPOR sous le contrôle du promoteur endogène. Ces modèles montrent clairement que les MΦ comme les $MΦ_C$ (Li et al., 2019) et les $MΦ_P$ (Zhang et al., 2021) expriment l'EPOR.

Des études sur l'effet de l'EPO sur les MΦ montrent que cette protéine induit la survie, la prolifération et la tolérance chez ces cellules. Chez des souris injectées avec des liposomes de clodronate, l'injection d'EPO permet la survie d'un plus grand nombre de MΦ dans la rate et la moelle osseuse (Perron-Deshaies et al., 2020). En ce qui concerne la prolifération, les souris tg6 qui surexpriment l'EPO, ainsi que les des souris sauvages injectées avec EPO ont un nombre plus grand de MΦ dans la rate (Lifshitz et al., 2010). Dans notre laboratoire, nous avons aussi constaté une hausse de MΦ dans la rate et la moelle osseuse à la suite de l'injection d'EPO chez des souris sauvage sans déplétion avec clodronate (données non publiées). Comme mentionné plus haut, cette prolifération s'observe aussi chez les érythroblastes et indiquent probablement des voies de signalisation commune entre les deux types cellulaires. Finalement, plusieurs études montrent que l'injection d'EPO *in vivo* ou le conditionnement des MΦ avec EPO *in vitro* induit un profil tolérant chez ces cellules. Le conditionnement des MΦ du péritoine (Cui et al., 2018 ; Luo et al., 2016, 2019 ; Zhou et al., 2020) et de la lignée cellulaire RAW 264.7 (Luo et al., 2016) avec l'EPO conduit à moins de cytokines pro-inflammatoires tel le TNF-α, l'IL-6, L'IL-12 et de nitrite (NOS) à la suite de leur exposition aux à des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) et des motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP). De plus, ces MΦ tendent à exhiber un profil M2 via l'expression de CD206 et de l'arginase, la surexpression d'IL-10 et la sous-expression du récepteur TLR4. Dans un modèle de néovascularisation choroïdale, l'activation de la voie de signalisation d'EPOR chez les MΦ favorise leurs proliférations ainsi que l'adoption d'un profil M2 par l'expression de CD206 (Bretz et al., 2018). De plus, il a été démontré que l'EPO peut agir comme chimioattractant en favorisant leur migration en co-culture avec des fibroblastes qui expriment l'EPO dans un système de transwell (Han et al., 2021). La seule exception à l'adoption d'un profil chez les MΦ en présence d'EPO a été notée chez le groupe de Neumann chez des BMDM. Selon leur étude, ces cellules produisaient plus d'IL-12 et de NOS et moins d'IL-10 à la suite de leur traitement avec de l'EPO et de LPS simultanément (Lifshitz et al., 2010). Il est rapporté que l'activation de la voie de signalisation JAK2/STAT est engagée chez les MΦ en présence d'EPO, et plus

particulièrement, la phosphorylation de JAK2 (Cui et al., 2018 ; Luo et al., 2016) et des STAT 1, 3 et 5 (Chen et al., 2020 ; Cui et al., 2018 ; Lifshitz et al., 2010). Ces études mettent en évidence l'importance de l'axe EPO/EPOR/JAK2 dans la modulation des MΦ et son implication potentielle dans l'adoption d'un rôle pro-érythropoïétique chez ce type cellulaire.

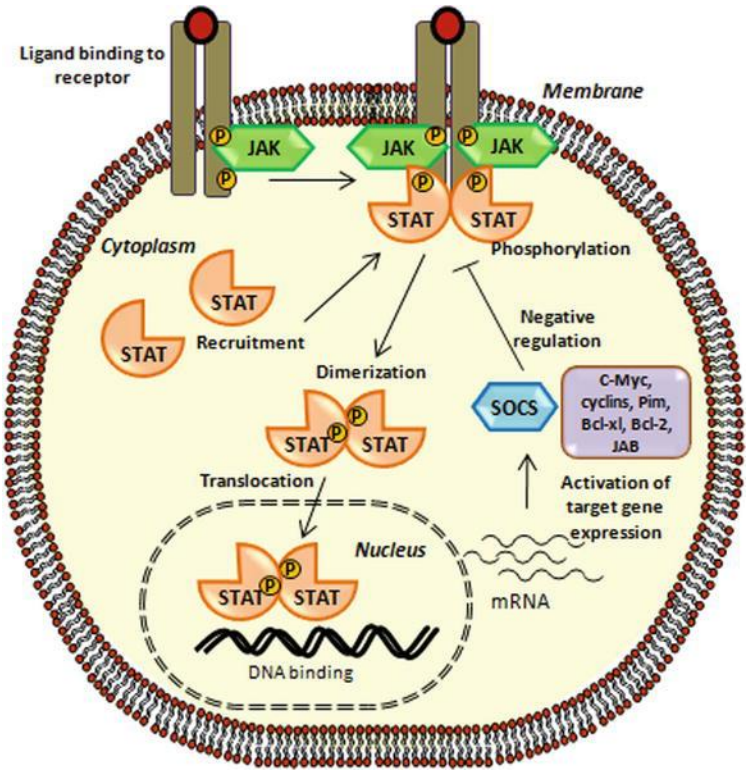

Figure 1.4 La voie de signalisation JAK/STAT

Les récepteurs associés aux JAK comme le récepteur d'érythropoïétine causent une phosphorylation de JAK lors de leur association avec le ligand. Ceci permet le recrutement de protéines STAT qui se dimérisent, entrent dans le noyau et participent à la transcription de gènes impliqués dans la prolifération et dans la régulation négative de la voie. Figure tirée de Recio et al. (2018).

1.5 La polycythémie vera comme modèle d'EPOR actif constitutivement

La PV est une forme de cancer rare qui se caractérise par un hématocrite élevé, une splénomégalie et le développement de néoplasmes myéloprolifératifs. Plus de 80% des cas de cette maladie sont causés par une mutation ponctuelle du gène de Jak2 qui substitue le résidu valine 617 de l'exon 14 pour une phénylalanine (JAK2VF). Il en résulte que JAK2 s'autophosphoryle de façon ligand indépendante, rendant l'EPOR actif de façon constitutive (Lippert et al., 2006). Chez les personnes atteintes de cette maladie, l'activation constitutive d'EPOR par la mutation force les précurseurs myéloïdes dans la voie érythroblastiques (Le et al., 2019). Il en résulte une érythropoïèse exacerbée dans la rate. Cette maladie est principalement traitée par phlébotomie afin d'éliminer des érythrocytes, mais des inhibiteurs de JAK2 montrent des effets prometteurs dans le traitement de la maladie (Quintás-Cardama et al., 2010). De plus, il est connu que les patients qui souffrent de PV ont une forte production des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α (Fisher et al., 2021).

1.5.1 Les modèles murins de PV

Depuis son identification en 2005, plusieurs modèles murins de PV arborant la mutation V617F ont été créés par divers groupes de chercheurs. Ces modèles utilisent principalement trois stratégies afin d'induire la mutation. Premièrement, l'expression de la mutation chez des cellules de moelles osseuse peut être achevée par la transduction avec des vecteurs viraux, suivis de l'injection de ces cellules dans des souris irradiées Un deuxième système consiste dans la génération de souris transgéniques qui expriment la mutation. Finalement, l'induction de la mutation peut se faire à l'aide des modèles knock-in (Li et al., 2011).

Les premiers modèles murins de PV ont été générés par infection avec des lentivirus qui permettent l'intégration du gène JAK2 muté dans les cellules de moelle osseuse, pour ensuite les transplanter dans des souris irradiées (Lacout et al., 2006 ; Wernig et al., 2006 ; Zaleskas et al., 2006). Ces souris développent une splénomégalie accompagnée d'un hématocrite élevé qui caractérise la maladie. Cette stratégie à l'avantage de générer rapidement des modèles d'expression, mais la nature aléatoire de l'intégration dans le génome peut mener à des variations entre les souris (Li et al., 2011).

Par la suite, des modèles transgéniques ont été développés par l'injection de plasmides contenant toute la région codante du gène jak2 avec la mutation V617F ainsi que la partie 3' non-codante dans le pronoyau d'ovocytes. Ces modèles ont l'avantage d'être stables et permanents, car la mutation est intégrée aux cellules souches de la souris (Xing et al., 2008).

Finalement, des modèles knock-in ont été générées à l'aide du système Cre:lox et de la flippase. Le système cre permet l'excision dans le génome par la recombinase cre des séquences flanquées de site Loxp (Song et Palmiter, 2018). De son côté, le système avec flippase est analogue au système Cre:lox, mais la recombinase flippase reconnait des séquences FRT (flippase recognition target) (Yamada et al., 2014). Dans le contexte de la PV, l'avantage principal de ces souris est que l'expression de JAK2VF peut être restreinte à certains tissus à l'aide de promoteurs tissus spécifiques ou temporellement à l'aide de promoteurs inductibles (Li et al., 2011). Différentes stratégies ont été utilisées afin de générer les modèles knock in de PV (Figure 1.5). Akada et al. (2010) ont introduit une cassette contenant les exons 13 à 24 de JAK2 normal et une cassette contenant un codon stop flanquées de sites LoxP dans l'intron en amont de l'exon contant la mutation JAK2VF. Ces souris expriment une JAK2 normale jusqu'à ce que la cre soit induite avec l'injection de polyinosine:polycytosine (pI:pC) où elle excise les cassettes et permet l'expression de JAK2VF sous son promoteur endogène. Une autre stratégie, employée par Mullally et al. (2010), est d'insérer l'exon 14 sous forme inversée dans l'intron en amont et flanquée de sites Loxp. Le croisement de ces souris avec des souris qui expriment la Cre sous le promoteur E2A permet l'excision de l'exon 14 sauvage et le placement de l'exon 14 mutée dans le bon cadre de lecture sous le promoteur endogène de jak2. De plus, le promoteur E2A est spécifique aux cellules germinales de sorte que JAK2VF est exprimée uniquement dans ces cellules. Une stratégie similaire a été employée par Marty et al. (2010) où une cassette contenant l'exon muté, flanqué par des sites FRT, a été introduite par recombinaison homologue dans l'intron en aval de l'exon 14. Lorsque ces cellules sont croisées avec des souris qui expriment la flippase, la cassette est excisée et la version mutée de JAK2 est exprimée. Finalement, Li et al. (2010) ont généré un modèle knock in en insérant une cassette PGK avec codon stop flanquée de site loxP dans l'exon 2 du gène Jak2VF de sorte que la transcription du gène mutée s'effectue uniquement après l'excision de la cassette suite à l'induction de la cre avec pI:pC.

1.5.2 Le rôle des macrophages dans la PV

La majorité des études sur la PV se sont concentrées sur les érythroblastes. Cependant, la relation intime que les $M\Phi_C$ et les $M\Phi_P$ ont avec les érythroblastes (Klei et al., 2017) ainsi que la confirmation récente qu'ils expriment l'EPOR (Li et al., 2019 ; Zhang et al., 2021) font d'eux des acteurs importants à étudier dans cette maladie. De plus, JAK2 est associée à d'autres récepteurs et est reconnue pour activer de façon constitutive d'autres récepteurs. D'intérêt pour ce projet, le récepteur du GM-CSF fait partie de cette catégorie (Vainchenker et al., 2018). Comme mentionnée plus haut, les $M\Phi_P$ soutiennent une érythropoïèse secondaire en condition basale chez la souris. En cas d'érythropoïèse de stress, la

production d'érythrocytes se fait principalement dans la rate qui est assurée par cette population de MΦ (Shim et al., 2020). Quelques études se sont intéressées à l'impact des MΦ sur les symptômes de la PV. Il est rapporté que l'élimination systémique des MΦ dans le modèle murin de PV rétablit l'hématocrite élevé et renverse la splénomégalie (Chow et al., 2013 ; Ramos et al., 2013). Cependant, ces études n'ont pas évalué le rôle potentiel de la mutation sur l'action pro-érythropoïétique de ces MΦ, car l'expression de l'EPOR par ces cellules a été reporté que récemment.

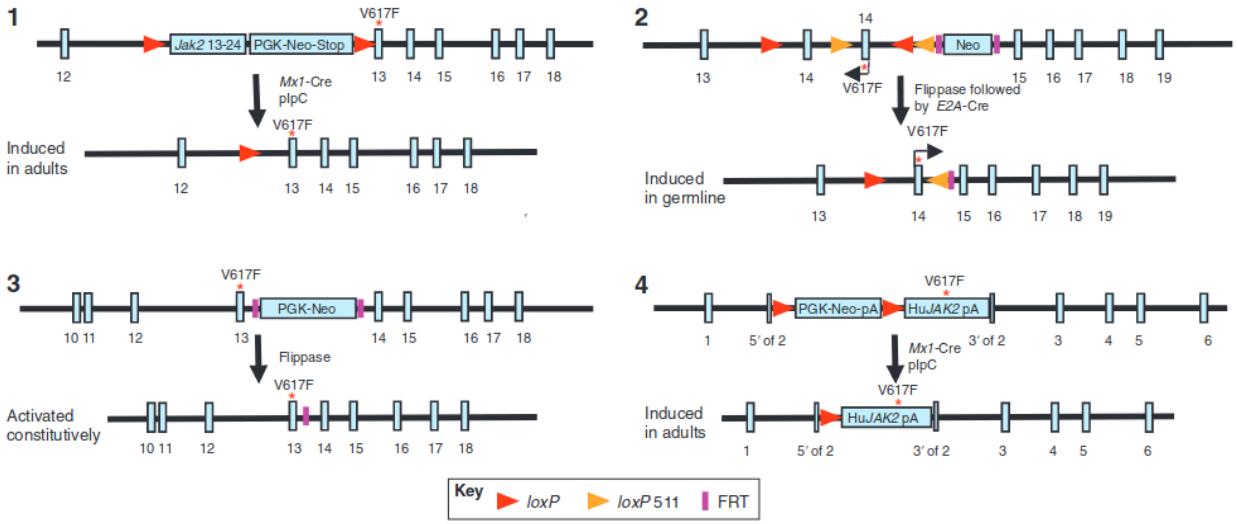

Figure 1.5 Les modèles *knock in* de polycythémie vera

Figure détaillant les stratégies génétiques des 4 modèles murins *knock in* de polycythémie vera. Le modèle de Akada et al. (2010) contient une cassette avec les exons 13 à 24 de Jak2 de type sauvage suivi d'une cassette PGK avec codon stop en aval de l'exon 12 endogène de Jak2^{VF}. Ces cassettes sont flanqués par des sites loxP de sorte que l'induction de la cre avec pI:pC permet l'excision des cassettes et l'expression de la version mutée de Jak2 (1). Le modèle de Mullally et al. (2010) a l'exon 14 contenant la mutation dans l'intron en aval de l'exon 14 sauvage et flanqué de site loxP. L'induction de la cre par le promoteur E2A permet l'excision de l'exon 14 sauvage et le renversement de l'exon 14 avec mutation à sa place dans le bon cadre de lecture (2). Le modèle de Marty et al. (2010) a une cassette PGK avec codon stop entourée de séquence FRT en aval de l'exon contenant la mutation V617F de sorte que l'expression de la flippase excise la cassette et permet l'expression de la version mutée de Jak2 (3). Le modèle de Li contient une cassette contenant le gène Jak2 mutant précédée d'une cassette PGK avec un codon stop qui est flanquée de sites loxP. Ces deux cassettes sont insérées dans un allèle du gène Jak2 endogène de sorte que l'excision de la cassette PGK permet l'expression endogène du gène Jak2^{VF} (4). Figure tirée de Li *et al.* (2011).

1.6 Hypothèses et objectifs

Les MΦ sont surtout reconnus pour leurs fonctions de défense de l'hôte et leurs potentiels pro-inflammatoires. Cependant, il y a une littérature grandissante sur leurs fonctions de maintien d'homéostasie assurée par les diverses populations de MΦ résidents. Des études récentes mettent l'axe EPO/EPOR/JAK2 chez ces populations comme une avenue prometteuse de recherche dans l'adoption d'un profil de $MΦ_C$, un type de MΦ résident essentiel dans l'érythropoïèse. Ainsi, mon projet cadre dans ce champ d'études en effervescence.

Ce projet comportait trois hypothèses :

1. Les BMDM, en présence de cellules apoptotiques où leur sécrétome, produisent de l'EPO et surexpriment l'EPOR, l'EPO exerçant ainsi des actions autocrines.
2. L'activation de l'axe EPO/EPOR/JAK2 chez les BMDMs induit un profil pro-érythropoïétique qui s'apparente à celui des $MΦ_C$.
3. Les MΦ des souris ayant la mutation JAK2VF vont être plus aptes à soutenir l'érythropoïèse exacerbée qui caractérise la PV parce qu'ils adoptent un profil pro-érythropoïétique, s'apparentant aux $MΦ_C$.

Pour répondre à ces hypothèses, les objectifs suivants ont été adressés :

1. Évaluer l'expression d'EPO et d'EPOR chez les BMDMs conditionnées avec les cellules apoptotiques directement ou indirectement.
2. Mesurer l'adoption d'un profil tolérant et l'expression de gènes clés des $MΦ_C$ chez ces BMDMs conditionnés.
3. Explorer l'impact de la mutation JAK2V617F sur les MΦ des souris d'un modèle de PV sur leurs capacités à soutenir l'érythropoïèse en adoptant le profil des $MΦ_C$.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1 Modèles animaux

Les souris BALB/c femelles de 4-6 semaines d'âge ont été obtenues chez Charles River Laboratories (Canada). Des souris JAK2VF des deux sexes ont été générées par croisement des souris B6N.129S6(SJL)-Jak2tm1.2Ble/AmlyJ femelle (JAX #031658) (Mullally et al., 2010) avec des souris mâles B6.FVB- Tg (EIIa-cre) C5379Lmgd/J (JAX#003724) (Lakso et al., 1996). Les génotypes des souriceaux ont été déterminés par PCR à partir d'ADN extrait de tissus d'oreille à l'âge de 4 semaines. Le protocole PCR utilisé par Mullally et al. (2010) consiste en 3 minutes de dénaturation à 95°C, suivi de 35 cycles de 30 secondes à 95°C, 1 minute à 55°C et 1 minute à 72°C. Les amorces sens 5' CGTGCATAGTGTCTGTGGAAGTC 3' et antisens 5' CGTGGAGAGTCTGTAAGGCTCAA 3' ont été utilisés à 50nM final pour le génotypage. Ces amorces ciblent le restant de la cassette contenant la mutation V617F qui est insérée dans l'intron en amont de l'exon 14 après la recombinaison. Tous les animaux ont été hébergés à l'animalerie de l'Université du Québec à Montréal. L'euthanasie a été faite par anesthésie préalable à l'isoflurane suivie d'asphyxie par inhalation de CO_2. Toutes les manipulations ont été approuvées par le Comité institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) et suivent les recommandations du Conseil canadien de Protection des Animaux (CCPA) (protocoles 01518-944, 1er mai 2018 et 0519-944, 1er mai 2019).

2.2 Génération des BMDM et des SPDM

Les souris âgées de 6-8 semaines ont été sacrifiées selon les normes d'éthiques. Pour générer les BMDM, la moelle osseuse des tibias et des fémurs a été récupérée par centrifugation et la suspension cellulaire a été mise en culture dans un P25 de culture pendant 16h dans du DMEM (Wisent) complet : 10% SVF (Northbio) et 100U/mL d'antibiotiques (Wisent). Le lendemain, les cellules non adhérentes ont été récupérées et misent en culture à une concentration de $0{,}375.10^6$ cellules par mL dans du DMEM complet supplémenté de 25% de milieu d'exsudat de lignée fibroblastique L929 comme source de M-CSF. Pour les analyses de cytométrie en flux, des pétris non traités de 100mm (Fisher) ont été utilisés. Des plaques de 6, 24 et 96 puits traités (Sarstedt) ont été utilisées pour la récupération des protéines et ARN totaux, les ELISA et la co-culture de MΦ avec des cellules souches hématopoïétiques, respectivement. Les cellules ont été gardées en culture pendant 7 jours avec un changement de milieu au jour 3 afin de générer une

population hautement pure en MΦ mature caractérisées par l'expression des marqueurs CD11b et F4/80 (Figure 2.1).

Pour générer les macrophages dérivés de la rate (SPDM), les rates des souris sacrifiées ont été récupérées, broyées mécaniquement et filtrées dans une passoire de 70 microns. La suspension cellulaire a été mise en culture 16h. Les cellules non adhérentes ont ensuite été récupérées, ensemencées à une concentration de 106 cellules par mL et traitées dans les mêmes conditions que les BMDM mentionnés plus haut.

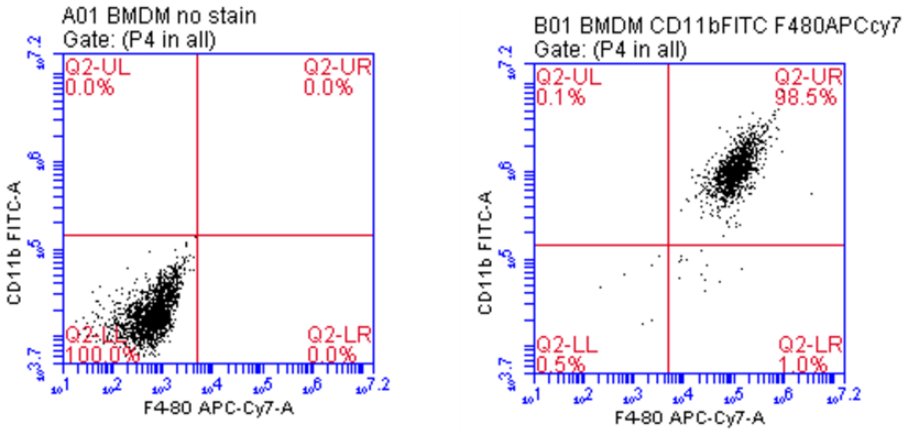

Figure 2.1 Génération des macrophages dérivés de la moelle osseuse *in vitro*

Les cellules non adhérentes de la moelle ont été misent en culture pendant 7 jours avec un changement de milieu au jour 3 dans du DMEM complet supplémenté de milieu L929. Après la différenciation, les cellules récupérées forment une population hautement pure en macrophages qui se caractérise par l'expression de CD11b et F4/80, À gauche, les cellules différenciés sans marquage et à droite, les cellules marquées avec anti CD11b FITC et anti F4/80 APC-Cy7.

2.3 Génération des cellules de la rate apoptotiques et du milieu apoptotique

La génération de cellules spléniques apoptotiques a été faite à partir d'une suspension de cellules de la rate préparée comme mentionnée plus haut et mise en culture avec du DMEM complet à une concentration de 4.10^6 cellules par mL dans un P75. Quatre heures plus tard, les cellules non adhérentes ont été transférées dans un nouveau P75. L'apoptose naturelle des splénocytes non adhérents a été vérifiée 48h plus tard par cytométrie en flux avec une trousse d'annexine V et 7AAD (Figure 2.1) (Biolegend).

