

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

INHIBITION DE LA MOBILISATION DES CELLULES SOUCHES
ET ALTÉRATION DE LA POPULATION DE MACROPHAGES
PAR LA CALCITONINE LORS DE LA MALARIA

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

HUGO ROMÉRO

MAI 2015

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.01-2006). 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

J'aimerais tout d'abord remercier le Professeur Tatiana Scorza dit « Tati » sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui. Je voudrais la remercier de m'avoir offert le privilège de travailler et d'apprendre à ses côtés. Elle a su me transmettre sa passion pour la recherche et l'envie de continuer dans ce domaine. Son inestimable patience, son aide, son énergie et sa bonne humeur quotidienne m'ont permis de venir à bout de ce mémoire. Un grand merci au señor Jaime Dardon Sanchez pour toujours avoir été là quand on a eu besoin de lui, pour m'avoir appris les rudiments du travail en laboratoire et bien plus encore. Je tiens à remercier Christopher Warburton pour la paix qu'il a apportée à l'ambiance du bureau. Merci à eux deux pour les bons moments partagés dans ce placard anguleux qui nous sert de bureau. Sans oublier ceux qui m'ont soutenu tout au long de ces deux ans et qui étaient à mes côtés durant les nombreuses heures de travail : Céline Signor, Marine Regnier, Rachel Pierre, Julie Reinling, Vincent Poupart et Juliette Bougnon. Enfin, merci au Sain Fractal pour la source inépuisable de caféine et de tasses qui encombrent le bureau.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES	vii
RÉSUMÉ	xi
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES	3
1.1 Remodelage osseux	3
1.2 Les niches endostéales	7
1.3 Implication des cellules osseuses dans la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques	9
1.4 Induction de la mobilisation des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques	12
1.5 La calcitonine	13
1.6 L'érythropoïèse homéostatique	15
1.7 L'érythropoïétine	20
1.8 L'érythropoïèse de stress	22
1.9 La malaria	25
1.10 La réponse immunitaire lors de la malaria	28
CHAPITRE II	
HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	33
CHAPITRE III	
MÉTHODOLOGIE	35
3.1 Modèle animal	35
3.2 Détermination de la cinétique d'infection	36
3.3 Détermination de la réticulocytose	36
3.4 Dosage de l'hémoglobine sanguine	36
3.5 Préparation des cellules de la rate	37

3.6	Préparation des cellules de la moelle osseuse	38	
3.7	Différenciation des Macrophages <i>in vitro</i>	38	
3.8	Cytofluorométrie de flux	39	
3.9	Génération de <i>Colony-Forming Unit-Macrophage</i>	40	
3.10	Analyses Statistiques	40	
CHAPITRE IV			
RÉSULTATS			41
4.1	L'inhibition de la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques par la calcitonine n'altère pas la résolution de l'anémie induite par la phlébotomie .	41	
4.2	L'administration de calcitonine exacerbe la parasitémie et l'anémie chez les souris infectées par <i>P. c. adami</i> DK sans altérer la réponse érythropoïétique .	48	
4.3	La calcitonine réduit le nombre de macrophages spléniques et médullaires lors de l'infection par <i>P. c. adami</i> DK	57	
CHAPITRE V			
DISCUSSION			61
CHAPITRE VI			
CONCLUSION			71
BIBLIOGRAPHIE.....			73

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Macrostructures osseuses	3
1.2 Microstructure osseuse	4
1.3 La résorption osseuse par les ostéoclastes	6
1.4 Immunophénotypage des cellules souches hématopoïétiques par cytofluorométrie en flux	8
1.5 Mobilisation, « homing » et ancrage des cellules souches hématopoïétiques	11
1.6 Mobilisation des cellules souches hématopoïétiques dépendante des ostéoclastes	12
1.7 Morphologie des différentes cellules érythropoïétiques	17
1.8 La lignée érythrocytaire	18
1.9 Identification par cytofluorométrie des différents stades de développement des érythroblastes	19
1.10 Modèle de l'érythropoïèse de stress	24
1.11 Le cycle de vie de <i>Plasmodium</i>	27
1.12 Immunité anti- <i>Plasmodium</i>	30
1.13 Implication des macrophages dans le contrôle de l'infection par <i>Plasmodium</i>	32
4.1 Impact de la calcitonine sur la cellularité et le nombre de cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse et la rate des souris rendues anémiques par phlébotomie	43

4.2 Effet de la calcitonine sur la concentration d'hémoglobine et réticulocytose causée par la phlébotomie	45
4.3 Impact de la calcitonine sur l'érythropoïèse de stress induite par la phlébotomie	47
4.4 Impact de la calcitonine sur la cellularité et le nombre de cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse et la rate lors de la malaria	50
4.5 Impact de la calcitonine sur la concentration d'hémoglobine et réticulocytose causée par la malaria	52
4.6 Effet de la calcitonine sur l'érythropoïèse de stress induite par la malaria	54
4.7 Effet de la calcitonine sur la parasitémie lors de l'infection par <i>P. c. adami</i> DK	56
4.8 Modulation de la population de macrophages par la calcitonine lors de la phlébotomie et de la malaria	58
4.9 Impact de la calcitonine sur la production de colonies M-CFU et la différenciation de précurseurs en macrophages (<i>in vitro</i>)	60

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique
BFU-E	<i>Burst Forming Unit - Erythroid</i>
BMP4	<i>Bone Morphogenic Protein 4</i>
CFU-E	<i>Colony Forming Unit - Erythroid</i>
CFU-GEMM	<i>Colony Forming Unit - Granulocyte Erythrocyte Megacaryocyte Macrophage</i>
CGRP	<i>Calcitonine Gene - Related Peptide</i>
CLR	<i>Calcitonine receptor - Like Receptor</i>
CMH I	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I
CPA	Cellule Présentatrice des Antigènes
CTR	Récepteur à la Calcitonine
CXCL12	C-X-C motif chemokine 12
CXCR4	C-X-C motif Receptor 4
DC	Cellule dendritique
EPO	Érythropoïétine
ERK1/2	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
EryA	Érythroblaste basophile
EryB	Érythroblaste polychromatophile
EryC	Érythroblaste orthochromatophile

G-CSF	<i>Granulocyte - Colony Stimulating Factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte/Macrophage - Colony Stimulating Factor</i>
GPA	Glycophorine A
HCl	Acide Chlorhydrique
HSC	Cellule Souche Hématopoïétique
HSPC	Cellule Souche et Progéniteur Hématopoïétique
IFN- γ	Interféron - γ
IL-1	Interleukine 1
IL-10	Interleukine 10
IL-12	Interleukine 12
IL-2	Interleukine 2
IL-3	Interleukine 3
IL-4	Interleukine 4
IL-5	Interleukine 5
IL-6	Interleukine 6
IL-8	Interleukine 8
LPS	Lipopolysaccharides
M-CFU	<i>Macrophage - Colony Forming Unit</i>
M-CSF	<i>Macrophage - Colony Stimulating Factor</i>
MMP-14	Métalloprotéase 14.
MMP-9	Métalloprotéase 9
MO	Moelle Osseuse
NK	<i>Natural Killer</i>

PPR	<i>Pattern-Recognition Receptor</i>
ProE	Proérythroblaste
RAMP	<i>Receptor Activity Modifying Protein</i>
RANKL	<i>Receptor Activator Nuclear factor-κB Ligand</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