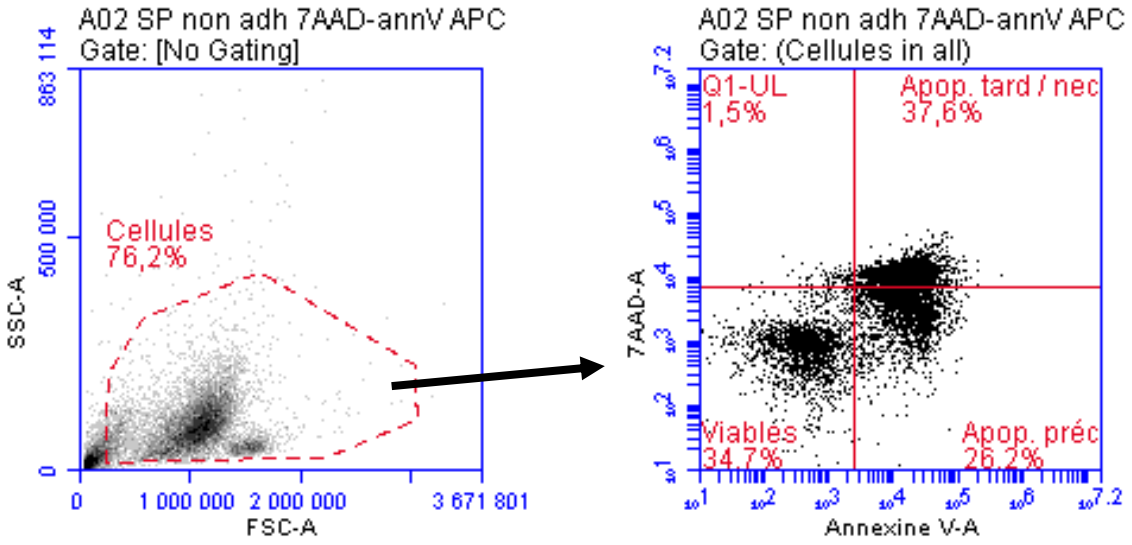

Figure 2.2 Analyse des splénocytes non-adhérents apoptotiques

Les splénocytes totaux ont été mis en culture pendant quatre heures et puis transférées dans un nouveau flacon de culture afin d'éliminer les cellules adhérentes. Après 48h de culture, Les débris ont été exclut et le taux d'apoptose a été évalué avec les marqueurs annexine V et 7AAD. Les cellules double négative sont vivantes, les cellules Ann.V$^+$ et 7AAD$^+$ sont en apoptose précoce et les cellules double positive sont en apoptose tardive/nécrose. Le taux de cellules Ann.V$^+$ a été considéré pour les ratios cellules apoptotiques/macrophages lors des conditionnements

2.4 Conditionnement des BMDM et SPDM

Afin d'étudier la modulation des marqueurs de polarisation ainsi que les gènes surexprimés chez les MΦc, les BMDM et SPDM ont été conditionnés avec les cellules spléniques apoptotiques ou avec de l'EPO. Afin d'étudier l'effet du contact direct des cellules apoptotiques avec les MΦ versus l'effet d'éléments sécrétés par celles-ci, le conditionnement a été fait par ajout des cellules aux MΦ (contact direct) ou par l'utilisation d'un système de transwell (Corning) ou du milieu contenant l'exsudat des cellules spléniques apoptotiques (contact indirect). Pour les conditions avec des cellules apoptotiques en contact direct ou en transwell, les MΦ ont été mis en co-culture à un ratio de 5 cellules apoptotiques par MΦ. Finalement, le conditionnement avec EPO a été fait par l'ajout de DMEM complet supplémenté avec 500mU/mL d'EPO. Pour l'analyse des transcrits, les MΦ ont été conditionnés pendant 4 heures et pour l'analyse de l'IGF-1, des protéines et de cytométrie, les cellules ont été conditionnées pendant 16 heures. Dans le cas de l'analyse de l'IGF-1, les cellules été lavées avec du PBS deux fois après les 7 jours de culture avant l'ajout de DMEM complet frais. Par la suite, les cellules ont été gardées en culture 48h avant de prélever les surnageants.

Pour les essais de polarisation M1, les cultures de MΦ conditionnés pendant 16h ont été lavées deux fois avec du PBS et puis polarisés dans du DMEM complet sans rouge de phénol contenant 100U/mL d'IFN-γ pendant 30 minutes suivi de 100ng/mL de LPS pendant 24 heures.

2.5 Analyse des transcrits par RT-qPCR

À la suite du conditionnement des BMDM et SPDM, l'ARN total a été récupéré avec le TRIZOL (Thermo) selon les instructions du fabricant et dosé au nanodrop (Thermo). Par la suite, l'ARN a été converti en ADNc à l'aide de la trousse High capacity cDNA (Applied Biosystems) selon les instructions du fabricant. Finalement, la qPCR a été effectuée dans l'appareil ABI 7300 (Applied Biosystems) avec le Supermix SSoAdvanced SYBR green (Biorad). Le programme utilisé consistait en 30 secondes de dénaturation à 95oC suivie de 40 cycles de 15 secondes de dénaturation à 95°C et 60 secondes d'hybridation et extension à 60°C, avec lecture de plaque. Pour l'analyse des transcrits d'EPO, les amorces primePCR d'EPO Bio-Rad #10025636) et de GADPH (Bio-Rad #10025636) ont été utilisées selon les instructions du fabricant. Pour l'analyse des transcrits d'EPOR, les amorces sens 5' GGACCCTCTCATCTTGACGC 3' et anti-sens 5' ATCTGGCCTGGCATCCCAAG 3' ont été utilisées à une concentration finale de 50nM. Le gène de la β-actine a été amplifié comme contrôle avec les amorces sens 5' AGGTCGGTGTGAACGGATTTG 3' et anti-sens 5' TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA 3', utilisés à la même concentration.

2.6 Analyse des protéines par Western blot

À la suite du conditionnement, les BMDM ont été traités pendant 4h avec de la brefeldine A (Biolegend). Les protéines totales des MΦ conditionnés ont été extraites en incubant les cellules sur glace 20 minutes dans du tampon RIPA (NaCl 150mM, Tris-HCl 50mM, NP40 1%, sodium déoxycholate 0,5% et SDS 0,1%) après les avoir grattés avec un grattoir cellulaire. Ensuite, les lysats ont été centrifugés à vitesse maximale à 4°C pendant 30 minutes et les surnageant ont été transférés dans de nouveaux tubes. Les protéines totales ont été dosées avec une trousse DC (BioRad) selon les instructions du fabricant et des aliquots ont été préparés dans du tampon de Laemmli, bouillies pendant 5 minutes et conservées à -20°C. Pour la détection dEPOR, les protéines ont été dénaturées à température pièce dans le tampon Laemmli pendant 45 minutes.

Des gels TGX 12% (BioRad) ont été coulés entre des vitres de Protean III (BioRad) et 10 µg (EPO) ou 15µg (EPOR) de protéines totales ont déposés par puits. L'électrophorèse a été faite à 100V jusqu'à ce que le front de migration sorte de la cassette. Le gel a été récupéré et activé 45s aux UV dans le Chemidoc (BioRad) et placés en sandwich sur une membrane de PVDF low fluorescence (millipore) dans le système de transfert Criterion (BioRad). Le transfert a été fait à 0.2A constant pendant 60 minutes. La membrane a été récupérée, bloquée 16h avec du TBS-T 3% BSA et incubée 16h avec l'anti-EPO conjugué à l'HRP (Santa Cruz, clone B-4) ou l'anti-EPOR (Invitrogen #PA5-38484) dilué 1:1000 ou 1:500 respectivement dans le TBS-T 3% BSA. Finalement, la membrane a été lavée avec du TBST 3 fois pendant 10 minutes avec agitation. Pour l'EPOR, la membrane a été incubée 60 minutes avec un anticorps secondaire conjugué à la HRP et lavé comme mentionné plus haut. À la fin des incubations, le révélateur ECL Clarity (BioRad) a été utilisé avant l'analyse dans le Chemidoc. Par la suite, les anticorps ont été enlevés de la membrane avec une solution de stripping (Pierce) pendant 15 minutes à 37°C, puis la membrane a été bloquée une heure avant d'être incubée une heure avec l'anti β-actine conjugué à HRP (Sigma clone AC-15). La membrane a ensuite été révélée dans le Chemidoc comme précédemment. Les analyses de densitométrie ont été faites avec le programme Image Lab (BioRad) et l'intensité des bandes a été normalisée à celle de la β-actine.

2.7 Analyse par cytométrie en flux

Les MΦ conditionnés ont été lavés avec du PBS et incubés 20 minutes à 37°C dans une solution de dissociation non enzymatique (PBS, 10mM EDTA et 20mM sodium citrate). Les MΦ ont ensuite été récupérés par pipetage et comptés afin de marquer 5.10^5 cellules par condition avec un anti CD16/32 (Stemcell Technologies) durant 15 minutes. Pour les marquages extracellulaires, les cellules ont été

incubées avec 100µl de solutions contenant les anticorps (Tableau 2.1) sur glace pendant 30 minutes. Après lavage, les cellules ont été analysées par cytométrie. Pour les marquages intracellulaires, les cellules comptées ont été fixées et perméabilisées avec la trousse (R&D Systems) selon les instructions du fabricant et incubées avec l'anti-EPO a-647 (Santa Cruz Biotechnology clone B-4)). Les cytofluorometres utilisés ont été le BD Accuri C6 (BD) et le Cytoflex (Beckman Coulter) et l'analyse a été faite avec le programme c6 et Cytexpert respectivement.

Tableau 2.1 Liste des anticorps et marqueurs utilisés lors des expériences de cytométrie en flux

Les anticorps utilisés ainsi que leurs clones et les fluorochromes conjugués ainsi que les marqueurs de viabilité ont été utilisés dans les cocktails d'anticorps afin de marquée les cellules pour les expériences de cytomérie en flux

Anticorps / ligands	Clone	Fluorochromes
CD11b (ITGAM)	M1/70	FITC, Pacific Blue
CD16/32	93	APC-Cy7
CD34	HM34	PE
CD71 (tfr1)	R17217	FITC
CD106 (Vcam-1)	429 (MVCAM.A)	APC
CD163 (M130)	REA812	PE
CD169 (Siglec-1)	3D6.112	PE-Cy7
C-Kit	2B8	Per-CP
EPO	B-4	Alexa-647
F4/80	BM8	PE, APC-Cy7
Sca-1	D7	Pacific Blue
Ter119	Ter119	APC
Lineage detection cocktail (biotin)	MACS cat#5101011289	Streptavidine APC
Annexine V		APC
7AAD		

2.8 Essai fonctionnel de coculture avec les cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques ont été enrichies par sélection négative (Stemcell Technologies) à partir des cellules de moelle osseuse. Brièvement, les cellules totales de la moelle ont été récupérées, lavées et resuspendues à une concentration de 10^6 cellules par mL dans du PBS supplémenté de 2 % de FBS et 10mM d'EDTA à pH 8.0. Ensuite les cellules ont été incubées avec le cocktail d'anticorps fourni dans la trousse pendant 15 minutes sur glace et puis 10 minutes avec les billes magnétiques de streptavidine. Finalement les cellules souches Lineage- Sca-1- et C-kit+ (LSK) ont été enrichies par sélection négative, en prélevant la suspension cellulaire dans un nouveau tube. L'élimination des cellules Ter119+ a été confirmée par cytométrie en flux. Les BMDM préalablement conditionnés 16h avec du milieu apoptotique ou du DMEM complet ont été lavés 3 fois avec PBS et des cellules LSK ont été ajoutées aux puits à un ratio de 4 cellules LSK par BMDM dans un milieu érythropoïétique adapté de Shuga et al. (2007). Ce milieu consistait en du IMDM (Wisent) supplémenté de 10 % de SVF, 50U/mL de pénicilline/streptaamycine, 200µg/mL d'holotransférine (Sigma Aldrich), 10µg/mL d'insuline (Sigma Aldrich), 10^{-4} M de β mercaptoethanol (Sigma Aldrich), 10^{-5} M de dexaméthasone (Vetoquinol), 10ng/mL de SCF (RnD systems) et 10ng/mL d'IGF-1 (R&D Systems). Après 5 jours de co-culture, les cellules non adhérentes ont été récupérées et l'engagement des cellules souches dans la voie érythroblastique a été étudié en analysant le taux de cellules Ter119+ par cytométrie en flux comme mentionné plus haut.

2.9 Analyse des cytokines par ELISA

Les concentrations de TNF-α (Biolegend) IL-12p70 (Biolegend), IL-10 (Biolegend) et IGF-1 (eBiosciences) présentes dans les surnageants des MΦ conditionnés et polarisés ont été dosées par ELISA. Des plaques de 96 puits à haut taux d'adsorption de protéine (Corning) ont été incubées à 4°C pendant la nuit avec 60µL d'anticorps de captures dilués à 1X dans du tampon d'adsorption 1X fournit dans la trousse. Le lendemain, les plaques ont été lavées quatre fois avec du PBS-T (0.05 % Tween 20) et 150µL de diluent fournit dans la trousse ont été ajoutés et incubés avec agitation pendant une heure à température pièce. Pendant l'incubation, des courbes étalons pour chaque cytokine ont été préparées dans la gamme prévue selon la trousse. Après l'incubation, les plaques ont été lavées avant de déposer 60µL des échantillons et les dilutions de standards. Pour le TNF-α et l'IGF-1, les surnageants ont été dilués 1:2 et du diluent a été utilisé comme blanc. Les plaques ont été incubées à température pièce pendant deux heures avec agitation. Ensuite, elles ont été lavées et 60µL d'anticorps de détection dilué à 1X dans du diluant ont été ajoutés avant d'incuber pendant une heure à température pièce avec agitation. Après l'incubation, les plaques ont été lavées et 60µL d'avidine-HRP dilués à 1X dans du diluent ont été ajoutés aux puits et

incubés pendant 30 minutes à température pièce avec agitation. Après l'incubation, les plaques ont été lavées cinq fois avec PBS-T en attendant 30 secondes entre chaque lavage. Par la suite, le substrat TMB a été préparé en combinant des parts égales de solution A et B provenant de la trousse et 60µL ont été ajoutés dans les puits. Les plaques ont été placées au noir pendant 20 minutes et la réaction a été arrêtée en ajoutant 60µL de solution d'arrêt (H_2SO_4 1N). Les densités optiques ont été obtenues à l'aide d'un lecteur de plaque muni d'un filtre de 450nm et les concentrations de cytokines ont été calculées par régression linéaire des courbes étalons.

2.10 Analyse des nitrites par réaction de Griess

La production de nitrite a été dosée avec la méthode de Griess. Brièvement, 20µL de réactif de Griess (1:1 0.2% Need (Sigma) et 2% de sulfanilamide (Sigma) dans 5% d'acide phosphorique) ont été combinés à 150µl de surnageant et 130µL d'eau puis incubés pendant 30 minutes au noir. La densité optique de la réaction a été mesurée à 548nm au lecteur de plaque et les concentrations ont été déterminées à l'aide d'une courbe étalon de nitrites allant de 1.56 à 100µM.

2.11 Récupération des cellules mononucléées périphériques.

Le sang total des souris a été récupéré par ponction cardiaque et les cellules ont été récupérées par centrifugation à 500g pendant 5 minutes. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec PBS et resuspendues dans 4 mL de PBS final. La suspension cellulaire a ensuite été déposée sur 4 mL de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) et centrifugée à 800g pendent 20 minutes sans frein. Les leucocytes ont été récupérés à l'interphase et traités pour l'analyse par cytométrie en flux comme mentionnée plus haut.

2.12 Formation de colonies sur méthylcellulose

Pour la culture sur méthylcellulose, les cellules spléniques ont été récupérées comme mentionné plus haut. Les cellules ont été resuspendues à une concentration de 2.10^6 cellules/mL dans du IMDM supplémenté de 2 % de SVF. Un volume de 300µl de la suspension a été ajouté à 3 mL de méthylcellulose complet sans EPO (R&D Systems # HSC008) et vortexée vigoureusement. Les suspensions ont été incubées pendant 5 minutes à température pièce afin d'éliminer les bulles et 1,1 mL de la suspension a été distribué dans deux pétris de 35mm (Sarstedt) avec une seringue de 18G pour chaque rate. Les pétris ont été incubés pendant 12 jours à 37°C et 5 % de CO_2. Après l'incubation, les colonies ont été identifiées et comptées à l'aide d'un microscope inversé TMS-F (Nikon).

2.13 Analyse histologique des macrophages de la pulpe rouge

Les $M\Phi_P$ des souris +/+ et Jak2/+ ont été récupérés par triage cellulaire à partir d'une suspension de cellules de la rate avec le FACSjazz (BD) et 5.10^4 cellules ont été placées sur lame avec le cytospin II (Shandon). Les cellules ont été fixées avec du méthanol pur avant d'être colorées pendant 3 minutes dans une solution de May-Grunswald (Sigma). Après un lavage au PBS, les lames ont été contre-colorées dans une solution de Giemsa (Sigma) diluée 1:20 avec de l'eau distillée pendant 12,5 minutes et ensuite lavée dans du dH_2O. Lorsque sèches, les lames ont été analysées au microscope confocal Nikon A1R-Plus.

2.14 Statistiques

Tous les tests statistiques utilisés sont précisés dans les légendes des figures et ont été effectués à l'aide du logiciel Graphpad Prism (Graphpad Software) avec un seuil de confiance de 95%.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Les BMDM conditionnés produisent de l'EPO

Avant de caractériser la possible action autocrine de l'EPO, la production de cette protéine a été corroborée chez les BMDM conditionnés avec les cellules apoptotiques. L'analyse des transcrits d'EPO par RT-qPCR chez les BMDM conditionnés a montré une hausse d'ARNm spécifique à l'EPO de 7,06 fois versus les BMDM contrôles (Figure 3.1A). Cette hausse a été confirmée par l'expression de la protéine, analysée par Western blot (Figure 3.1B). L'analyse de densimétrie a montré une augmentation d'environ 2 fois de la bande correspondante à l'EPO chez les BMDMs conditionnés. Finalement, la production d'EPO a aussi été confirmée par cytométrie en flux avec un anticorps anti-EPO du même clone (B-4) (Figure 3.1C). Les BMDMs conditionnés expriment 1.5 plus d'EPO que les cellules contrôles, à la suite d'un marquage intracellulaire avec un anticorps spécifique. Dans leur ensemble, ces résultats confirment une production basale d'EPO, et une augmentation de cette réponse chez des BMDM conditionnés avec des cellules apoptotiques.

La production d'EPO par les BMDM a aussi été confirmée par un essai fonctionnel de coculture avec des cellules LSK dans un milieu complet d'érythropoïèse, dépourvu d'EPO exogène. Si cultivées isolées, les cellules LSK ne se sont pas différenciées en érythroblastes (Figure 3.2A) tandis que celles en coculture avec les BMDM ont montré un modeste engagement dans la voie érythroblastique, marquée par l'apparition d'une discrète population Ter119+ (Figure 3.2B). Cependant, c'est la coculture avec les BMDM conditionnés qui a favorisé l'engagement des cellules souches en cellules Ter119+ (Figure 3.2C). Le taux de cellules Ter119+ était de 11,3% versus 4,82% pour la coculture avec BMDM conditionnés ou non respectivement (Figure 3.2D). Parmi les populations d'érythroblastes, la population la plus immature des érythroblastes était prédominante dans la coculture avec BMDMs conditionnés (Figure 3.2E). L'engagement de cellules LSK dans la voie érythroblastique constaté exclusivement en présence de MΦ, ainsi que les analyses des transcrits et de la présence d'EPO par Western blot confirment que les BMDM conditionnés avec cellules apoptotiques produisent de l'EPO et que cette protéine peut agir de façon paracrine.

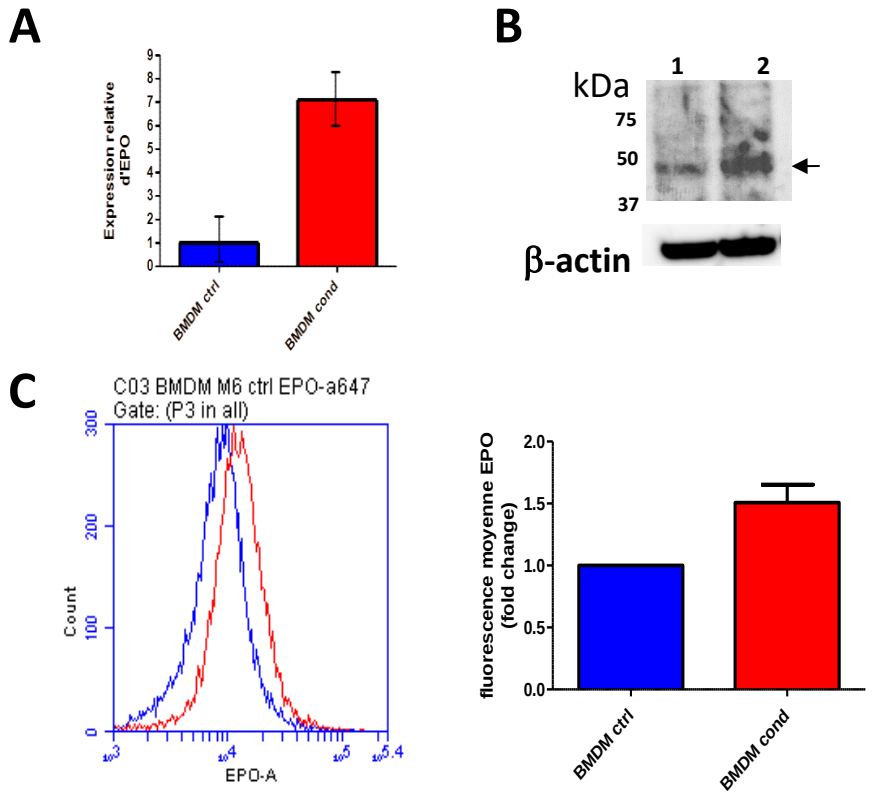

Figure 3.1 Les BMDM conditionnés avec les cellules apoptotiques produisent de l'EPO

Les BMDMs ont été conditionnés 4h avec les cellules apoptotiques et la quantité de transcrits d'EPO a été analysée par RT-qPCR. La bande blanche représente les BMDM contrôles tandis que la bande noire les BMDM conditionnés Les données représentent deux expériences indépendantes (A). Dans d'autres expériences, les BMDMs ont été conditionnés pendant 16 heures avec les cellules apoptotiques et la production d'EPO a été évaluée par Western blot et par cytométrie en flux. Blot représentatif d'une expérience répétée trois fois (B). Histogramme représentatif d'une expérience qui a été répétée trois fois (C).

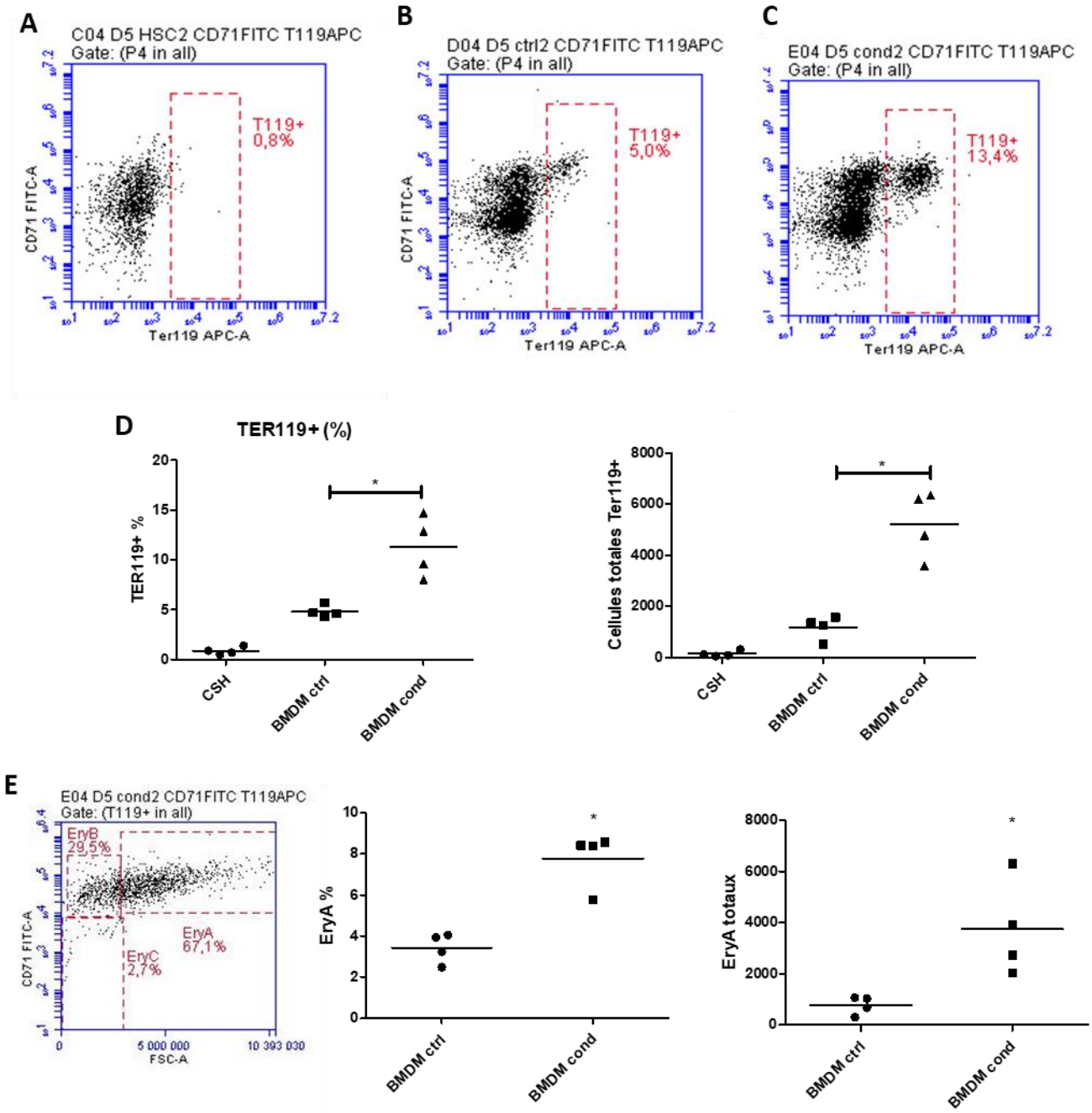

Figure 3.2 L'EPO produite par les macrophages agit de façon paracrine

Les MΦ conditionnés 16 heures avec les cellules apoptotiques ont été mis en co-culture avec des cellules souches hématopoïétiques pendant 5 jours dans un milieu hématopoïétique sans EPO. Dot plot représentatif de 4 expériences de cellules souches en culture seules (A), en co-culture avec des BMDM non conditionnés (B) et conditionnés (C). Le pourcentage et le nombre total (D) d'érythroblastes Ter119+ sont significativement plus élevés chez les cellules en co-culture avec les MΦ conditionnés. Dot plot représentatif pour les populations d'érythroblastes à la suite de la co-culture avec les MΦ conditionnés. Le pourcentage et le nombre total des érythroblastes A les plus immatures sont significativement plus élevés dans la co-culture avec les MΦ conditionnés (E). Des tests de Wilcoxon à rang signés ont été effectués. * $p<0.05$.

3.2 Les BMDM conditionnés surexpriment l'EPOR

Les MΦ dans la moelle qui expriment fortement l'EPOR forment des îlots composés d'un nombre plus important d'érythroblastes que ceux qui l'expriment peu (Li et al., 2019). Dans ce contexte, le groupe de Wu a montré que les MΦ péritonéaux surexpriment l'EPOR à la suite de leur conditionnement avec les cellules apoptotiques ainsi que de l'EPO (Luo et al., 2016). Dans notre étude, les BMDMs ont été conditionnés avec les cellules apoptotiques directement ou indirectement via un système de transwell ou via l'ajout de milieu apoptotique (exsudat des cellules apoptotiques). Finalement, certaines cellules ont été stimulées avec l'EPO directement. À la suite d'un conditionnement de 16 heures, les lysats des BMDMs conditionnés, toutes conditions confondues, affichaient des bandes d'environ 55kDa correspondant à l'EPOR qui étaient plus prononcées que le contrôle (Figure 3.3A). Au niveau des transcrits, les conditionnements avec l'EPO et le milieu apoptotique ont conduit à une augmentation de l'expression d'EPOR de l'ordre de 1.62 et 3.08 fois, respectivement, comparé au contrôle après 4 heures de conditionnement (Figure 3.3B). Ces données indiquent que le conditionnement avec les cellules apoptotiques et l'EPO augmente l'expression d'EPOR chez les BMDM de sorte à les rendre plus sensible à l'EPO et à activer la voie de signalisation de l'axe EPO/EPOR/JAK2.

3.3 Les BMDM conditionnés adoptent un profil tolérant

Afin d'évaluer le potentiel autocrine de l'EPO, des essais fonctionnels de polarisation vers le phénotype M1 ont été effectués. Plus précisément, la production de cytokines pro-inflammatoires tels les nitrites, le TNF-α et l'IL-12 ainsi que la cytokine anti-inflammatoire IL-10 ont été vérifiés chez des BMDM. Ces cellules ont été préalablement conditionnées avec les cellules apoptotiques soit directement ou indirectement via un système de transwell ou par ajout de milieu apoptotique. Certaines cellules ont été conditionnées avec de l'EPO directement. Ensuite, les BMDM ont été stimulées avec du LPS afin d'induire un profil M1 pro-inflammatoire.

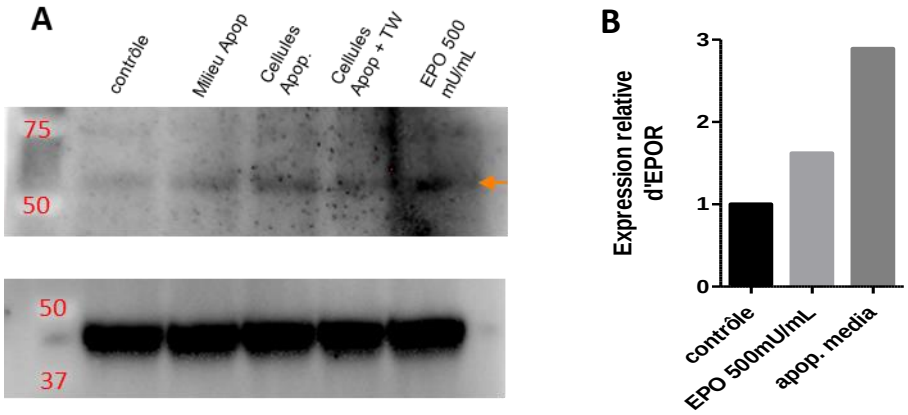

Figure 3.3 Les BMDM conditionnés surexpriment l'EPOR

Analyse de l'expression d'EPOR (flèche ; 55kDa) et du gène de contrôle β-actine (42 kDa) par Western blot chez des BMDMs conditionnés pendant 16 heures. L'EPOR est une protéine de 55kDa (flèche orange). Ce blot est représentatif de deux expériences indépendantes (A). Analyse des transcrits d'EPOR chez des BMDMs conditionnés pendant 4 heures par RT-qPCR et normalisée avec l'expression du gène de la β-actine (B). Donnée représentative d'une expérience.

En ce qui concerne les nitrites, aucune condition n'a affecté sa production (Figure 3.4A). Cependant, pour le TNF-α, une baisse significative de sa production a été constatée chez les BMDM conditionnés directement avec de milieu issu de cellules apoptotiques par rapport aux contrôles ($p<0.01$), l'effet ayant disparu pour la condition en transwell (Figure 3.4B). Le conditionnement direct avec du milieu apoptotique a été la seule condition inhibant la production d'IL-12 ($p<0.05$; Figure 3.4C). Finalement, les niveaux de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 ont augmenté par rapport aux contrôles (Figure 3.4D) pour toutes les conditions sauf celles ayant les BMDM en contact direct avec les cellules apoptotiques. En ordre, les BMDM conditionnés avec le milieu apoptotique, les cellules en transwell et l'EPO ont produit 513,6 pg/mL ($p<0.01$), 488,7 pg/mL ($p<0.05$) et 482,3 pg/mL $p<0.05$) d'IL-10 respectivement contre 357,2 pg/mL pour les cellules non conditionnées.

Ces résultats suggèrent que le préconditionnement des BMDMs avec les cellules apoptotiques, plus précisément de façon indirecte via le milieu ou le système transwell, atténue la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires en réponse au LPS, accompagné par une hausse de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 suite à l'activation avec LPS. En ce qui concerne l'EPO, son effet anti-inflammatoire a été moins évident, se traduisant dans une augmentation de la production d'IL-10 sans effet sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Somme toute, l'axe EPO/EPOR/JAK2 semble induire une polarisation vers un profil moins pro-inflammatoire et plus tolérant.

3.4 Les BMDM adoptent un phénotype semblable aux macrophages centraux

Le conditionnement des BMDMs avec les cellules apoptotiques ou avec de l'EPO augmente l'expression d'EPOR, un marqueur important des $M\Phi_C$. Afin de tester l'hypothèse que des facteurs issus des cellules apoptotiques permettent l'adoption d'un phénotype favorisant l'érythropoïèse, l'expression des marqueurs de $M\Phi_C$ ont été évalués par cytométrie en flux et ELISA. Spécifiquement, l'expression du récepteur de la transferrine CD71 ainsi que les intégrines CD106 et CD169 ont été évalués. Par rapport aux cellules non conditionnées, seule l'expression de CD71 et CD106 montraient une modeste modulation à la hausse chez les BMDM conditionnés avec le milieu des cellules apoptotiques (Figure 3.5A). La rate est aussi un lieu secondaire d'érythropoïèse et comporte des précurseurs qui peuvent être transformés en MΦ. De façon intéressante, l'expression des marqueurs CD71, CD106 et CD169 n'a pas été affectée chez les SPDM (Figure 3.5B).

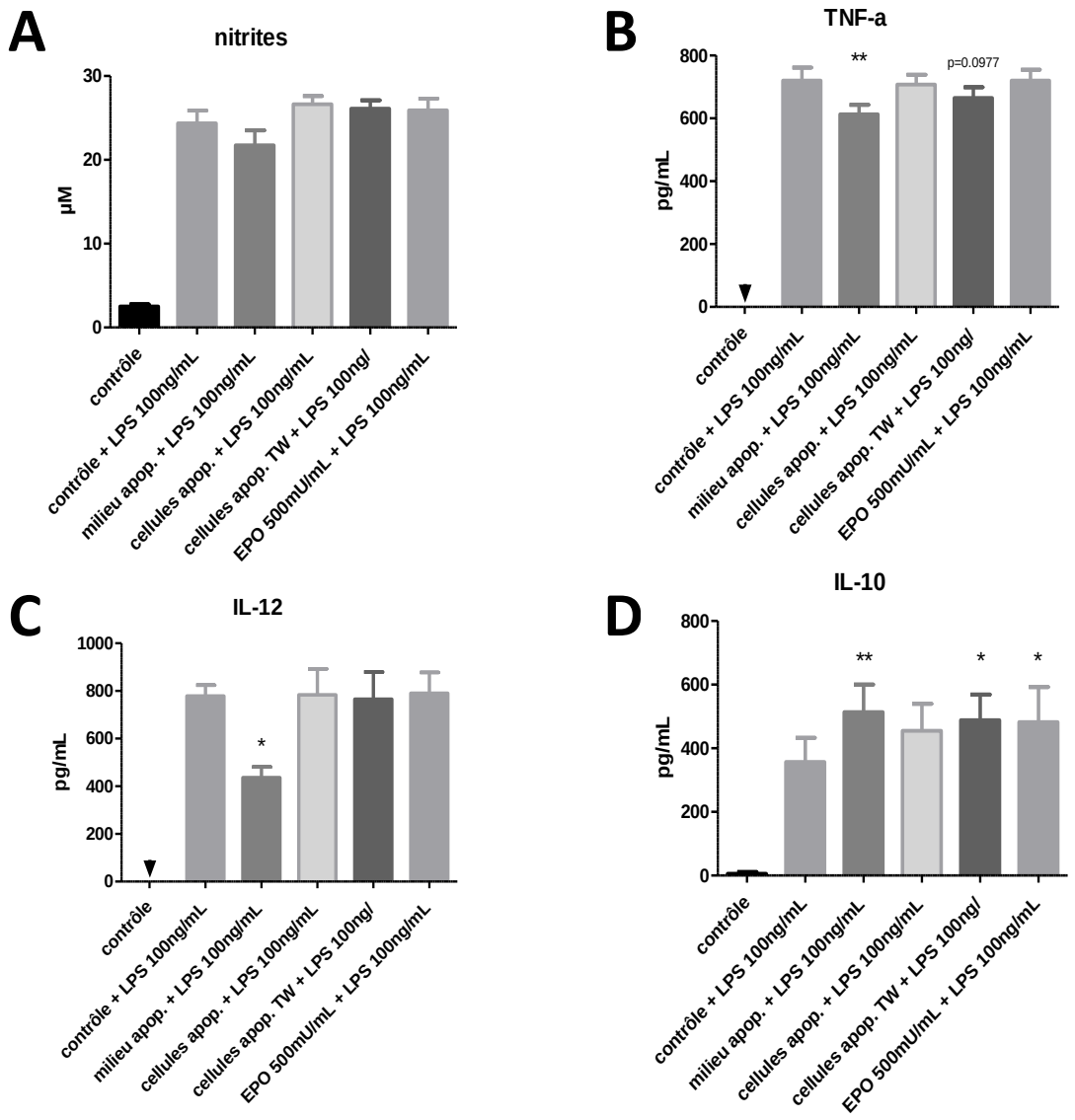

Figure 3.4 Sécrétions des cytokines chez les BMDM suite aux conditionnements et la polarisation M1

Dosage des nitrites par la méthode de Griess (A) et du TNF-α (B), de l'IL-12 (C) et de l'IL-10 (D) par ELISA chez des BMDMs conditionnés avec cellules apoptotiques et EPO. Les données sont représentatives de trois répliqua provenant de MΦ générés à partir de deux souris distinctes. Des tests Wilcoxon à rangs signés ont été effectuées. * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

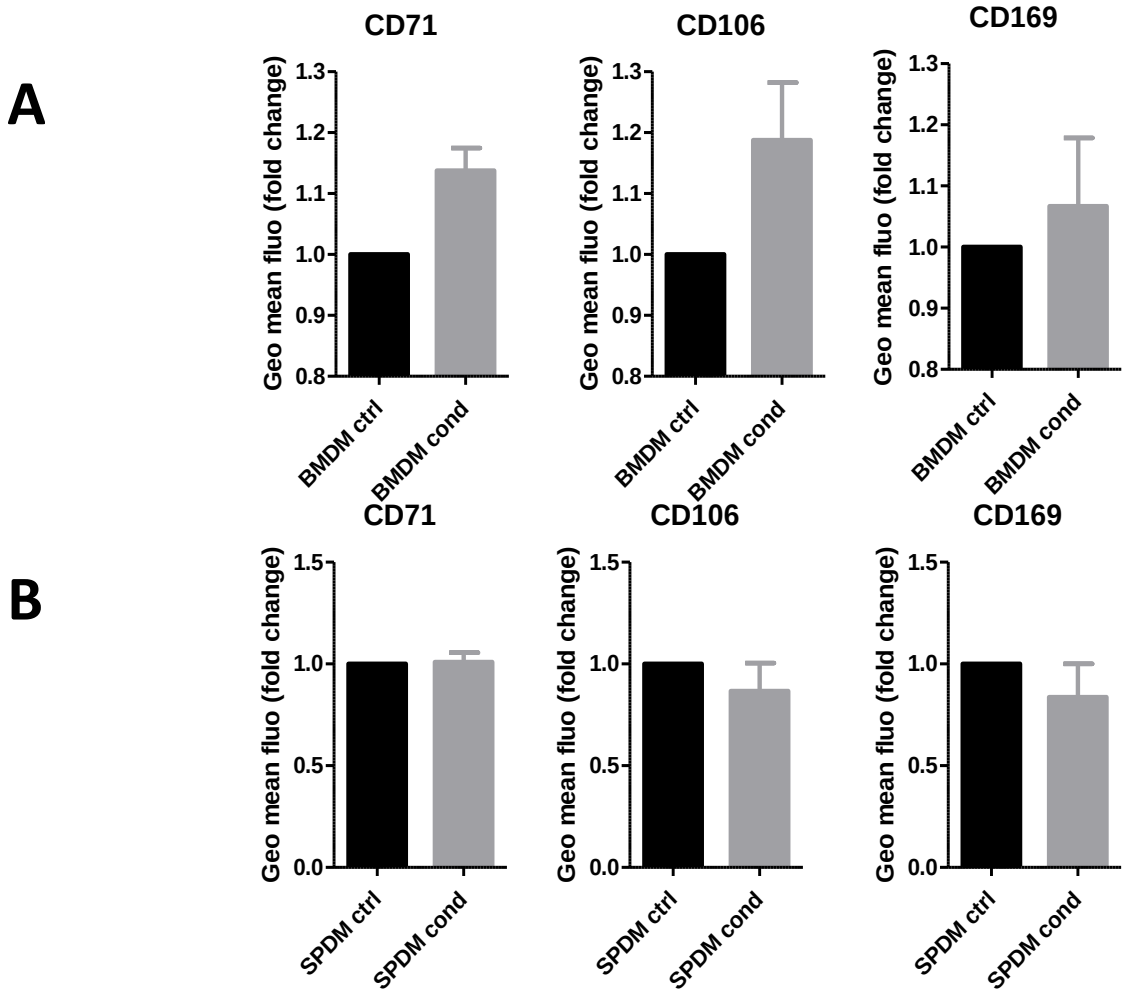

Figure 3.5 Expression des marqueurs de macrophage central chez les BMDM et SPDM conditionnés

Analyse par cytométrie en flux des marqueurs d'îlots érythroblastiques CD71, CD106 et CD169 chez des BMDMs (A) et des SPDMs (B) conditionnés 16 heures avec des cellules apoptotiques. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes.

L'expression du facteur de croissance IGF-1, une protéine importante sécrétée par les $M\Phi_C$ et qui facilite le développement des érythroblastes au sein de l'îlot érythroblastique (Muta et al., 1994) a été évaluée chez les BMDM cultivés dans les mêmes conditions de polarisation M1 sans l'ajout de LPS (Figure 3.6). Une hausse significative de la production d'IGF-1, un facteur de croissance qui agit en synergie avec l'EPOR afin de favoriser le développement des érythroblastes, a été constatée chez les cellules conditionnées avec du milieu apoptotique, produisant 2287,2 pg/mL ($p<0.05$) d'IGF-1 versus 1238,9 pg/mL pour le contrôle. Ces données indiquent que la présence des molécules solubles générées par les cellules apoptotiques favorisent l'adoption d'un profil pro-érythropoïétique chez les BMDM.

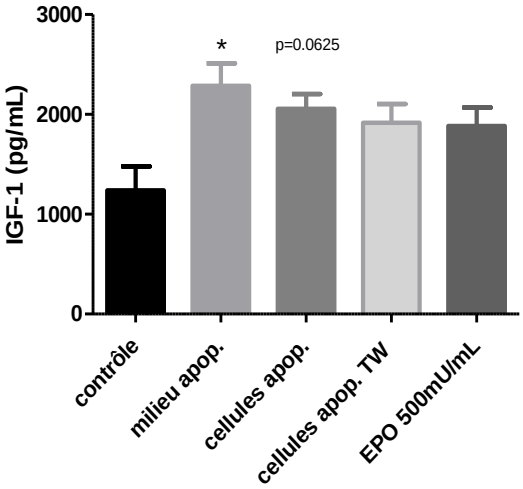

Figure 3.6 Expression d'IGF-1 chez les BMDM conditionnés

Dosage de l'IGF-1 par ELISA chez des BMDMs conditionnés avec les cellules apoptotiques et l'EPO. Les données sont représentatives de trois répliqua provenant de MΦ générés à partir de deux souris distinctes. Un test Kruskal-Wallis avec comparaison de Dunns a été effectué * $p<0.05$.

3.5 Le modèle murin de PV a une érythropoïèse exacerbée dans la rate

En considérant que les $M\Phi_C$ et les $M\Phi_P$ expriment l'EPOR et que l'activation de la voie de signalisation par l'EPOR permet l'adoption d'un profil type $M\Phi_C$, un modèle murin d'activation constitutive de JAK2 via ce récepteur a été utilisé pour mieux caractériser le rôle de l'axe EPO/EPOR/JAK2 dans les fonctions pro-érythropoïétique des MΦ. Ce modèle est représentatif de la PV, une maladie caractérisée par la mutation V617F du gène jak2. Cette mutation rend l'EPOR actif de façon ligand indépendante (Li et al., 2011), de sorte que les MΦ de ces souris ont la voie de signalisation EPO/EPOR/JAK2 active de façon constitutive. Parmi les différents modèles, celui de Mullaly et al. (2011) a été utilisé, possédant une cassette dans l'intron en amont de l'exon 14 du gène JAK2 qui permet l'amplification d'une bande de 346pb lors du génotypage (Figure 3.7A). Le phénotype des souris Jak2/+ se caractérise par une splénomégalie (figure 3.7B) et un pourcentage plus élevé des cellules Ter119+ dans la rate (Figure 3.7C). Ces souris ont aussi 3,3 fois plus de cellules totales dans la rate (Figure 3.8A), sans impact majeur sur la cellularité dans la moelle osseuse (Figure 3.8B).

Nous avons en premier confirmé le phénotype des souris mutantes. Les populations d'érythroblastes dans la moelle et la rate des souris +/+ et jak2/+ ont été évaluées par cytométrie en flux. Spécifiquement, Les Pro-E ont été identifiés par les marqueurs CD71+ Ter119mid. Les trois populations d'érythroblastes ont aussi été analysées parmi les cellules Ter119high. En ordre du stade moins mature au plus mature, les ÉryA sont CD71+ FSChigh, les ÉryB sont CD71+ FSClow et les ÉryC sont CD71- FSClow (Figure 3.9 A-D). En ce qui concerne les Pro-E, une hausse de leurs proportions a été constatée dans la rate ($p<0.05$). Cet écart était aussi évident en termes du nombre total de cellules ($p<0.01$) (Figure 3.9E). Cette tendance à la hausse a été maintenue au niveau des cellules Ter119high dans la rate ($p<0.01$). En ce qui concerne les populations d'érythroblastes, une relation inverse a été constatée entre la moelle et la rate. La moelle des souris Jak2/+ comportaient moins d'ÉryA et ÉryB ($p<0.05$) sans impact significatif sur les ÉryC ($p=0.0563$) tandis que leur rate comportait une augmentation des ÉryA et ÉryB et au profit des ÉryC ($p<0.001$) (Figure 3.9F). La hausse des Pro-E et des érythroblastes immatures dans la rate indique que l'érythopoïèse dans la rate est fortement stimulée chez les souris PV.

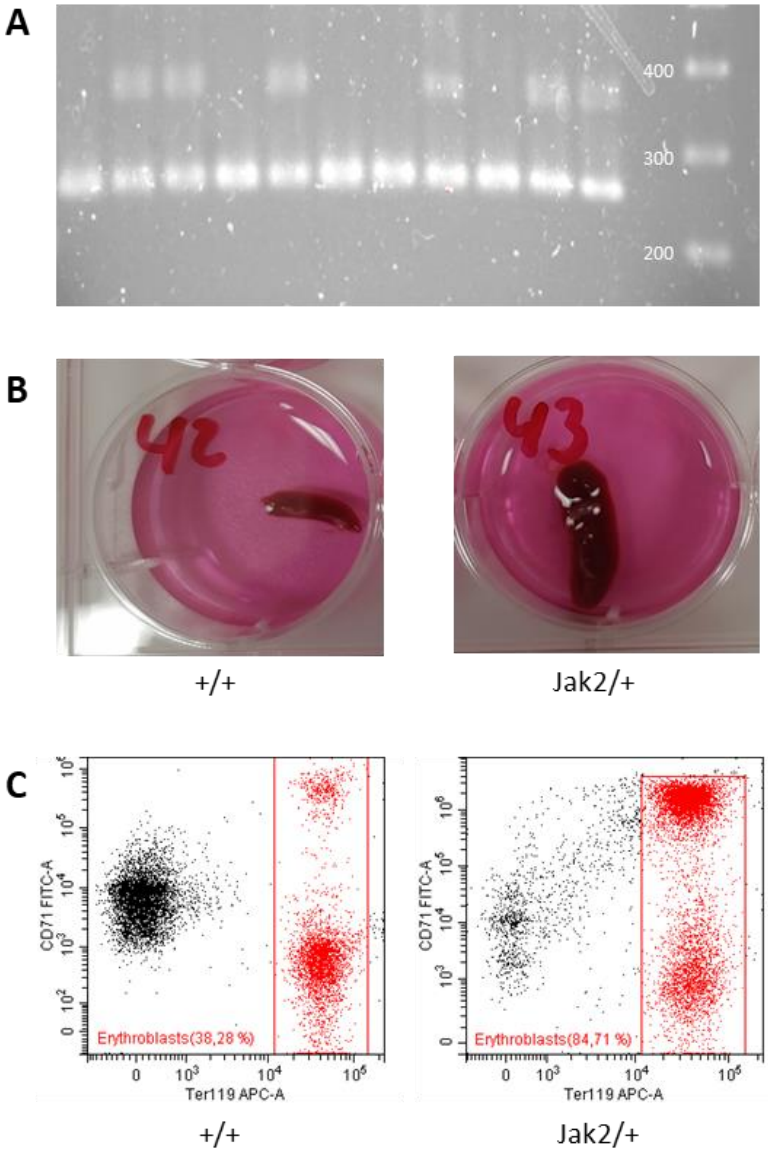

Figure 3.7 Sélection des souris Jak2/+

Image représentative d'un génotypage des souris issues du croisement entre les souris X et Y. Les souris Jak2/+ sont hétérozygotes et ont une bande autour de 346pb (A). Seules les souris génotypées avec la bande Jak2/+ ayant une splénomégalie (B) et une érythropoïèse exacerbée dans la rate (C) ont été retenue pour les expériences.

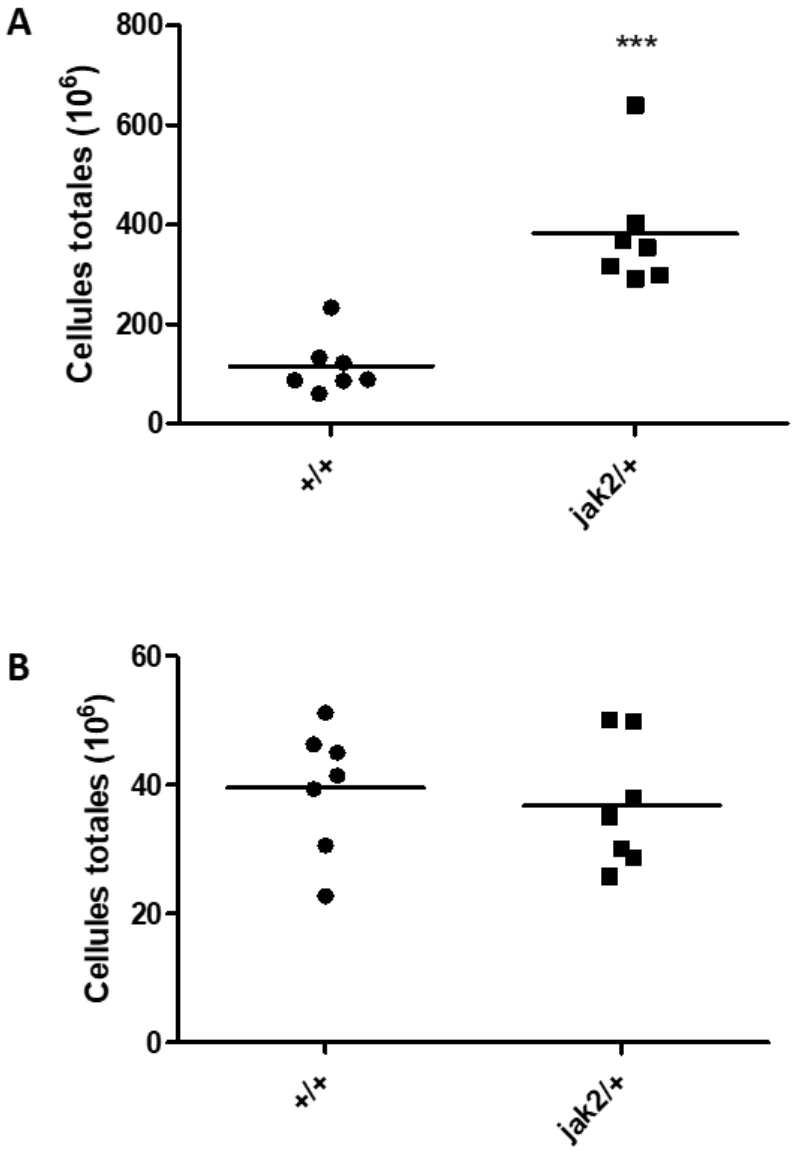

Figure 3.8 Cellularité de la rate et la moelle osseuse des souris Jak2/+

Le nombre de cellules totales de la rate (A) et de la moelle osseuse (B) des souris +/+ et Jak2/+ ont été récoltée et comptées. Les souris Jak2/+ souffrant de splénomégalie ont une quantité beaucoup plus importante de cellules. Un test Mann-Whitney a été effectué *** p<0,001.

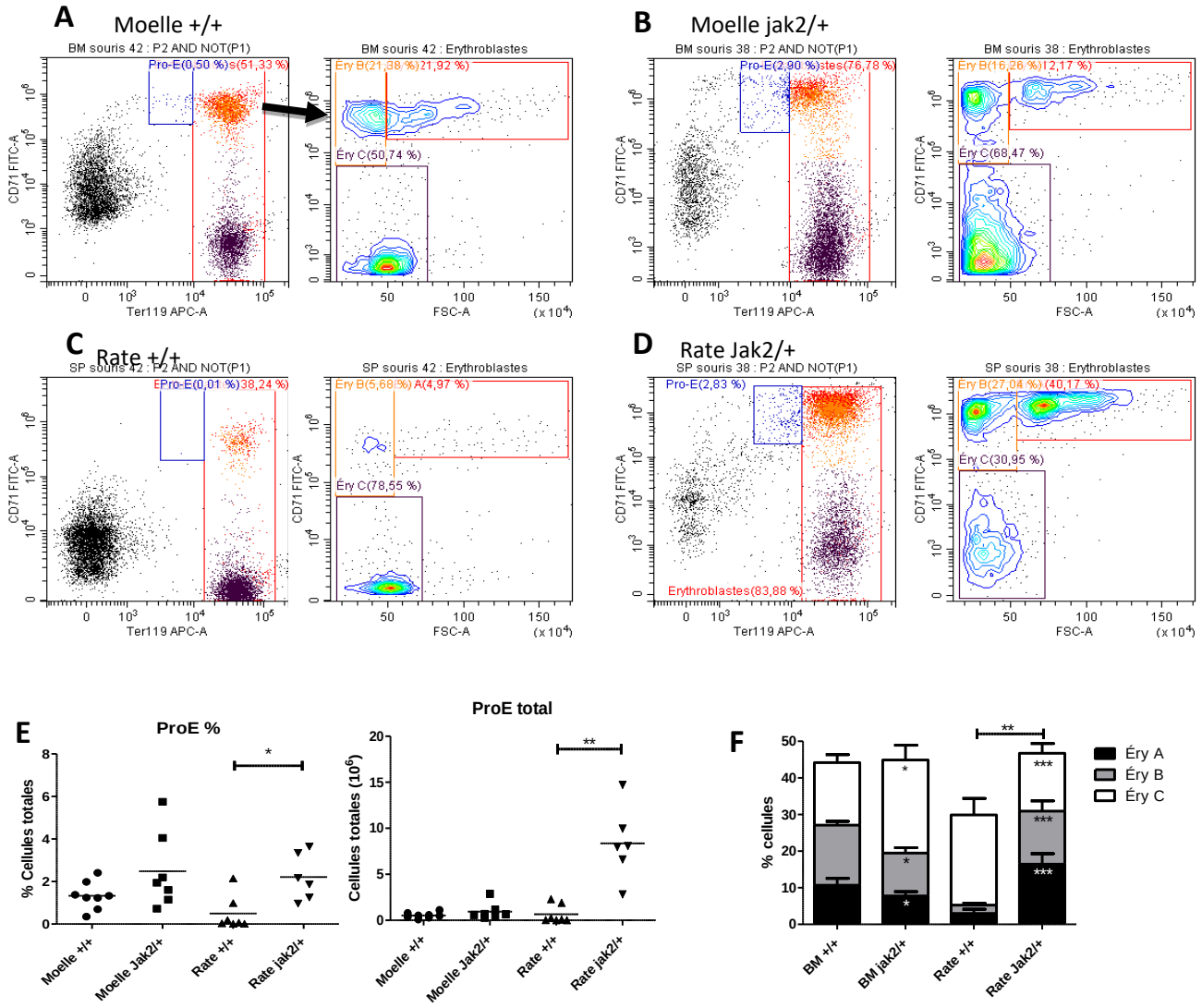

Figure 3.9 Profil d'érythroblastes chez les souris Jak2/+

Dot plot représentatif des érythroblastes dans la moelle des souris +/+ (A) et Jak2/+ ainsi que la rate des souris +/+ (C) et Jak2/+ (D). Les Pro-E sont CD71+ Ter119^{mid} et les érythroblastes sont Ter119+. Parmi les érythroblastes, les Éry A sont CD71+ FSC^{hi}, les ÉryB sont CD71+ FSC^{low} et les ÉryC sont CD71- FSC^{low}. Les pourcentage et nombre totaux de ProE dans la moelle et la rate des souris Jak2/+ montrent une hausse significative dans la rate uniquement (E). Les érythroblastes A et B sont modulés à la baisse dans la moelle des souris Jak2/+, mais fortement modulé à la hausse dans la rate en plus de s'accompagner d'une hausse significative des érythroblastes Ter119^{high} (F). Des tests Mann-Whitney ont été effectués * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

3.6 L'érythropoïèse exacerbée dans la rate s'accompagne d'une hausse des macrophages

Les $M\Phi_C$ dans la moelle osseuse et les $M\Phi_P$ dans la rate sont des populations myéloïdes qui expriment l'EPOR (Li et al., 2019) (Zhang et al., 2021) et sont intimement liés aux globules rouges (Klei et al., 2017). Les MΦ totaux (cellules F4/80+) et les $M\Phi_C$ (F4/80+, CD11b-, CD106+) de la moelle (Figure 3.10A) ainsi que les $M\Phi_P$ F4/80 auto-fluorescents (488/525) (Mitchell et al., 2010) de la rate (figure 3.10B) ont été évalués par cytométrie en flux. Dans la moelle des souris Jak2/+, une baisse du taux de MΦ totaux F4/80 ($p<0.05$) a été mesurée sans impact sur le $M\Phi_C$ F4/80+ CD11b- et CD106+. Cependant, dans la rate, une augmentation du pourcentage et du nombre de MΦ totaux et particulièrement ceux de la pulpe rouge auto-fluorescent 488/525 a été constatée ($p<0.001$) (Figure 3.10C).

3.7 La hausse de macrophages splénique est assurée par une hématopoïèse locale

Afin de déterminer la source des MΦ dans la rate, nous nous sommes penchés sur les précurseurs dans la moelle osseuse et la rate, plus précisément, les précurseurs de mégacaryocytes et d'érythroblastes (MEP) et les précurseurs de granulocytes et MΦ (GMP). Les MEP sont des cellules souches hématopoïétiques LSK (Sca-1-, C-kit+ Lineage-) double négative pour CD34 et CD16/32. À l'opposé, les GMP sont des LSK, mais double positive pour les marqueurs CD34 et CD16/32 (Figure 3.11 A-D). En ce qui concerne les MEP, une hausse significative a été mesurée dans la moelle osseuse et la rate (Figure 3.12A). Cependant, comme pour les MΦ, une hausse des GMP a été exclusivement mesurée dans la rate (Figure 3.12B).

Afin de confirmer que ces précurseurs ont été générés sur place dans la rate et ne proviennent pas de la moelle osseuse, les cellules mononucléées périphériques ont été récupérées afin d'analyser les cellules LSK et vérifier leur présence en circulation (Figure 3.12C). La hausse de cellules souches dans la rate n'était pas corrélée avec une hausse de ces cellules en circulation, indiquant que les précurseurs ont été générés *in situ*.

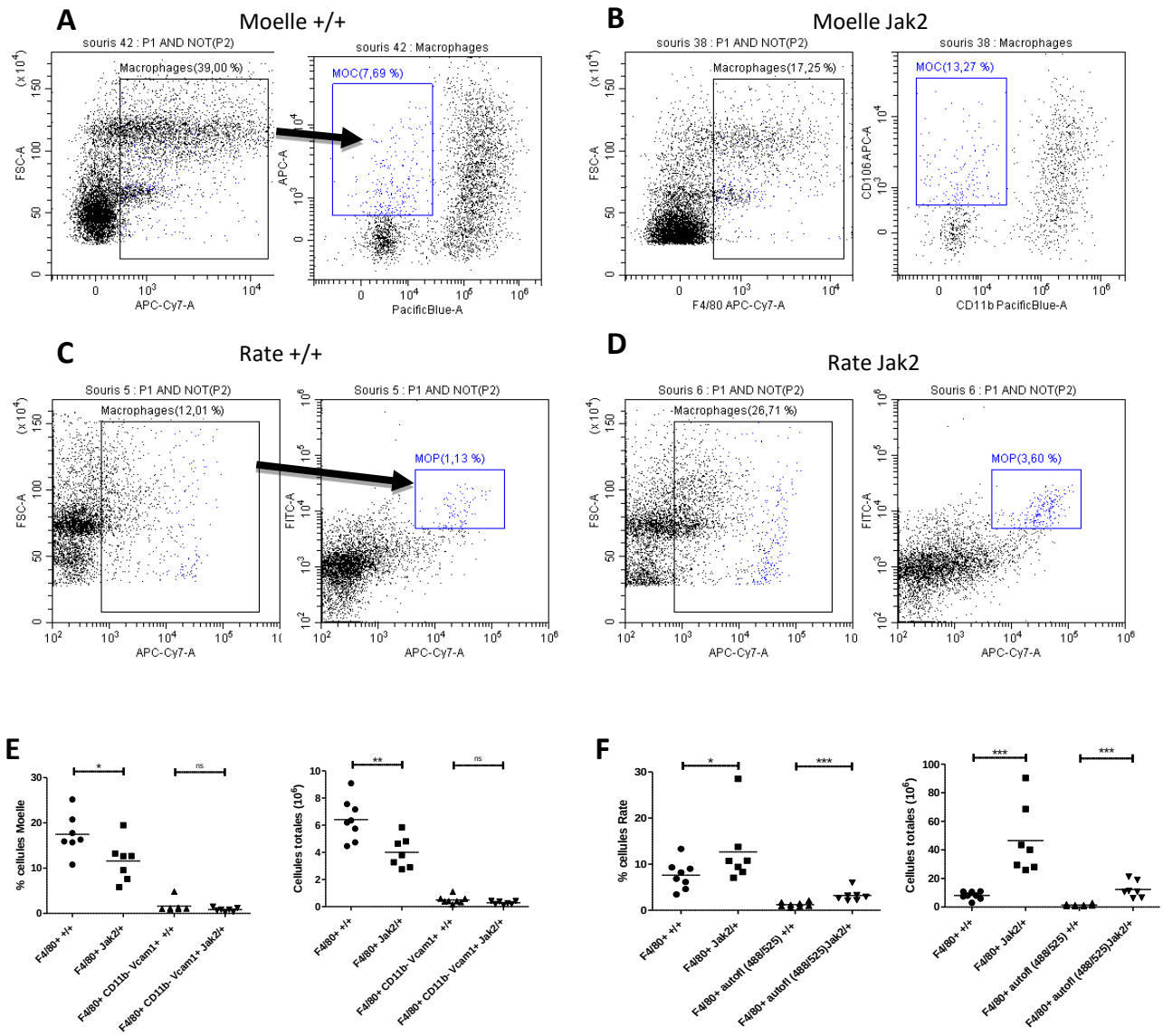

Figure 3.10 Profil des macrophages chez les souris Jak2/+

Dot plot représentatif des MΦ centraux (F4/80+ CD11b- CD106+) de la moelle des souris +/+ (A) et Jak2/+ (B) ainsi que les MΦ de la pulpe rouge (F4/80+ autofluo (488/525)) de la rate des souris +/+ (C) et Jak2/+ (D). Les pourcentages et nombres totaux de MΦ dans la moelle montre une baisse des MΦ sans impact sur les MΦ centraux chez les souris Jak2/+ (E). Les pourcentage et nombre totaux de MΦ de la rate montrent une hausse significative des MΦ de la pulpe rouge dans la rate des souris Jak2/+ (F). Des tests Mann-Whitney ont été effectués * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

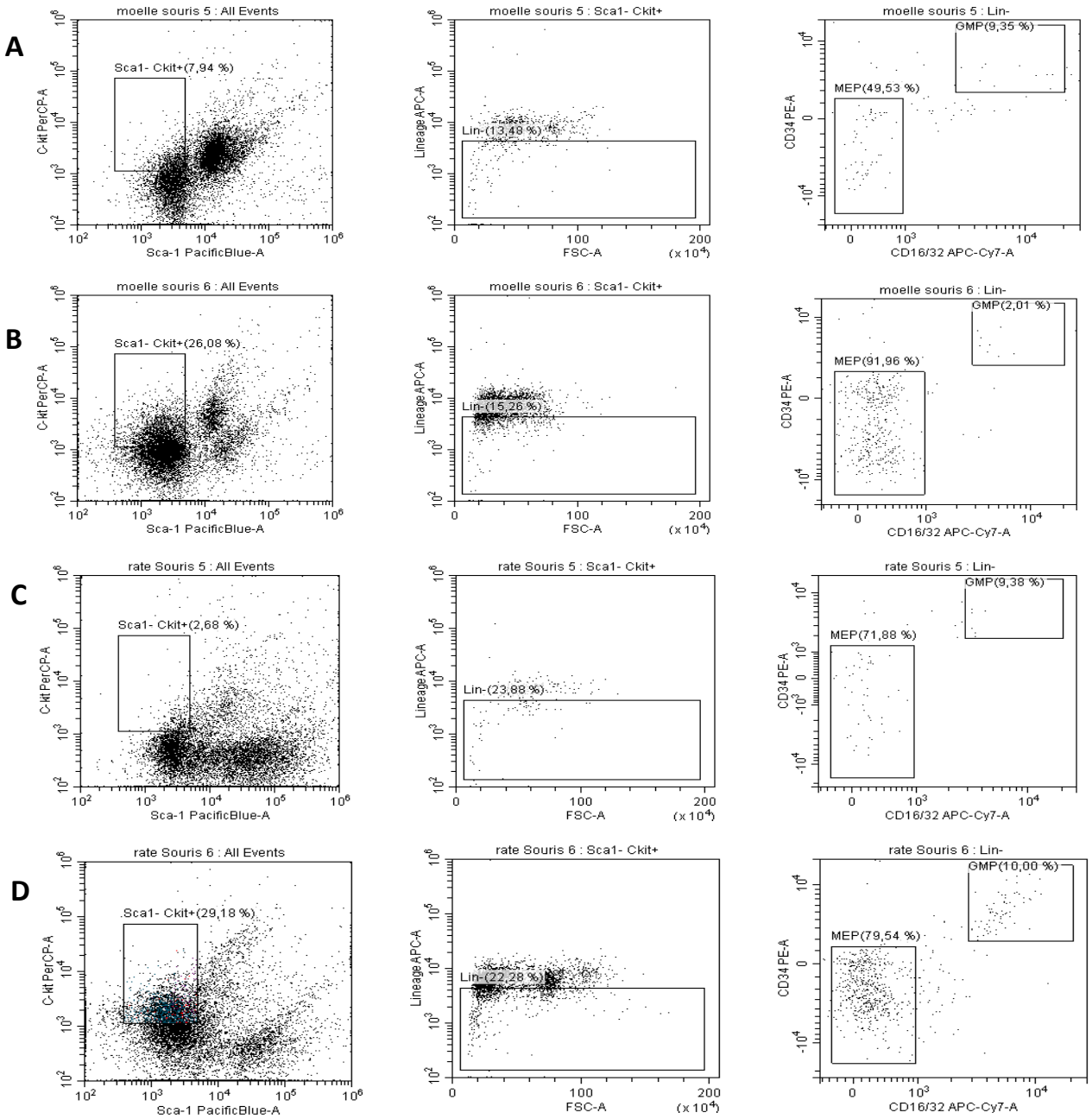

Figure 3.11 Stratégie d'analyse des précurseurs myéloïdes par cytométrie en flux

Les cellules de la moelle osseuse et la rate ont été récupérées afin de d'analyser les populations de progéniteurs myéloïdes. Dot plot représentatif des MEP (Sca-1- C-kit+ Lin- CD34- CD16/32-) et GMP (Sca-1- C-kit+ Lin- CD34+ CD16/32+) dans la moelle des souris +/+ (A) et Jak2/+ (B) ainsi que dans la rate des souris +/+ (C) et Jak2/+ (D).

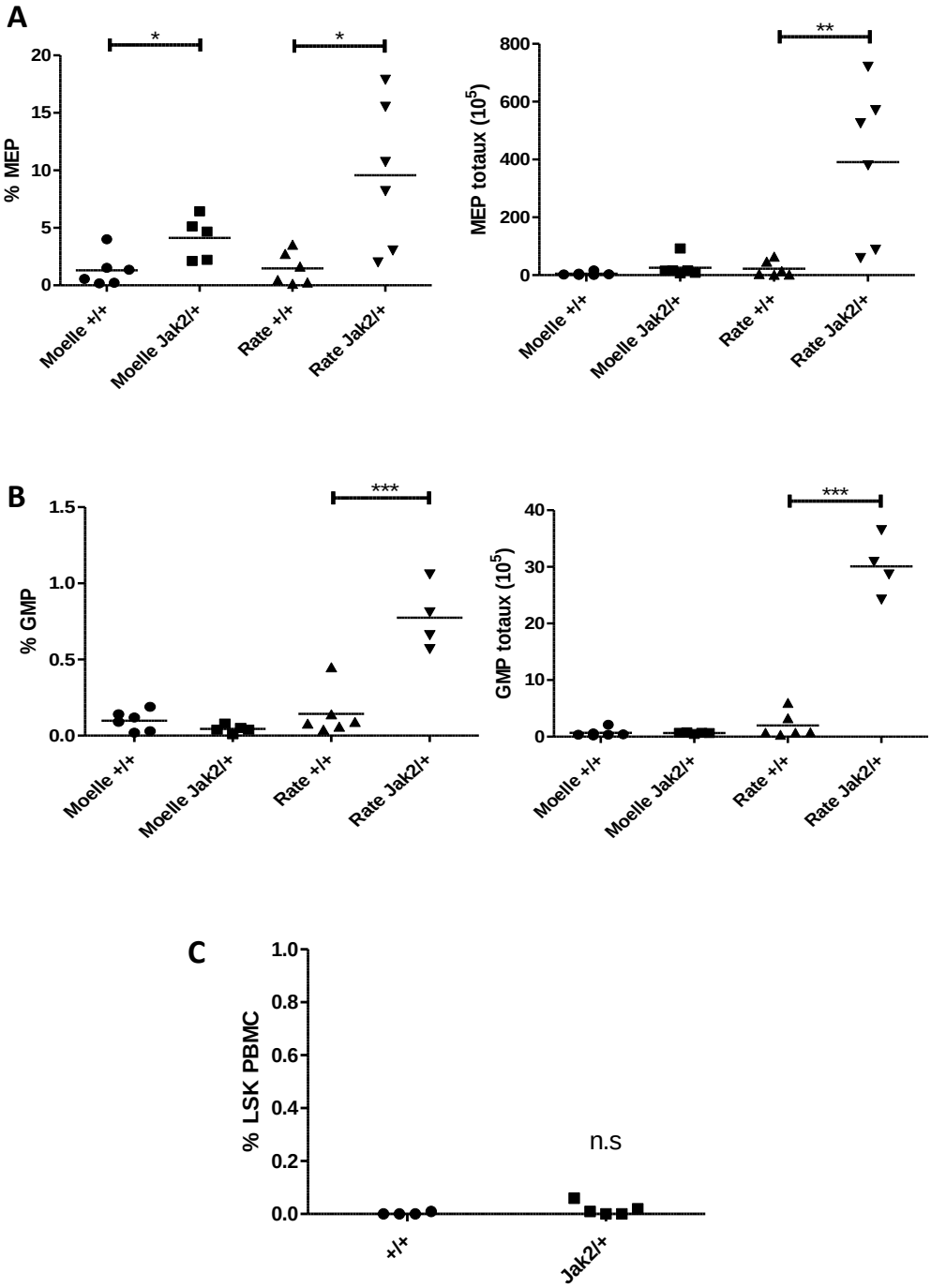

Figure 3.12 Taux de progéniteurs chez les souris Jak2/+

Les taux et nombres totaux de MEP et GMP dans la moelle osseuse et la rate ont été obtenus par cytométrie en flux avec la stratégie d'analyse de la figure 3.11. Les pourcentages et nombres totaux de MEP sont en hausse dans la moelle et la rate des souris jak2/+ (A). Les pourcentages et nombres totaux de GMP sont en hausse significative uniquement dans la rate des souris Jak2/+ (B). L'analyse de progéniteurs en circulation Les leucocytes en circulation ont été récupérés de déterminer la présence de cellules souches hématopoïétiques (Sca-1- C-kit+ Lin-). Il n'y a pas de différences entre les souris +/+ et les souris jak2/+. Des tests Mann-Whitney ont été effectués * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

Les GMP constituent une population pluripotente qui peut mener à la génération de MΦ ou de granulocytes (Yáñez et al., 2017). Afin de confirmer que la hausse des MΦ dans la rate provient de la différentiation de ces précurseurs, un essai de formation de colonies sur méthylcellulose a été effectué afin de déterminer la spécialisation des GMP dans la rate. Comme prévu, une quantité significativement plus élevée de colonies CFU-GM, CFU-M et CFU-G en général ont été générées à partir des splénocytes des souris Jak2/+ versus ceux des souris +/+, soit 95 colonies contre 51 colonies en moyenne respectivement ($p<0.001$; figure 3.13A). Cette observation concorde avec les données révélées par l'analyse par cytométrie en flux et confirme le plus grand nombre de précurseurs hématopoïétique dans cet organe. De plus, chez les souris Jak2/+, le type de colonie la plus importante générée à partir de ces précurseurs était les CFU-M, soit les précurseurs de MΦ spécifiquement (Figure 3.13B). Somme toute, ces données confirment le nombre supérieur de précurseurs hématopoïétiques dans la rate des souris Jak2/+. De plus, la hausse des MΦ de la rate semble due à l'adoption d'un rôle hématopoïétique de cet organe chez ces souris. Cet organe devient à la fois un site d'érythropoïèse accentuée, mais aussi un site de genèse de précurseurs GMP qui se différencient préférablement en MΦ via une hausse de CFU-GM qui devient préférablement des CFU-M.

3.8 La mutation Jak2/+ diminue la tolérance chez les SPDM

L'impact de l'activation constitutive de l'EPOR sur la réponse des MΦ a la polarisation M1 a été évalué chez les BMDM et SPDM provenant de souris Jak2/+. En ce qui concerne les BMDM, aucune différence significative n'a été notée sur la production de TNF-α entre les cellules générées à partir des souris +/+ et des souris Jak2/+, autant à la suite de l'activation avec LPS (271,4pg/mL contre 239,0pg/mL) ou avec préactivation avec de l'interféron gamma (INF-γ) (428,1pg/mL contre 426,0pg/mL) (Figure 3.14A). Cependant, les SPDM provenant de souris Jak2/+ étaient plus sensibles à l'activation classique avec LPS ($p<0.05$) (Figure 3.14B). Ces données indiquent que des facteurs propres à la rate ou les précurseurs de MΦ de cet organe sont responsables de la sensibilité des MΦ à répondre aux stimulus pro-inflammatoires. De plus, le parallèle entre les deux populations de MΦ dénote des différences importantes entre les deux organes chez les souris ayant la mutation JAK2 V617F.

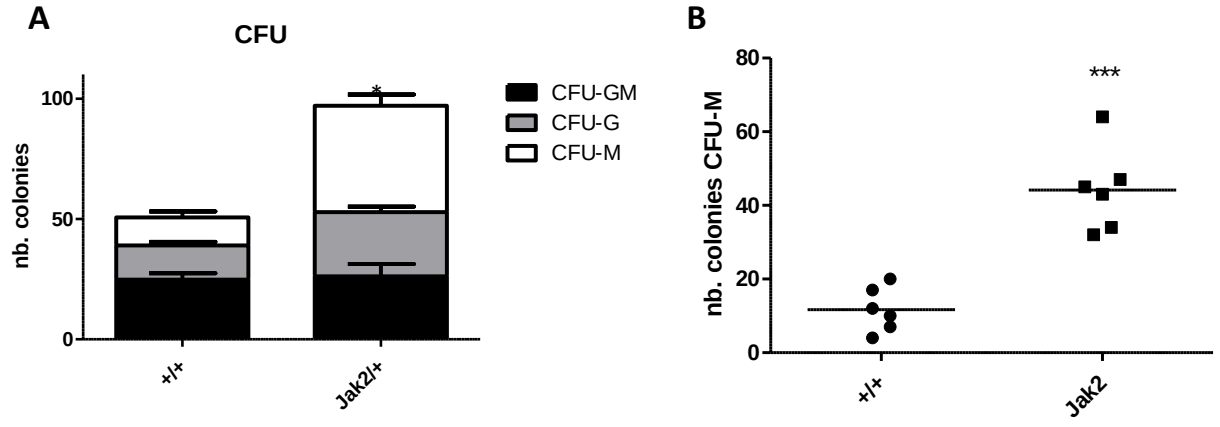

Figure 3.13 Les précurseurs dans la rate des souris Jak2/+ sont plus aptes à former des macrophages

Décompte des colonies à partir des cellules de rate d'un essai de formation de colonie sur méthylcellulose complet sans EPO (A) et plus particulièrement les précurseurs de MΦ (B). Les données sont représentatives de 3 souris en duplicata. Des tests Mann-Whitney ont été effectués * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

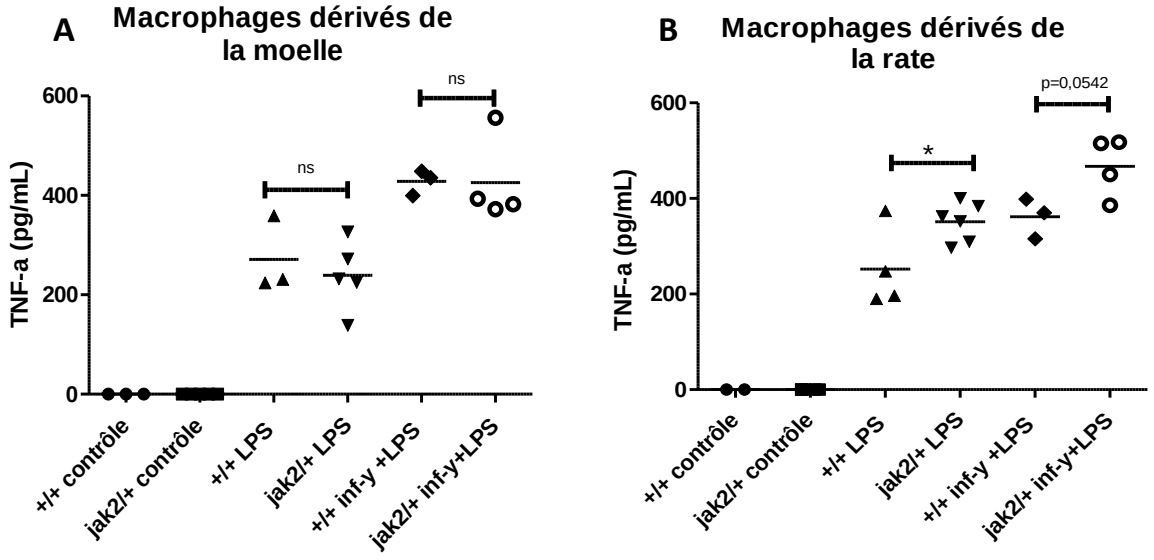

Figure 3.14 Polarisation des BMDM et SPDM Jak2/+

Dosage du TNF-α par ELISA des BMDMs (A) et SPDMs (B) suite à un conditionnement avec inf-y et LPS. Des T-tests non appariés ont été effectués entre les souris +/+ et Jak2/+ pour chaque condition * $p<0.05$.

3.9 Les macrophages de la pulpe rouge prennent en charge l'érythropoïèse dans la rate

Les MΦ sont intimement liés au développement des érythrocytes et leur élimination dans le modèle murin de PV rétablit l'hématocrite élevé et atténue la splénomégalie (Ramos et al., 2013). Le lien entre la hausse des MΦ et des érythroblastes dans la rate a été exploré.

Pour ce faire, la fraction des $MΦ_P$ des souris +/+ et Jak2/+ ont été récupérées par triage cellulaire afin d'analyser les cellules présentes par histologie. Comme attendu, la fraction des souris +/+ contenait principalement des MΦ (Figure 3.15A). Cependant, la fraction MΦ des souris Jak2/+ a révélé des MΦ associés principalement à des érythroblastes, sous forme d'îlots érythroblastiques. De plus, des neutrophiles étaient aussi associés aux MΦ (Figure 3.15B).

Afin de confirmer que les $MΦ_P$ des souris Jak2/+ étaient impliqués dans la formation des îlots érythroblastiques, l'expression d'intégrines essentielles pour leur formation a été évaluée par cytométrie en flux. Comme attendu, l'expression de CD106 était significativement plus élevée chez les $MΦ_P$ des souris Jak2/+ que des souris +/+ qui ont une moyenne géométrique 36139,8 versus 22546,2 ($p<0.05$) respectivement (Figure 3.16A). Cette tendance est aussi observée chez les $MΦ_C$ qui ont une moyenne géométrique de fluorescence de 35029,9 versus 27781,3 ($p<0.05$) pour les souris Jak2/+ et +/+ (Figure 3.16B). L'intégrine CD163 est aussi une protéine d'adhésion impliquée dans la formation d'îlots et est plus exprimée chez les $MΦ_P$ des souris Jak2/+. Ces MΦ ont une moyenne géométrique de fluorescence de 14596,1 versus 10343,4 pour ceux des souris +/+ (Figure 3.16C). Ainsi, la constatation des îlots dans la fraction $MΦ_P$ des souris Jak2/+ était en corrélation avec la hausse d'expression d'intégrines essentielles à leur formation et suggère que les $MΦ_P$ prennent en charge l'érythropoïèse dans cet organe chez les souris Jak2/+.

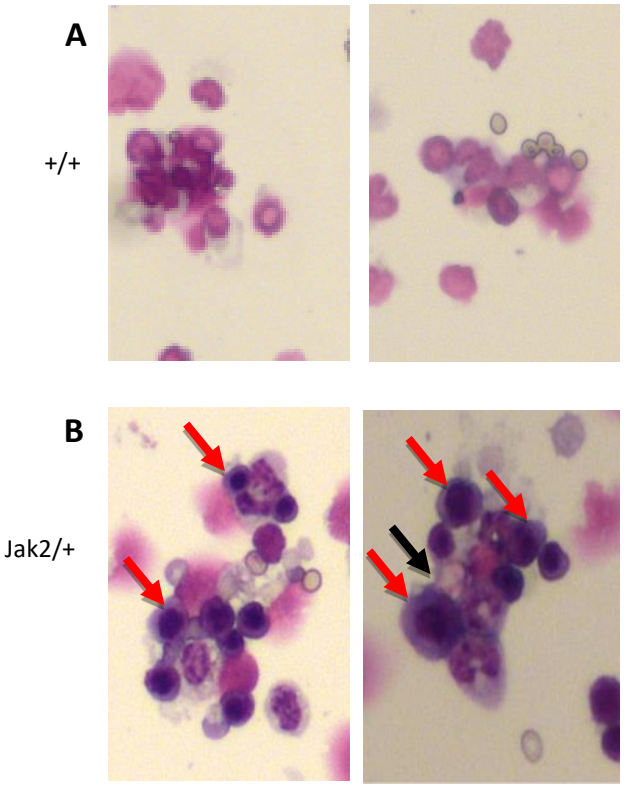

Figure 3.15 la fraction des macrophages de la pulpe rouge contient des îlots érythroblastiques chez les souris Jak2/+.

Marquage May-Gruinswald Giemsa des splénocytes de la fraction F4/80+ autofluo (488/525) récupérés par triage cellulaire de souris +/+ (A) et jak2/+ (B). Les $M\Phi_P$ des souris Jak2/+ sont associés à des érythroblastes (flèches rouges) et des neutrophiles (flèches noires). Images représentatives de deux paires de souris.

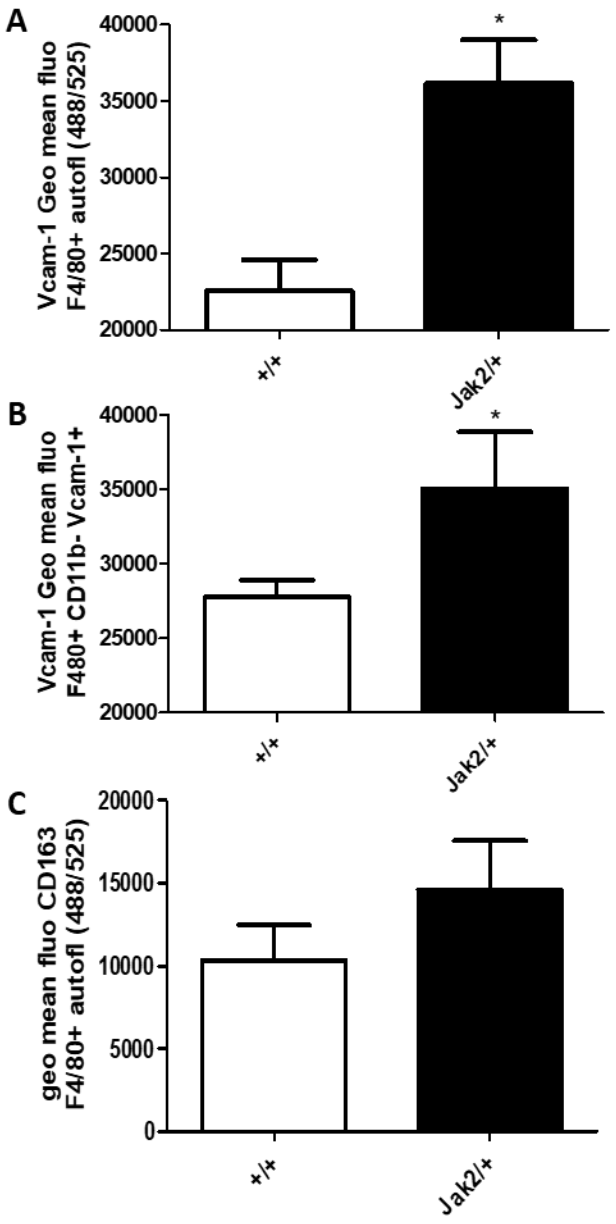

Figure 3.16 Expressions des molécules d'adhésions chez les macrophages des souris Jak2/+.

Analyse de l'expression de CD106 par cytométrie en flux des $M\Phi_P$ (A) et $M\Phi_C$ (B). Les données représentent six et trois paires de souris respectivement. L'expression de CD163 chez deux paires de souris a aussi été analysée (C). Des T-tests non-appariés ont été effectués * $p<0.05$.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

Le point de départ du projet s'est basé sur la démonstration par le groupe de Wu de la production d'EPO par les MΦ du péritoine en présence de cellules apoptotiques (Luo et al., 2016). Puisque les MΦ constituent des populations hétérogènes dont les fonctions et le phénotype varient selon leurs origines (Gordon et Plüddemann, 2017), nous avons premièrement confirmé notre première hypothèse qui supposait que les BMDMs aussi se comportent comme les MΦ du péritoine à la suite de leur conditionnement avec des cellules apoptotiques. Après 4h, une hausse d'expression des transcrits d'EPO a été mesurée qui est corrélée au niveau de l'expression de la protéine après 16h (Figure 3.1).

Le groupe de Wu a montré que l'EPO contribue à l'adoption d'un phénotype tolérant qui favorise l'élimination de cellules apoptotiques par les MΦ péritonéaux (Luo et al., 2016). Étant donné que la moelle osseuse est le site principal d'érythropoïèse et que l'EPO est une hormone clé dans ce processus, nous avons voulu voir si la production d'EPO chez les BMDMs était capable d'engager des cellules souches dans la voie érythroblastique (Figure 3.2). Dans cette expérience de coculture des cellules LSK sans EPO, la présence d'érythroblastes a été exclusivement constatée dans les conditions de culture avec des MΦ. De façon intéressante, l'EPO ne semble pas être le seul acteur impliqué dans l'engagement des cellules souches. Des expériences similaires réalisées dans le laboratoire montrent que le taux de cellules TER119+ est similaire à la condition avec BMDM non conditionnés quand des anticorps neutralisant l'EPO sont ajoutés (Perron-Deshaies et al., 2020). Si l'EPO était l'élément limitant pour le passage des cellules souches LSK en érythroblastes, le taux de cellules Ter119+ devraient être comparables à la condition sans MΦ quand les anticorps neutralisants pour l'EPO sont présents. Ces résultats suggèrent que d'autres facteurs sont exprimés par les BMDMs permettent la génération des érythroblastes. En ce sens, des expériences de cocultures similaires, mais avec des quantités grandissantes d'EPO dans le milieu de culture, ont montré une hausse de 3 fois les érythroblastes viables en présence de MΦ qu'en leur absence (Rhodes et al., 2008). Ces chercheurs ont observé une transition G0/G1 plus rapide chez les érythroblastes associés à des MΦ, théorisant le rôle des molécules d'adhésions exprimées par les MΦ comme CD106, CD169 ou CD163. Cependant, le mécanisme qui permet la prolifération n'est pas connu, les chercheurs mentionnent que ces protéines pourraient agir en concert puisque l'ajout d'anticorps agoniste individuellement à ces protéines n'inhibent pas la prolifération des érythroblastes au sein des îlots.

Les circonstances nécessaires qui permettent à un MΦ naïf de prendre le rôle d'un $MΦ_C$ sont inconnues. Notre deuxième hypothèse était que les BMDM produisent de l'EPO et surexpriment l'EPOR afin que cette EPO, via l'axe EPO/EPOR/JAK2, agisse de façon autocrine afin qu'ils adoptent un profil s'apparentant aux $MΦ_C$. Ce profil se caractérise par la tolérance et l'expression de marqueurs nécessaires pour la formation des îlots érythroblastique et le développement des érythroblastes.

Dans ce cas, ces MΦ doivent exprimer l'EPOR afin de répondre à l'EPO. L'analyse de l'expression d'EPOR par Western blot et RT-qPCR chez les BMDM a démontré l'expression du récepteur de façon basale. De plus, le conditionnement avec les cellules apoptotiques, leur exsudat ou de l'EPO a augmenté l'expression d'EPOR (Figure 3.3). Ces résultats sont en accord avec les travaux du groupe de Wu qui ont aussi montré ce phénomène chez les MΦ péritonéaux (Luo et al., 2016). Cette modulation à la hausse de l'EPOR est intéressante, car les travaux de Li et al. (2019) montrent que les MΦ de la moelle osseuse qui expriment fortement l'EPOR forment des îlots composés d'un nombre supérieur d'érythroblastes que ceux qui exprimaient ce récepteur faiblement. Selon ces chercheurs, l'expression l'EPOR est un marqueur de $MΦ_C$. l'axe EPO/EPOR/JAK2 pourrait contribuer à l'adoption du profil de $MΦ_C$.

L'analyse du transcriptome des $MΦ_C$ (Li et al., 2019) a fait ressortir deux tendances chez cette population de MΦ. Dans un premier temps, ces MΦ sous-expriment des gènes associés à l'inflammation qui est caractéristique des MΦ tolérants. Dans un deuxième temps, ces MΦ expriment plus de gènes associés aux molécules d'adhésion qui sont essentielles pour remplir leur fonction au sein des îlots. Ainsi, nous avons étudié ces aspects chez les BMDMs conditionnés.

Le conditionnement avec les cellules apoptotiques est complexe. D'un côté, les cellules apoptotiques exposent des phospholipides comme la PS et la S1P qui agissent comme signaux "trouve moi/mange-moi". De plus, ils libèrent des molécules qui agissent de façon paracrine pour attirer les MΦ. Dans les deux cas, ces molécules peuvent engager des cascades de signalisation chez le MΦ et l'affecter (Ravichandran, 2011). Cependant, discriminer entre les différents acteurs moléculaires présents lors du conditionnement est difficile. Afin de mieux discriminer molécules actives exprimées sur les cellules et celles qui sont sécrétées, des conditionnements directement avec les cellules apoptotiques ou indirectement avec leur milieu ou un système de transwell ont été utilisé. Finalement, puisque les BMDMs conditionnés produisent de l'EPO et qu'elle peut agir de façon autocrine, ils ont aussi été conditionnés avec l'EPO afin d'étudier directement l'axe EPOR/JAK2.

Comme mentionné plus haut, les $M\Phi_C$ expriment un profil génétique de type tolérant qui inhibe l'expression de récepteurs reliés à l'inflammation comme le TLR4 (Li et al., 2019). Afin de tester l'hypothèse que le conditionnement avec les cellules apoptotiques permet au BMDMs d'adopter ce phénotype fonctionnel, ils ont été activés avec du LPS, un glycolipide bactérien pro-inflammatoire qui induit une forte expression de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α (Garde et al., 1995) (Figure 3.4). Parmi les conditionnements, celui avec le milieu apoptotique était le seul à diminuer la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires TNF-α et IL-12 de façon significative. Le conditionnement indirect avec transwell a aussi été efficace à diminuer l'expression de TNF-α. Ces résultats indiquent que ce sont des molécules sécrétées par les cellules apoptotiques qui sont responsables de ces effets plutôt que le contact direct avec les cellules apoptotiques. Ces résultats sont en accord avec la littérature. Dans une expérience avec des MΦ péritonéaux, le conditionnement avec du milieu apoptotique de thymocytes réduisait de moitié la sécrétion de TNF-α suite à la polarisation avec LPS (Chen et al., 2019). Cette baisse de TNF-α est aussi rapportée chez des MΦ humains conditionnés avec du milieu apoptotique de neutrophiles (Eken et al., 2013).

En ce qui concerne l'EPO, nos résultats indiquent qu'elle n'affecte pas la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, mais stimule la sécrétion d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire responsable d'inhiber l'inflammation. Dans une étude, il est démontré que l'EPO agit en synergie avec le LPS afin d'augmenter la production d'IL-12 et baisser la production d'IL-10 (Lifshitz et al., 2010). Cependant, cet effet pro-inflammatoire n'a jamais été confirmé dans d'autres études. Au contraire, le conditionnement des MΦ du péritoine avec EPO induit plutôt une baisse des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α et l'IL-6 (Luo et al., 2016) et une baisse des transcrits de TNF-α, d'IL-12b et de l'iNOS, l'enzyme responsable de produire des nitrites, tout en augmentant la production d'IL-10 (Cui et al., 2018). La disparité de nos résultats concernant l'inhibition des cytokines pro-inflammatoires avec la littérature peut s'expliquer par deux facteurs. Premièrement, les études antérieures ont utilisé des concentrations plus élevées d'EPO (40U/mL et 100U/mL respectivement). La quantité de 500mU/mL choisie dans notre étude est plus représentative du point de vue physiologique (Sakata et al., 1999). Deuxièmement, ces études ont utilisé des MΦ péritonéaux comme modèle plutôt que les BMDMs. En ce sens, il est possible que ces deux populations se comportent différemment.

La disparité des résultats entre le milieu apoptotique et les cellules apoptotiques en transwell peut être surprenante à première vue étant donné que les éléments conditionnant proviennent des mêmes cellules.

Cependant, trois différences majeures entre les deux conditions peuvent expliquer ces différences. Premièrement, le milieu apoptotique est probablement plus riche en molécules actives compte tenu du fait qu'il est généré pendant 48h. La condition avec les cellules apoptotiques en transwell a été faite pendant 16h avec les cellules dans un milieu frais. Deuxièmement, les cellules utilisées dans les deux conditions sont les mêmes, mais à deux moments différents. Le milieu apoptotique a été généré à partir des cellules apoptotiques non adhérentes pendant 48 heures et après ce temps, ces cellules ont été lavées et mises dans le transwell. Il est possible de considérer la condition milieu apoptotique comme l'exsudat de cellules apoptotiques primaires et le conditionnement avec transwell comme l'exsudat de cellules en apoptose avancée/nécrose. Dans cet ordre d'idée, il est reconnu que les cellules apoptotiques et non celles en nécrose activent la voie HIF-1a responsable de la production d'EPO chez les MΦ (Luo et al., 2016). Étant donné que les MΦ sont éliminés par adhérence, il est possible qu'une proportion des cellules laissées à elles-mêmes deviennent nécrotiques (Elliott et Ravichandran, 2010) et relâchent des molécules qui inhibent les MΦ. Finalement, comme mentionné plus haut, le milieu apoptotique est une soupe hétérogène complexe. Les vésicules qui sont relâchées par les cellules apoptotiques peuvent être classées en trois catégories. Premièrement, les corps apoptotiques allant de 0.05 µm à 5µm, deuxièmement les microvésicules allant de 0.1µm à 1µm et finalement, les exosomes allant de 30nm à 150nm (Kakarla et al., 2020). Le milieu apoptotique a été filtré à l'aide d'un filtre de 0,2µm et le système de transwell utilisé comporte des pores de 0.4µm. Dans ces conditions, les corps apoptotiques ainsi qu'une partie des microvésicules sont éliminés. Or, il y a une différence de 0.2µm entre les pores des deux systèmes de sorte que certaines microvésicules excluent du milieu apoptotique peuvent passer les pores du transwell.

Le conditionnement avec les cellules apoptotiques directement, contre toute attente, n'a pas abouti à rendre les MΦ plus tolérants. Il est possible que des voies de signalisations enclenchées par le contact direct inhibent l'adoption de ce profil au profit d'un autre. La nécessité de phagocyter les cellules apoptotiques pour induire la tolérance chez les MΦ reste à être mieux caractérisée. Une étude montre que le contact seul avec les cellules apoptotiques est suffisant pour induire la production d'IL-10 via le récepteur CD36 et l'activation de la voie MAPK (Chung et al., 2007). De plus, l'inhibition de la phagocytose par la cytochalasine, un inhibiteur de polymérisation d'actine, n'a pas d'effet sur le conditionnement avec les cellules apoptotiques (Weigert et al., 2006). Cependant, la phagocytose était nécessaire pour induire le profil tolérant rapporté par Eken et al. (2013). Dans leur étude, l'incubation avec l'annexine V, un ligand de la PS, a inhibé l'adoption du profil tolérant chez les MΦ. Il est a noté que dans leur étude, ils se sont concentrés sur le conditionnement avec des exosomes uniquement, de sorte que cet effet pourrait être

spécifique à ce type de vésicule. Comme mentionné plus haut, la présence de cellules nécrotiques peut empêcher l'adoption du profil tolérant par les MΦ. En ce sens, il serait pertinent d'enrichir les cellules apoptotiques précoces (ann.v+ 7AAD-) par triage cellulaire pour ce type de conditionnement. En condition normale, les cellules apoptotiques sont rapidement éliminées par les MΦ de sorte qu'elles ne s'accumulent pas in vivo (Elliott et Ravichandran, 2010). Ceci reflèterait mieux l'état dans lequel les érythroblastes se trouvent au sein de l'îlot quand ils entrent en apoptose et sont éliminés par les $MΦ_C$.

L'adoption d'un profil tolérant est essentielle pour le soutien efficace de de l'érythropoïèse basale par les $MΦ_C$, au sein de l'îlot érythroblastique. Il est reconnu que les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α inhibent l'érythropoïèse basale au sein des îlots (Chasis et Mohandas, 2008). Le TNF-α peut agir au niveau des érythroblastes par l'activation des caspases 3, 7 et 9, menant au clivage du facteur de transcription GATA-1 qui est nécessaire pour la différenciation terminale des érythroblastes (De Maria et al., 1999). Dans le même ordre d'idée, il a été rapporté que cette cytokine inhibe le développement des érythroblastes en ralentissant la phase S du cycle cellulaire (Dai et al., 2003). Cette cytokine peut aussi indirectement affecter l'intégrité de l'îlot en induisant la sécrétion de métalloprotéases par les $MΦ_C$ (Chasis et Mohandas, 2008), mais cela reste à être démontré. De plus, des conditions où les MΦ de la moelle osseuse produisent beaucoup de TNF-α, comme le syndrome myélodysplasique, sont caractérisées par l'anémie (Flores-Figueroa et al., 2002). Finalement, les $MΦ_C$ ne sont pas insensibles aux signaux pro-inflammatoires de l'environnement. Il est rapporté que l'érythropoïèse médullaire de la moelle osseuse est inhibée chez des souris recevant du LPS par voie intrapéritonéale. Cependant, à l'aide d'un modèle knockout pour les récepteurs de ces cytokines, les auteurs ont démontré que l'inhibition est TLR4 dépendante et non TNF-α ou IL-1β dépendante (Bisht et al., 2020). Selon eux, les effets inhibiteurs de l'érythropoïèse par les cytokines pro-inflammatoire affectent plus les érythroblastes que les $MΦ_C$. Somme toute, ces chercheurs concluent que, face à la présence de pathogènes, les $MΦ_C$ restent plastiques et peuvent prioriser la défense de l'individu au profit de l'érythropoïèse.

Considérant que la niche érythroblastique est un environnement caractérisé par un haut taux d'apoptose (Liu et al., 2006) qui s'accompagne de production d'EPO par le $MΦ_C$ (Perron-Deshaies et al., 2020), il aurait été intéressant de tester le conditionnement avec milieu apoptotique et EPO afin de mieux répliquer cet environnement. Somme toute, les résultats indiquent que le conditionnement avec exsudat de cellules apoptotiques est meilleur pour induire un profil tolérant, mais le rôle de l'EPO reste à préciser.

Le deuxième aspect qui ressort de l'analyse des transcrits des $M\Phi_C$ est l'expression de molécules d'adhésions, essentielles pour la formation des îlots, ainsi que le récepteur de transferrine CD71 responsable de l'endocytose du fer lié à la transferrine et le facteur de croissance IGF-1 qui agit avec l'EPO et est impliqué dans le développement des érythroblastes (Li et al., 2019). Ainsi, les intégrines CD106 et CD169 ont été évalués par cytométrie en flux à la suite du conditionnement des MΦ avec les cellules apoptotiques (Figure 3.5). Dans les deux cas, le conditionnement n'a pas affecté l'expression de ces molécules. Cependant, certaines informations dans la littérature indiquent que des voies de signalisation JAK/STAT dépendante sont impliquées dans l'expression de ces intégrines. Dans le cas de CD169, les MΦ activés avec interféron de type 1 surexpriment cette intégrine (Bourgoin et al., 2020). Cependant, ce récepteur est associé aux trois kinases de type JAK de sorte que l'implication spécifique de JAK2 reste à définir. En ce qui concerne CD106, certaines évidences l'assignent une action de JAK2 spécifiquement. Des expériences montrent que la voie JAK2/STAT6 IL-4 dépendante mène à l'expression de CD106 (Schnyder et al., 2002). Le facteur de transcription PPARγ est nécessaire pour l'expression de cette intégrine (Szanto et al., 2010). Cependant, dans cette étude, la voie de signalisations menant à l'expression de PPARγ est IL-4 dépendante et passe par la voie JAK3/STAT6. De façon intéressante, les auteurs montrent que PPARγ est aussi exprimé chez les MΦ traités avec GM-CSF. Or, le récepteur de ce facteur est associé uniquement à JAK2 (Vainchenker et al., 2018). L'implication de cette voie de signalisation sera discutée plus en détail dans la section concernant le modèle de PV. En rétrospective, il aurait été intéressant de refaire l'expérience avec les conditions comme le milieu apoptotique qui ont démontré un effet plus important sur l'adoption d'un profil tolérant que les cellules apoptotiques. De plus, le groupe de Wu a montré que PPARγ était surexprimé à la suite du conditionnement avec le milieu apoptotique (Luo et al., 2016).

De façon intéressante, l'expression du récepteur de transferrine CD71 était significativement plus élevée chez les BMDM conditionnés. Une fonction potentielle attribuée aux $M\Phi_C$ est la distribution du fer aux érythroblastes en maturation au sein de l'îlot. Cette distribution du fer nécessite l'incorporation du fer via CD71 (Leimberg et al., 2008). Les connaissances sur l'expression de CD71 découlent principalement d'études chez les érythroblastes et sont intimement liées à la voie de signalisation d'EPOR. L'activation d'EPOR chez ces cellules mène à la surexpression de CD71 via la voie de signalisation JAK2/STAT5 (Porpiglia et al., 2012). De plus, une lignée cellulaire générée à partir d'érythroblastes cancéreux portant la mutation JAK2VF surexprime CD71 (Zhao et al., 2014).

les SPDM ne se sont pas comportés de la même façon que les BMDM concernant le conditionnement avec les cellules apoptotiques. Les précurseurs présents dans la rate ont une origine embryonnaire et sont donc distincts de ceux de la moelle en condition basale (Golub et Cumano, 2013). Cependant, tels les BMDMs, les SPDMs sont capables d'être polarisés vers un profil tolérant M2 lorsque conditionnés avec de l'IL-4 ou pro-inflammatoire M1 avec du LPS (Mulder et al., 2014). Il est possible que les MΦ dérivées des précurseurs de la rate diffèrent de ceux générées dans la moelle concernant l'expression des marqueurs de $MΦ_C$ à la suite du conditionnement avec les cellules apoptotiques. Cependant, il aurait été intéressant de les mettre en contact avec des érythrocytes sénescents puisque c'est le type de cellules que ces MΦ seraient le plus enclin à côtoyer dans la rate.

Le dernier marqueur de $MΦ_C$ évalué était l'IGF-1 (Figure 3.6). Ce facteur de croissance est surexprimé de façon significative chez les BMDMs conditionnés avec milieu apoptotique et les cellules apoptotiques directement, mais pas avec transwell ou par l'EPO. Ceci laisse croire que des éléments sécrétés par les cellules apoptotiques sont responsables de cet effet. Cependant, l'effet induit par le conditionnement avec EPO n'était pas nul, démontrant une tendance ($p=0.0904$). En ce sens, JAK2 est reconnu comme un acteur dans la production d'IGF-1. Les souris JAK2 KO ont une quantité d'IGF-1 moins élevé en circulation (Sivasubramaniyam et al., 2017).

Somme toute, l'activation de la voie EPO/EPOR/JAK2 chez les BMDM semble promouvoir l'adoption d'un profil tolérant et l'expression de certains marqueurs clés chez les $MΦ_C$ tels l'EPOR et l'IGF-1. Cependant, la nature du conditionnement avec les cellules apoptotiques rend difficile l'attribution unique de ces effets à cette voie de signalisation. Afin de mieux cerner l'effet de l'axe EPO/EPOR/JAK2 sur l'adoption du profil de $MΦ_C$, un modèle de PV avec la mutation Jak2 V617F reconnue pour avoir une activation constitutive d'EPOR a été utilisé (Mullally et al., 2010). Ce modèle se caractérise par splénomégalie accompagnée d'une érythropoïèse exacerbée dans la rate (figure 3.7 - 3.9). Compte tenu du rôle primordial des MΦ dans la formation d'îlots, et que ces cellules expriment l'EPOR, notre troisième hypothèse était que la mutation Jak2VF va rendre les MΦ de ce modèle plus apte à soutenir l'érythropoïèse en adoptant un profil tolérant et en surexprimant les marqueurs de $MΦ_C$ nécessaire pour la formation des îlots et le développement des érythroblastes. Pour ce faire nous avons évalué les populations de MΦ et leurs précurseurs dans la moelle osseuse et la rate.

Dans la rate, nous observons une hausse importante des MΦ et particulièrement des $MΦ_P$ (figure 3.10). La fonction principale de ces MΦ est l'élimination des érythrocytes sénescents afin de recycler le fer. De plus. Ils sont reconnus pour être capables de soutenir une érythropoïèse basale secondaire à la moelle osseuse et de soutenir l'érythropoïèse de stress en formant des îlots dans la rate (Chasis et Mohandas, 2008) chez la souris. Cette hausse de $MΦ_P$ s'observe aussi dans les cas d'anémie où des monocytes en circulation sont retenus dans la rate et adoptent un profil de $MΦ_P$. Ce profil s'obtient par des voie hème dépendante qui amène l'expression du facteur de transcription SpiC. Avec le temps, la majorité des $MΦ_P$ sont CD106 positif et forment des îlots (Liao et al., 2018). Cependant, cette voie de signalisation hème dépendante ne permet pas d'expliquer la hausse de CD106 et la formation d'îlots puisque ce marqueur est très peu exprimé chez les $MΦ_P$ en condition basale selon ces chercheurs. Cette observation va dans le sens de nos résultats où les $MΦ_P$ des souris +/+ expriment très peu CD106 tandis que ceux Jak2/+ l'expriment autant que les $MΦ_C$ dans la moelle osseuse (figure 3.15). De plus, ils forment des îlots entourés d'érythroblastes quand la fraction de $MΦ_P$ est triée (figure 3.14). L'élément commun de notre modèle et celui d'anémie est une hausse de la signalisation EPOR, soit par la mutation Jak2VF ou par une hausse d'EPO sérique respectivement. Ces résultats indiquent que la voie EPO/EPOR/JAK2 joue potentiellement un rôle afin de permettre aux $MΦ_P$ d'exprimer CD106 et former des îlots érythroblastiques. Cette capacité de former des îlots est essentielle pour soutenir l'érythropoïèse de stress, car l'élimination des MΦ par des liposomes de clodronate dans le modèle de PV rétablit l'hématocrite et renverse la splénomégalie chez ces souris (Chow et al., 2013 ; Ramos et al., 2013). De façon intéressante, le triage cellulaire de la fraction des $MΦ_P$ révèle la présence de neutrophiles associés au MΦ. Il est rapporté dans la littérature que les granulocytes expriment l'intégrine B1 qui est un ligand de CD106 dans le modèle murin de PV (Edelmann et al., 2018). Ceci pourrait impliquer les MΦ de ces souris dans le développement des granulocytes et concorderait avec la hausse de cellules Gr-1+, un marqueur de neutrophiles, rapportée dans la rate des souris Jak2/+ (Bumm et al., 2006 ; Xing et al., 2008).

Puisque la rate contient une plus grande proportion de MΦ, nous nous sommes intéressés aux précurseurs myéloïdes dans la rate et la moelle osseuse (Figure 3.11). Une hausse des MEP a été constatée dans les deux compartiments, mais une hausse des GMP a été observée uniquement dans la rate. Cette hausse de précurseurs est rapportée aussi dans certains modèles et concorde avec la littérature (Akada et al., 2010). Quand on s'attarde aux colonies que ces précurseurs forment dans la rate, nous avons observé une plus grande formation de colonies en général comme attendu. Cependant, nous avons observé surtout un biais vers la formation de colonies qui forment des monocytes (CFU-M) au profit de ceux qui donnent

uniquement des granulocytes (CFU-G) (Figure 3.13). La hausse des différentes colonies dans la rate est rapportée dans les modèles de PV et est résumée dans le tableau 4.1. De façon intéressante, tous les chercheurs qui ont étudié les progéniteurs dans la rate rapportent une hausse de CFU-GM, mais seulement le groupe de Wernig et al. (2006) rapportent une hausse des CFU-M. L'observation que la rate des souris PV a plus de monocytes a des implications importantes sur l'hématocrite élevé étant donné que les $M\Phi_P$ prennent en charge l'érythropoïèse dans cet organe et que l'élimination systémique des MΦ atténue les symptômes (Chow et al., 2013 ; Ramos et al., 2013). Il est rapporté que cette population de MΦ nécessite l'activation du facteur de transcription SpiC de façon hème dépendante (Kohyama et al., 2009). Or, l'érythropoïèse exacerbée qui caractérise ce modèle offre un environnement riche en érythrocytes et en hème qui pourrait engager les monocytes sur place. Ainsi, non seulement la rate deviendrait un organe qui favorise le développement in situ de monocytes, mais pourrait favoriser leur développement en $M\Phi_P$. Ceci expliquerait la hausse de $M\Phi_P$ que nous avons observé dans la rate (Figure 3.10). Cependant, plus d'études sont nécessaires afin de mieux caractériser le rôle de la mutation jak2VF ainsi que les récepteurs comme EPOR et GM-CSFR qu'elle rend actifs constitutivement dans cette dynamique.

Étant donné que l'activation de l'axe EPO/EPOR/JAK2 induit un profil tolérant chez les BMDM, nous nous attendions à ce que les MΦ portant la mutation $JAK2^{VF}$ le soient aussi. Cependant, les BMDM produisent autant de TNF-α avec ou sans la mutation à la suite d'une polarisation M1 et les SPDM deviennent plus pro-inflammatoires (Figure 3.14). Il est possible que les effets mesurés dans les expériences précédentes de polarisation avec BMDM fussent plus attribués au milieu apoptotique que l'EPO comme telle. Cependant, les BMDM conditionnés avec EPO produisaient plus d'IL-10, donc il aurait été pertinent de vérifier ce paramètre chez les MΦ Jak2/+. En ce qui concerne les SPDM, il est rapporté qu'ils peuvent aussi être polarisés vers la voie M1 ou M2, mais tendent à répondre moins que leur contrepartie générée à partir de la moelle (Mulder *et al.*, 2014). Cependant, le modèle de PV a la distinction que d'autres récepteurs sont actifs de façon constitutive comme le GM-CSFR. Il est reconnu que les MΦ générés avec le GM-CSF tendent à être plus pro-inflammatoires. Cependant, si c'était le cas, les BMDM répondraient de la même façon. Une alternative possible est la différence entre les précurseurs de ces deux organes. Si l'érythropoïèse exacerbée due à la mutation $jak2^{VF}$ reflète l'érythropoïèse de stress comme le suggère Ramos *et al.* (2013), les précurseurs myéloïdes qui se trouvent dans la rate devraient être ceux les mêmes que ceux rapportés par Paulson *et al.* (2011). Ceci concorderait aussi avec le fait que nous n'avons pas détecté de précurseurs en circulation (Figure 3.12). Lors de l'érythropoïèse de stress, les précurseurs de stress sont générés dans la moelle et vont coloniser la rate (Paulson *et al.*, 2011). Il est possible que cet

événement se soit produit plus tôt dans la vie de nos souris puisque nous avons fait nos expériences avec des souris juvéniles âgées de 6-8 semaines. Il est possible que les précurseurs myéloïdes dans la rate soient plus pro-inflammatoires naturellement, mais ceci reste à être étudié. De plus, le caractère pro-inflammatoire n'est pas nécessairement un problème pour l'érythropoïèse si les mêmes précurseurs sont présents dans le modèle de PV que celui d'érythropoïèse de stress. Il est rapporté que ces cellules peuvent devenir des érythrocytes même en présence de cytokines pro-inflammatoires tels le TNF-α et l'IL-1β (Liao *et al.,* 2018). Finalement, la production de cytokines pro-inflammatoires par ces SPDM peut expliquer le caractère pro-inflammatoire qui est rapporté dans cette maladie (Fisher *et al.*, 2021). Ces SPDM sont l'équivalent des monocytes qui sont générés *in situ* dans le modèle. Il aurait été intéressant de les conditionner avec de l'hème pour induire un profil de $M\Phi_P$ via l'activation du facteur de transcription SpiC (Kohyama *et al.*, 2009) et voir le caractère pro-inflammatoire de ces cellules.

Il est à noter que le modèle murin utilisé comportait la difficulté que le phénotype attendu n'était pas obtenu chez toutes les souris avec le bon génotypage. De plus, quand il était présent, les souris affectées avaient une forte variabilité en ce qui concerne le degré de splénomégalie et d'érythropoïèse exacerbée. Ces effets peuvent être dus au caractère hétérozygote de la cre chez les souris générées. Les symptômes de la PV sont transférables par l'injection intraveineuse de cellules de la moelle osseuse de souris $JAK2^{VF}$ chez des souris sauvages irradiées (Ramos *et al.*, 2013). Cette approche pourrait permettre de pallier les problèmes encourus dans ce volet du projet.

Tableau 4.1 Type de colonies myéloïdes en hausse chez les souris Jak2/+

Résumé des types de colonies myéloïdes générées à partir des cellules de rate rapportée dans la littérature chez les modèles murins de polycythémie vera.

Types de colonies en hausse dans les rates des souris Jak2/+	Modèle	Source
CFU-GM	Lentivirus et transplantation	(Lacout et al., 2006)
CFU-GM CFU-GEMM CFU-M	Lentivirus et transplantation	(Wernig et al., 2006)
CFU-GM CFU-GEMM	Souris transgénique	(Xing et al., 2008)
CFU-GM CFU-GEMM	Modèle knock in	(Akada et al., 2010)
CFU-GM	Modèle knock in	(Marty et al., 2010)

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les $M\Phi_C$ sont des cellules essentielles au développement des érythroblastes, car ils expriment des molécules d'adhésions nécessaires pour former les îlots et sécrètent du fer et des facteurs de croissance pour les érythroblastes. Cependant, peu est connu sur les circonstances qui permettent à un MΦ naïf de devenir un $M\Phi_C$. Des travaux par le groupe de Wu ont montré que les MΦ produisent de l'EPO en contact avec les cellules apoptotiques et surexpriment l'EPOR de façon autocrine afin de devenir tolérant (Luo et al., 2016). Plus récemment, des modèles de souris transgénique ont démontré que les $M\Phi_C$ (Li et al., 2019) et les $M\Phi_P$ (Zhang et al., 2021) expriment l'EPOR. Étant donné que l'îlot érythroblastique est un lieu de forte apoptose, ce projet avait pour but d'évaluer l'implication de l'axe EPO/EPOR/JAK2 dans l'adoption d'un profil pro-érythropoïétique chez les MΦ.

Notre première hypothèse était que les BMDM produisent de l'EPO en contact avec les cellules apoptotiques et que cette EPO peut agir de façon autocrine pour surexprimer l'EPOR. Nos analyses de transcrits par RT-qPCR et d'EPO par cytométrie en flux et Western blot ont démontré que les BMDMs conditionnés exprimaient bien l'EPO et que cette EPO était capable d'engager des cellules souches dans la voie érythroblastique lorsqu'ils sont en co-culture. Nous avons ensuite vérifié l'expression d'EPOR par RT-qPCR et Western blot et avons remarqué une hausse de l'expression de ce récepteur suite au conditionnement avec cellules apoptotiques et EPO. Étant donné que l'expression était faible dans le western blot, il aurait été intéressant d'évaluer ce paramètre par une autre méthode. Par exemple, transfecter les BMDM avec un plasmide permettant l'expression d'EPOR fusionné à la GFP sous son promoteur endogène aurait permis de confirmer cette hausse d'expression par cytométrie en flux ainsi que par microscopie confocale. Somme toute, les BMDMs expriment l'EPO lorsque conditionnés avec des cellules apoptotiques et cette production d'EPO semble concorder avec une hausse de l'expression d'EPOR.

Notre deuxième hypothèse était que l'activation de cette voie de signalisation allait induire un profil pro-érythropoïétique chez les BMDM semblable à celui des $M\Phi_C$. Ces MΦ sont tolérants et expriment les molécules d'adhésions CD106, CD169, ainsi que le récepteur de transferrine CD71 qui permet de capter le fer et le facteur de croissance IGF-1 impliqué dans le développement des érythroblastes (Li et al., 2019).

Pour évaluer la tolérance, nous avons dosé la production des cytokines pro-inflammatoires TNF-α, IL-12 ainsi que l'espèce réactive d'oxygène NOS et la cytokine anti-inflammatoire IL-10 chez des BMDM

conditionnés et polarisés vers le phénotype M1 à l'aide de LPS. Seul le conditionnement avec milieu apoptotique a permis de diminuer la production de TNF-α et IL-12 tout en augmentant la production d'IL-10. L'EPO n'a pas eu d'effet sur la production de molécules pro-inflammatoires, mais a augmenté la production d'IL-10. Cependant, il est impossible de distinguer les effets du milieu apoptotiques de ceux de l'EPO dans cette expérience. Par exemple, le milieu apoptotique était meilleur pour induire la tolérance, mais les BMDM produisent de l'EPO aussi dans ces conditions. En rétrospective, il aurait été pertinent de bloquer la voie de signalisation d'EPOR par des anticorps neutralisants ou avec un modèle de BMDM EPOR KO afin de contrôler la potentielle synergie entre l'EPO et les molécules actives dans le milieu apoptotique.

En ce qui concerne les marqueurs de $M\Phi_C$, nous avons conditionné les BMDM avec des cellules apoptotiques directement et évalué par cytométrie en flux l'expression de CD106, CD169 et CD71. Seule l'expression de CD71 augmente chez les BMDM conditionnés. Cependant, il aurait été intéressant de tester les autres conditions ainsi que l'EPO étant donné que l'expression d'IGF-1 était la plus haute avec le milieu apoptotique. En conclusion, le conditionnement des BMDM avec les cellules apoptotiques, particulièrement leur exsudat, semble induire un profil s'apparentant aux $M\Phi_C$ en devenant plus tolérant et en exprimant quelques marqueurs qui caractérisent cette population.

Cette étude s'est limitée à l'évaluation de l'adoption du profil de $M\Phi_C$, mais il aurait été intéressant de pousser plus loin dans cette direction. Par exemple, il serait pertinent de vérifier si ces MΦ forment plus d'îlots *in vitro* à la suite du conditionnement. Nous savons que les cellules LSK s'engagent en plus grand nombre dans la voie érythroblastique dans nos expériences de co-culture, mais nous n'avons pas observé s'il y avait formation d'îlots. De plus, cette expérience pourrait se faire avec des Pro-E enrichies par triage cellulaire ou des BFU-E générées par culture sur méthylcellulose, car c'est à ces stages de développement qu'ils s'associent à un $M\Phi_C$. S'ils forment des îlots plus grands, cette observation concorderait avec celles de Li et al. (2019) qui rapportait que les MΦ de la moelle qui surexpriment l'EPOR forment de plus grands îlots. Dans le même ordre d'idée, ce concept pourrait être expérimenté *in vivo* par l'injection intraveineuse de MΦ conditionnés. S'ils sont plus aptes à former des îlots, ils devraient former plus d'îlots et être accompagnés d'un plus grand nombre d'érythroblastes dans la moelle et la rate après l'isolation des îlots érythroblastique. L'utilisation de MΦ exprimant une protéine fluorescente permettrait de discriminer entre les îlots formés par les $M\Phi_C$ de la souris receveuse et ceux conditionnés *in vitro*.

Notre troisième hypothèse était que les MΦ Jak2/+ seraient plus aptes à soutenir l'érythropoïèse exacerbée qui caractérise la PV à cause de l'activation constitutive d'EPOR. Autant les $MΦ_C$ que les $MΦ_P$ surexpriment CD106, une intégrine essentielle pour la formation des îlots, chez les souris mutantes. De plus, le triage cellulaire de la fraction $MΦ_P$ révèle qu'ils sont associés à des érythroblastes comme dans un îlot érythroblastique. Ceci concorde avec les expériences de Ramos et al. (2013) et Chow et al. (2013) qui a montré l'importance des MΦ dans l'érythropoïèse exacerbée de ce modèle, car leur élimination rétablit l'hématocrite et atténue la splénomégalie. Cependant, l'expression d'EPOR chez les $MΦ_P$ était inconnue à cette époque. Nos travaux montrent un lien potentiel entre l'axe EPOR/EPO/JAK2 et la capacité de former des îlots par les $MΦ_P$. En situation d'anémie, les $MΦ_P$ prennent en charge l'érythropoïèse de stress en surexprimant CD106 qui sont exprimées minimalement en condition basale chez ces MΦ (Liao et al., 2018). Or l'activation d'EPOR est un facteur commun entre le modèle de PV et d'anémie, due à la mutation Jak2VF et la hausse d'EPO sérique respectivement.

Ce volet s'est concentré sur le rôle des MΦ dans l'érythropoïèse exacerbée dans la PV. Cependant, la majorité des cas de PV atteignent un stage myéloprolifératif qui est létal (Le et al., 2019). Une autre avenue intéressante serait la contribution des MΦ à ce phénomène, car certaines pistes indiquent qu'ils pourraient jouer un rôle dans cet aspect de la maladie. Par exemple, l'axe EPOR/EPO/JAK2 est reconnu pour favoriser la survie et la prolifération chez les érythroblastes et les MΦ. Notre laboratoire a rapporté que les souris déplétées en MΦ avec des liposomes de clodronate conservent des MΦ dans la rate et la moelle quand elles reçoivent de l'EPO subséquemment (Perron-Deshaies et al., 2020). De plus, l'injection d'EPO chez ces souris augmente le taux de MΦ dans ces organes.

BIBLIOGRAPHIE

Akada, H., Yan, D., Zou, H., Fiering, S., Hutchison, R. E. et Mohi, M. G. (2010). Conditional expression of heterozygous or homozygous Jak2V617F from its endogenous promoter induces a polycythemia vera–like disease. Blood, 115(17), 3589-3597. https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-215848

Aoki, M., Aoki, H., Ramanathan, R., Hait, N. C. et Takabe, K. (2016). Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Immune Cells and Inflammation: Roles and Therapeutic Potential. Mediators of Inflammation, 2016, 1-11. https://doi.org/10.1155/2016/8606878

Bisht, K., Tay, J., Wellburn, R. N., McGirr, C., Fleming, W., Nowlan, B., Barbier, V., Winkler, I. G. et Levesque, J.-P. (2020). Bacterial Lipopolysaccharides Suppress Erythroblastic Islands and Erythropoiesis in the Bone Marrow in an Extrinsic and G- CSF-, IL-1-, and TNF-Independent Manner. Frontiers in Immunology, 11, 583550. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583550

Bourgoin, P., Biéchelé, G., Ait Belkacem, I., Morange, P.-E. et Malergue, F. (2020). Role of the interferons in CD64 and CD169 expressions in whole blood: Relevance in the balance between viral- or bacterial-oriented immune responses. Immunity, Inflammation and Disease, 8(1), 106-123. https://doi.org/10.1002/iid3.289

Bretz, C. A., Divoky, V., Prchal, J., Kunz, E., Simmons, A. B., Wang, H. et Hartnett, M. E. (2018). Erythropoietin Signaling Increases Choroidal Macrophages and Cytokine Expression, and Exacerbates Choroidal Neovascularization. Scientific Reports, 8, 2161. https://doi.org/10.1038/s41598-018-20520-z

Bumm, T. G. P., Elsea, C., Corbin, A. S., Loriaux, M., Sherbenou, D., Wood, L., Deininger, J., Silver, R. T., Druker, B. J. et Deininger, M. W. N. (2006). Characterization of murine JAK2V617F-positive myeloproliferative disease. Cancer Research, 66(23), 11156-11165. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2210

Chasis, J. A. et Mohandas, N. (2008). Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. Blood, 112(3), 470-478. https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-077883

Chen, H., Kasagi, S., Chia, C., Zhang, D., Tu, E., Wu, R., Zanvit, P., Goldberg, N., Jin, W. et Chen, W. (2019). Extracellular Vesicles from Apoptotic Cells Promote TGFβ Production in Macrophages and Suppress Experimental Colitis. Scientific Reports, 9(1), 5875. https://doi.org/10.1038/s41598-019-42063-7

Chen, Y., Xiang, J., Qian, F., Diwakar, B. T., Ruan, B., Hao, S., Prabhu, K. S. et Paulson, R. F. (2020). Epo receptor signaling in macrophages alters the splenic niche to promote erythroid differentiation. Blood, 136(2), 235-246. https://doi.org/10.1182/blood.2019003480

Cheung, J. Y. et Miller, B. A. (2001). Molecular Mechanisms of Erythropoietin Signaling. Nephron, 87(3), 215-222. https://doi.org/10.1159/000045918

Chow, A., Huggins, M., Ahmed, J., Hashimoto, D., Lucas, D., Kunisaki, Y., Pinho, S., Leboeuf, M., Noizat, C., van Rooijen, N., Tanaka, M., Zhao, Z. J., Bergman, A., Merad, M. et Frenette, P. S. (2013). CD169+

macrophages provide a niche promoting erythropoiesis under homeostasis, myeloablation and in JAK2V617F-induced polycythemia vera. Nature medicine, 19(4), 429-436. https://doi.org/10.1038/nm.3057

Chow, A., Lucas, D., Hidalgo, A., Méndez-Ferrer, S., Hashimoto, D., Scheiermann, C., Battista, M., Leboeuf, M., Prophete, C., van Rooijen, N., Tanaka, M., Merad, M. et Frenette, P. S. (2011). Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. The Journal of Experimental Medicine, 208(2), 261-271. https://doi.org/10.1084/jem.20101688

Chung, E. Y., Liu, J., Homma, Y., Zhang, Y., Brendolan, A., Saggese, M., Han, J., Silverstein, R., Selleri, L. et Ma, X. (2007). Interleukin-10 Expression in Macrophages during Phagocytosis of Apoptotic Cells Is Mediated by the TALE homeoproteins Pbx-1 and Prep-1. Immunity, 27(6), 952-964. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.11.014

Constantinescu, null, Ghaffari, null et Lodish, null. (1999). The Erythropoietin Receptor: Structure, Activation and Intracellular Signal Transduction. Trends in endocrinology and metabolism: TEM, 10(1), 18-23. https://doi.org/10.1016/s1043-2760(98)00101-5

Crocker, P. R. et Gordon, S. (1989). Mouse macrophage hemagglutinin (sheep erythrocyte receptor) with specificity for sialylated glycoconjugates characterized by a monoclonal antibody. The Journal of Experimental Medicine, 169(4), 1333-1346. https://doi.org/10.1084/jem.169.4.1333

Cui, J., Zhang, F., Cao, W., Wang, Y., Liu, J., Liu, X., Chen, T., Li, L., Tian, J. et Yu, B. (2018). Erythropoietin alleviates hyperglycaemia-associated inflammation by regulating macrophage polarization via the JAK2/STAT3 signalling pathway. Molecular Immunology, 101, 221-228. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.05.028

Dai, C., Chung, I.-J., Jiang, S., Price, J. O. et Krantz, S. B. (2003). Reduction of cell cycle progression in human erythroid progenitor cells treated with tumour necrosis factor alpha occurs with reduced CDK6 and is partially reversed by CDK6 transduction. British Journal of Haematology, 121(6), 919-927. https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04367.x

Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E. et Taylor, P. R. (2013). Tissue-resident macrophages. Nature Immunology, 14(10), 986-995. https://doi.org/10.1038/ni.2705

De Maria, R., Zeuner, A., Eramo, A., Domenichelli, C., Bonci, D., Grignani, F., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Testa, U. et Peschle, C. (1999). Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. Nature, 401(6752), 489-493. https://doi.org/10.1038/46809

Edelmann, B., Gupta, N., Schnoeder, T. M., Oelschlegel, A. M., Shahzad, K., Goldschmidt, J., Philipsen, L., Weinert, S., Ghosh, A., Saalfeld, F. C., Nimmagadda, S. C., Müller, P., Braun-Dullaeus, R., Mohr, J., Wolleschak, D., Kliche, S., Amthauer, H., Heidel, F. H., Schraven, B., … Fischer, T. (2018). JAK2-V617F promotes venous thrombosis through β1/β2 integrin activation. The Journal of Clinical Investigation, 128(10), 4359-4371. https://doi.org/10.1172/JCI90312

Eken, C., Sadallah, S., Martin, P. J., Treves, S. et Schifferli, J. A. (2013). Ectosomes of polymorphonuclear neutrophils activate multiple signaling pathways in macrophages. Immunobiology, 218(3), 382-392. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.05.021

Elliott, M. R., Chekeni, F. B., Trampont, P. C., Lazarowski, E. R., Kadl, A., Walk, S. F., Park, D., Woodson, R. I., Ostankovich, M., Sharma, P., Lysiak, J. J., Harden, T. K., Leitinger, N. et Ravichandran, K. S. (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal for phagocytic clearance. Nature, 461(7261), 282-286. https://doi.org/10.1038/nature08296

Elliott, M. R. et Ravichandran, K. S. (2010). Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. The Journal of Cell Biology, 189(7), 1059-1070. https://doi.org/10.1083/jcb.201004096

Elliott, S., Busse, L., Bass, M. B., Lu, H., Sarosi, I., Sinclair, A. M., Spahr, C., Um, M., Van, G. et Begley, C. G. (2006). Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression. Blood, 107(5), 1892-1895. https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-4066

Etzerodt, A. et Moestrup, S. K. (2013). CD163 and Inflammation: Biological, Diagnostic, and Therapeutic Aspects. Antioxidants & Redox Signaling, 18(17), 2352-2363. https://doi.org/10.1089/ars.2012.4834

Fabriek, B. O., Dijkstra, C. D. et van den Berg, T. K. (2005). The macrophage scavenger receptor CD163. Immunobiology, 210(2), 153-160. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.05.010

Fadok, V. A., Bratton, D. L., Frasch, S. C., Warner, M. L. et Henson, P. M. (1998). The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. Cell Death and Differentiation, 5(7), 551-562. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400404

Fisher, D. A. C., Fowles, J. S., Zhou, A. et Oh, S. T. (2021). Inflammatory Pathophysiology as a Contributor to Myeloproliferative Neoplasms. Frontiers in Immunology, 12, 683401. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.683401

Flores-Figueroa, E., Gutiérrez-Espíndola, G., Montesinos, J. J., Arana-Trejo, R. M. et Mayani, H. (2002). In vitro characterization of hematopoietic microenvironment cells from patients with myelodysplastic syndrome. Leukemia Research, 26(7), 677-686. https://doi.org/10.1016/S0145-2126(01)00193-X

Garde, A. H., Fomsgaard, A. et Høiby, N. (1995). An easy microtiter assay for quantitation of cytokine induction by lipopolysaccharide (LPS) and activity of LPS-binding serum components. APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica, 103(4), 286-292. https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1995.tb01108.x

Gautier, E. L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K. G., Gordonov, S., Mazloom, A. R., Ma'ayan, A., Chua, W.-J., Hansen, T. H., Turley, S. J., Merad, M., Randolph, G. J. et Immunological Genome Consortium. (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. Nature Immunology, 13(11), 1118-1128. https://doi.org/10.1038/ni.2419

Golub, R. et Cumano, A. (2013). Embryonic hematopoiesis. Blood Cells, Molecules & Diseases, 51(4), 226-231. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2013.08.004

Gordon, S. et Plüddemann, A. (2017). Tissue macrophages: heterogeneity and functions. BMC biology, 15(1), 53. https://doi.org/10.1186/s12915-017-0392-4

Guilliams, M., Mildner, A. et Yona, S. (2018). Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. Immunity, 49(4), 595-613. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.005

Guilliams, M. et Scott, C. L. (2017). Does niche competition determine the origin of tissue-resident macrophages? Nature Reviews Immunology, 17(7), 451-460. https://doi.org/10.1038/nri.2017.42

Halim, C. E., Deng, S., Ong, M. S. et Yap, C. T. (2020). Involvement of STAT5 in Oncogenesis. Biomedicines, 8(9), E316. https://doi.org/10.3390/biomedicines8090316

Han, E. X., Qian, H., Jiang, B., Figetakis, M., Kosyakova, N., Tellides, G., Niklason, L. E. et Chang, W. G. (2021). A therapeutic vascular conduit to support in vivo cell-secreted therapy. NPJ Regenerative Medicine, 6, 40. https://doi.org/10.1038/s41536-021-00150-2

Jacobsen, R. N., Forristal, C. E., Raggatt, L. J., Nowlan, B., Barbier, V., Kaur, S., Rooijen, N. van, Winkler, I. G., Pettit, A. R. et Levesque, J.-P. (2014). Mobilization with granulocyte colony-stimulating factor blocks medullar erythropoiesis by depleting F4/80+VCAM1+CD169+ER-HR3+Ly6G+ erythroid island macrophages in the mouse. Experimental Hematology, 42(7), 547-561.e4. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2014.03.009

Jelkmann, W. (2011). Regulation of erythropoietin production. The Journal of Physiology, 589(Pt 6), 1251-1258. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.195057

Kadri, Z., Lefevre, C., Goupille, O., Penglong, T., Granger-Locatelli, M., Fucharoen, S., Maouche-Chretien, L., Leboulch, P. et Chretien, S. (2015). Erythropoietin and IGF-1 signaling synchronize cell proliferation and maturation during erythropoiesis. Genes & Development, 29(24), 2603-2616. https://doi.org/10.1101/gad.267633.115

Kakarla, R., Hur, J., Kim, Y. J., Kim, J. et Chwae, Y.-J. (2020). Apoptotic cell-derived exosomes: messages from dying cells. Experimental & Molecular Medicine, 52(1), 1-6. https://doi.org/10.1038/s12276-019-0362-8

Keerthivasan, G., Wickrema, A. et Crispino, J. D. (2011). Erythroblast enucleation. Stem Cells International, 2011, 139851. https://doi.org/10.4061/2011/139851

Kieran, M. W., Perkins, A. C., Orkin, S. H. et 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 of the United States of America, 93(17), 9126-9131. https://doi.org/10.1073/pnas.93.17.9126

Klei, T. R. L., Meinderts, S. M., van den Berg, T. K. et van Bruggen, R. (2017). From the Cradle to the Grave: The Role of Macrophages in Erythropoiesis and Erythrophagocytosis. Frontiers in Immunology, 8. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00073

Kohyama, M., Ise, W., Edelson, B. T., Wilker, P. R., Hildner, K., Mejia, C., Frazier, W. A., Murphy, T. L. et Murphy, K. M. (2009). Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. Nature, 457(7227), 318-321. https://doi.org/10.1038/nature07472

Kurotaki, D., Sasaki, H. et Tamura, T. (2017). Transcriptional control of monocyte and macrophage development. International Immunology, 29(3), 97-107. https://doi.org/10.1093/intimm/dxx016

Lacout, C., Pisani, D. F., Tulliez, M., Gachelin, F. M., Vainchenker, W. et Villeval, J.-L. (2006). JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. Blood, 108(5), 1652-1660. https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-002030

Lakso, M., Pichel, J. G., Gorman, J. R., Sauer, B., Okamoto, Y., Lee, E., Alt, F. W. et Westphal, H. (1996). Efficient in vivo manipulation of mouse genomic sequences at the zygote stage. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93(12), 5860-5865. https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.5860

Lauber, K., Bohn, E., Kröber, S. M., Xiao, Y., Blumenthal, S. G., Lindemann, R. K., Marini, P., Wiedig, C., Zobywalski, A., Baksh, S., Xu, Y., Autenrieth, I. B., Schulze-Osthoff, K., Belka, C., Stuhler, G. et Wesselborg, S. (2003). Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. Cell, 113(6), 717-730. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00422-7

Lawrence, T. et Natoli, G. (2011). Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. Nature Reviews Immunology, 11(11), 750-761. https://doi.org/10.1038/nri3088

Le, M., Ghazawi, F. M., Rahme, E., Alakel, A., Netchiporouk, E., Savin, E., Zubarev, A., Glassman, S. J., Sasseville, D., Popradi, G. et Litvinov, I. V. (2019). Identification of significant geographic clustering of polycythemia vera cases in Montreal, Canada. Cancer, 125(22), 3953-3959. https://doi.org/10.1002/cncr.32417

Lee, G., Lo, A., Short, S. A., Mankelow, T. J., Spring, F., Parsons, S. F., Yazdanbakhsh, K., Mohandas, N., Anstee, D. J. et Chasis, J. A. (2006). Targeted gene deletion demonstrates that the cell adhesion molecule ICAM-4 is critical for erythroblastic island formation. Blood, 108(6), 2064-2071. https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-006759

Leimberg, M. J., Prus, E., Konijn, A. M. et Fibach, E. (2008). Macrophages function as a ferritin iron source for cultured human erythroid precursors. Journal of Cellular Biochemistry, 103(4), 1211-1218. https://doi.org/10.1002/jcb.21499

Lévesque, J.-P., Summers, K. M., Bisht, K., Millard, S. M., Winkler, I. G. et Pettit, A. R. (2021). Macrophages form erythropoietic niches and regulate iron homeostasis to adapt erythropoiesis in response to infections and inflammation. Experimental Hematology, 103, 1-14. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2021.08.011

Li, J., Kent, D. G., Chen, E. et Green, A. R. (2011). Mouse models of myeloproliferative neoplasms: JAK of all grades. Disease Models & Mechanisms, 4(3), 311-317. https://doi.org/10.1242/dmm.006817

Li, J., Spensberger, D., Ahn, J. S., Anand, S., Beer, P. A., Ghevaert, C., Chen, E., Forrai, A., Scott, L. M., Ferreira, R., Campbell, P. J., Watson, S. P., Liu, P., Erber, W. N., Huntly, B. J. P., Ottersbach, K. et Green, A. R. (2010). JAK2 V617F impairs hematopoietic stem cell function in a conditional knock-in mouse model of JAK2 V617F–positive essential thrombocythemia. Blood, 116(9), 1528-1538. https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-259747

Li, W., Wang, Y., Zhao, H., Zhang, H., Xu, Y., Wang, S., Guo, X., Huang, Y., Zhang, S., Han, Y., Wu, X., Rice, C. M., Huang, G., Gallagher, P. G., Mendelson, A., Yazdanbakhsh, K., Liu, J., Chen, L. et An, X. (2019).

Identification and transcriptome analysis of erythroblastic island macrophages. Blood, 134(5), 480-491. https://doi.org/10.1182/blood.2019000430

Liao, C., Prabhu, K. S. et Paulson, R. F. (2018). Monocyte-derived macrophages expand the murine stress erythropoietic niche during the recovery from anemia. Blood, 132(24), 2580-2593. https://doi.org/10.1182/blood-2018-06-856831

Liau, N. P. D., Laktyushin, A., Lucet, I. S., Murphy, J. M., Yao, S., Whitlock, E., Callaghan, K., Nicola, N. A., Kershaw, N. J. et Babon, J. J. (2018). The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1. Nature Communications, 9, 1558. https://doi.org/10.1038/s41467-018-04013-1

Lifshitz, L., Tabak, G., Gassmann, M., Mittelman, M. et Neumann, D. (2010). Macrophages as novel target cells for erythropoietin. Haematologica, 95(11), 1823-1831. https://doi.org/10.3324/haematol.2010.025015

Lippert, E., Boissinot, M., Kralovics, R., Girodon, F., Dobo, I., Praloran, V., Boiret-Dupré, N., Skoda, R. C. et Hermouet, S. (2006). The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. Blood, 108(6), 1865-1867. https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-013540

Liu, L., Guo, H., Song, A., Huang, J., Zhang, Y., Jin, S., Li, S., Zhang, L., Yang, C. et Yang, P. (2020). Progranulin inhibits LPS-induced macrophage M1 polarization via NF-κB and MAPK pathways. BMC Immunology, 21, 32. https://doi.org/10.1186/s12865-020-00355-y

Liu, Y., Pop, R., Sadegh, C., Brugnara, C., Haase, V. H. et 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. https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-4458

Luo, B., Gan, W., Liu, Z., Shen, Z., Wang, J., Shi, R., Liu, Y., Liu, Y., Jiang, M., Zhang, Z. et Wu, Y. (2016). Erythropoeitin Signaling in Macrophages Promotes Dying Cell Clearance and Immune Tolerance. Immunity, 44(2), 287-302. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.002

Luo, B., Wang, Z., Zhang, Z., Shen, Z. et Zhang, Z. (2019). The deficiency of macrophage erythropoietin signaling contributes to delayed acute inflammation resolution in diet-induced obese mice. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 1865(2), 339-349. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.10.005

Maceyka, M., Harikumar, K. B., Milstien, S. et Spiegel, S. (2012). SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE SIGNALING AND ITS ROLE IN DISEASE. Trends in Cell Biology, 22(1), 50-60. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.003

Marsee, D. K., Pinkus, G. S. et 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. https://doi.org/10.1309/AJCPCRK3MOAOJ6AT

Marty, C., Lacout, C., Martin, A., Hasan, S., Jacquot, S., Birling, M.-C., Vainchenker, W. et Villeval, J.-L. (2010). Myeloproliferative neoplasm induced by constitutive expression of JAK2V617F in knock-in mice. Blood, 116(5), 783-787. https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-257063

Mebius, R. E. et Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. Nature Reviews Immunology, 5(8), 606-616. https://doi.org/10.1038/nri1669

Mitchell, A. J., Pradel, L. C., Chasson, L., Van Rooijen, N., Grau, G. E., Hunt, N. H. et Chimini, G. (2010). Technical Advance: Autofluorescence as a tool for myeloid cell analysis. Journal of Leukocyte Biology, 88(3), 597-603. https://doi.org/10.1189/jlb.0310184

Mosser, D. M. et Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nature reviews. Immunology, 8(12), 958-969. https://doi.org/10.1038/nri2448

Mulder, R., Banete, A. et Basta, S. (2014). Spleen-derived macrophages are readily polarized into classically activated (M1) or alternatively activated (M2) states. Immunobiology, 219(10), 737-745. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.05.005

Mullally, A., Lane, S. W., Ball, B., Megerdichian, C., Okabe, R., Al-Shahrour, F., Paktinat, M., Haydu, J. E., Housman, E., Lord, A. M., Wernig, G., Kharas, M. G., Mercher, T., Kutok, J. L., Gilliland, D. G. et Ebert, B. L. (2010). Physiological Jak2V617F expression causes a lethal myeloproliferative neoplasm with differential effects on hematopoietic stem and progenitor cells. Cancer cell, 17(6), 584-596. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.05.015

Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J. A., Ivashkiv, L. B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F. O., Mege, J.-L., Mosser, D. M., Natoli, G., Saeij, J. P., Schultze, J. L., Shirey, K. A., … Wynn, T. A. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. Immunity, 41(1), 14-20. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008

Muta, K., Krantz, S. B., Bondurant, M. C. et Wickrema, A. (1994). Distinct roles of erythropoietin, insulin-like growth factor I, and stem cell factor in the development of erythroid progenitor cells. Journal of Clinical Investigation, 94(1), 34-43.

Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A. B. et Ley, K. (2019). Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS–) vs. Alternatively Activated Macrophages. Frontiers in Immunology, 10. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.01084

Paulson, R. F., Ruan, B., Hao, S. et Chen, Y. (2020). Stress Erythropoiesis is a Key Inflammatory Response. Cells, 9(3), E634. https://doi.org/10.3390/cells9030634

Paulson, R. F., Shi, L. et Wu, D.-C. (2011). Stress erythropoiesis: new signals and new stress progenitor cells. Current opinion in hematology, 18(3), 139-145. https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32834521c8

Perron-Deshaies, G., St-Louis, P., Romero, H. et Scorza, T. (2020). Impact of Erythropoietin Production by Erythroblastic Island Macrophages on Homeostatic Murine Erythropoiesis. International Journal of Molecular Sciences, 21(23), 8930. https://doi.org/10.3390/ijms21238930

Porpiglia, E., Hidalgo, D., Koulnis, M., Tzafriri, A. R. et Socolovsky, M. (2012). Stat5 Signaling Specifies Basal versus Stress Erythropoietic Responses through Distinct Binary and Graded Dynamic Modalities. PLoS Biology, 10(8), e1001383. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001383

Quintás-Cardama, A., Vaddi, K., Liu, P., Manshouri, T., Li, J., Scherle, P. A., Caulder, E., Wen, X., Li, Y., Waeltz, P., Rupar, M., Burn, T., Lo, Y., Kelley, J., Covington, M., Shepard, S., Rodgers, J. D., Haley, P., Kantarjian, H., … Verstovsek, S. (2010). Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. Blood, 115(15), 3109-3117. https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-214957

Ramos, P., Casu, C., Gardenghi, S., Breda, L., Crielaard, B. J., Guy, E., Marongiu, M. F., Gupta, R., Levine, R. L., Abdel-Wahab, O., Ebert, B. L., Van Rooijen, N., Ghaffari, S., Grady, R. W., Giardina, P. J. et Rivella, S. (2013). Macrophages support pathological erythropoiesis in Polycythemia Vera and Beta-Thalassemia. Nature medicine, 19(4), 437-445. https://doi.org/10.1038/nm.3126

Ramos-Perez, W. D., Fang, V., Escalante-Alcalde, D., Cammer, M. et Schwab, S. R. (2015). A map of the distribution of sphingosine 1-phosphate in the spleen. Nature Immunology, 16(12), 1245-1252. https://doi.org/10.1038/ni.3296

Ravichandran, K. S. (2011). Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. Immunity, 35(4), 445-455. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.09.004

Recio, C., Aranda-Tavío, H., Guerra-Rodríguez, M., Mirecki-Garrido, M. de, Martín-Rodríguez, P., Guerra, B. et Fernández-Pérez, L. (2019). JAK, an Oncokinase in Hematological Cancer. Tyrosine Kinases as Druggable Targets in Cancer. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.84177

Rhodes, M. M., Kopsombut, P., Bondurant, M. C., Price, J. O. et 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. https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-098178

Sadahira, Y. et Mori, M. (1999). Role of the macrophage in erythropoiesis. Pathology International, 49(10), 841-848. https://doi.org/10.1046/j.1440-1827.1999.00954.x

Sakata, S., Nakatani, A., Jimaru, D., Ueda, M., Kohzuki, H., Ohga, Y., Misawa, H. et Takaki, M. (1999). Measurement of mouse plasma erythropoietin by an improved ELISA. Comparative Haematology International, 9(2), 110-115. https://doi.org/10.1007/BF02585545

Schnyder, B., Schnyder-Candrian, S., Panski, A., Bömmel, H., Heim, M., Duschl, A. et Moser, R. (2002). Phytochemical Inhibition of Interleukin-4-Activated Stat6 and Expression of VCAM-1. Biochemical and Biophysical Research Communications, 292(4), 841-847. https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6754

Shim, Y. A., Campbell, T., Weliwitigoda, A., Dosanjh, M. et Johnson, P. (2020). Regulation of CD71+TER119+ erythroid progenitor cells by CD45. Experimental Hematology, 86, 53-66.e1. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2020.05.005

Sivasubramaniyam, T., Schroer, S. A., Li, A., Luk, C. T., Shi, S. Y., Besla, R., Dodington, D. W., Metherel, A. H., Kitson, A. P., Brunt, J. J., Lopes, J., Wagner, K.-U., Bazinet, R. P., Bendeck, M. P., Robbins, C. S. et Woo, M. (2017). Hepatic JAK2 protects against atherosclerosis through circulating IGF-1. JCI Insight, 2(14), e93735. https://doi.org/10.1172/jci.insight.93735

Song, A. J. et Palmiter, R. D. (2018). Detecting and Avoiding Problems When Using the Cre/lox System. Trends in genetics : TIG, 34(5), 333-340. https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.12.008

Spring, F. A., Parsons, S. F., Ortlepp, S., Olsson, M. L., Sessions, R., Brady, R. L. et Anstee, D. J. (2001). Intercellular adhesion molecule-4 binds alpha(4)beta(1) and alpha(V)-family integrins through novel integrin-binding mechanisms. Blood, 98(2), 458-466. https://doi.org/10.1182/blood.v98.2.458

Stein, M., Keshav, S., Harris, N. et Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. The Journal of Experimental Medicine, 176(1), 287-292. https://doi.org/10.1084/jem.176.1.287

Suzuki, A., Leland, P., Joshi, B. H. et Puri, R. K. (2015). Targeting of IL-4 and IL-13 receptors for cancer therapy. Cytokine, 75(1), 79-88. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.026

Szanto, A., Balint, B. L., Nagy, Z. S., Barta, E., Dezso, B., Pap, A., Szeles, L., Poliska, S., Oros, M., Evans, R. M., Barak, Y., Schwabe, J. et Nagy, L. (2010). STAT6 Transcription Factor Is a Facilitator of the Nuclear Receptor PPARγ-Regulated Gene Expression in Macrophages and Dendritic Cells. Immunity, 33(5), 699-712. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.009

Truman, L. A., Ford, C. A., Pasikowska, M., Pound, J. D., Wilkinson, S. J., Dumitriu, I. E., Melville, L., Melrose, L. A., Ogden, C. A., Nibbs, R., Graham, G., Combadiere, C. et Gregory, C. D. (2008). CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. Blood, 112(13), 5026-5036. https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-162404

Trzebanski, S. et Jung, S. (2020). Plasticity of monocyte development and monocyte fates. Immunology Letters, 227, 66-78. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.07.007

Tsai, H.-C. et Han, M. H. (2016). Sphingosine-1-Phosphate (S1P) and S1P Signaling Pathway: Therapeutic Targets in Autoimmunity and Inflammation. Drugs, 76(11), 1067-1079. https://doi.org/10.1007/s40265-016-0603-2

Vainchenker, W., Leroy, E., Gilles, L., Marty, C., Plo, I. et Constantinescu, S. N. (2018). JAK inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasms and other disorders. F1000Research, 7, 82. https://doi.org/10.12688/f1000research.13167.1

van de Laar, L., Saelens, W., De Prijck, S., Martens, L., Scott, C. L., Van Isterdael, G., Hoffmann, E., Beyaert, R., Saeys, Y., Lambrecht, B. N. et Guilliams, M. (2016). Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages. Immunity, 44(4), 755-768. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.017

Viola, A., Munari, F., Sánchez-Rodríguez, R., Scolaro, T. et Castegna, A. (2019). The Metabolic Signature of Macrophage Responses. Frontiers in Immunology, 10, 1462. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01462

Wang, J., Takemura, N. et Saitoh, T. (2021). Macrophage Response Driven by Extracellular ATP. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 44(5), 599-604. https://doi.org/10.1248/bpb.b20-00831

Weigert, A., Johann, A. M., von Knethen, A., Schmidt, H., Geisslinger, G. et Brüne, B. (2006). Apoptotic cells promote macrophage survival by releasing the antiapoptotic mediator sphingosine-1-phosphate. Blood, 108(5), 1635-1642. https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-014852

Wernig, G., Mercher, T., Okabe, R., Levine, R. L., Lee, B. H. et Gilliland, D. G. (2006). Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera–like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. Blood, 107(11), 4274-4281. https://doi.org/10.1182/blood-2005-12-4824

Whyte, C. S., Bishop, E. T., Rückerl, D., Gaspar-Pereira, S., Barker, R. N., Allen, J. E., Rees, A. J. et Wilson, H. M. (2011). Suppressor of cytokine signaling (SOCS)1 is a key determinant of differential macrophage activation and function. Journal of Leukocyte Biology, 90(5), 845-854. https://doi.org/10.1189/jlb.1110644

Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R. et 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. https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90234-1

Xiang, J., Wu, D.-C., Chen, Y. et Paulson, R. F. (2015). In vitro culture of stress erythroid progenitors identifies distinct progenitor populations and analogous human progenitors. Blood, 125(11), 1803-1812. https://doi.org/10.1182/blood-2014-07-591453

Xing, S., Wanting, T. H., Zhao, W., Ma, J., Wang, S., Xu, X., Li, Q., Fu, X., Xu, M. et Zhao, Z. J. (2008). Transgenic expression of JAK2V617F causes myeloproliferative disorders in mice. Blood, 111(10), 5109-5117. https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-091579

Yamada, Y., Maeda, M., Alshahni, M. M., Monod, M., Staib, P. et Yamada, T. (2014). Flippase (FLP) recombinase-mediated marker recycling in the dermatophyte Arthroderma vanbreuseghemii. Microbiology (Reading, England), 160(Pt 10), 2122-2135. https://doi.org/10.1099/mic.0.076562-0

Yáñez, A., Coetzee, S. G., Olsson, A., Muench, D. E., Berman, B. P., Hazelett, D. J., Salomonis, N., Grimes, H. L. et Goodridge, H. S. (2017). Granulocyte-Monocyte Progenitors and Monocyte-Dendritic Cell Progenitors Independently Produce Functionally Distinct Monocytes. Immunity, 47(5), 890-902.e4. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.10.021

Zaleskas, V. M., Krause, D. S., Lazarides, K., Patel, N., Hu, Y., Li, S. et Van Etten, R. A. (2006). Molecular Pathogenesis and Therapy of Polycythemia Induced in Mice by JAK2 V617F. PLoS ONE, 1(1), e18. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000018

Zang, H., Sato, K., Nakajima, H., McKay, C., Ney, P. A. et Ihle, J. N. (2001). The distal region and receptor tyrosines of the Epo receptor are non-essential for in vivo erythropoiesis. The EMBO journal, 20(12), 3156-3166. https://doi.org/10.1093/emboj/20.12.3156

Zhang, H., Wang, S., Liu, D., Gao, C., Han, Y., Guo, X., Qu, X., Li, W., Zhang, S., Geng, J., Zhang, L., Mendelson, A., Yazdanbakhsh, K., Chen, L. et An, X. (2021). EpoR-tdTomato-Cre mice enable identification of EpoR expression in subsets of tissue macrophages and hematopoietic cells. Blood, 138(20), 1986-1997. https://doi.org/10.1182/blood.2021011410

Zhao, W., Zou, K., Farasyn, T., Ho, W. T. et Zhao, Z. J. (2014). Generation and characterization of a JAK2V617F-containing erythroleukemia cell line. PloS One, 9(7), e99017. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099017

Zhou, D., Huang, C., Lin, Z., Zhan, S., Kong, L., Fang, C. et Li, J. (2014). Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. Cellular Signalling, 26(2), 192-197. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.004

Zhou, J., Bai, Y., Jiang, Y., Tarun, P., Feng, Y., Huang, R. et Fu, P. (2020). Immunomodulatory role of recombinant human erythropoietin in acute kidney injury induced by crush syndrome via inhibition of the TLR4/NF-κB signaling pathway in macrophages. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 42(1), 37-47. https://doi.org/10.1080/08923973.2019.1706555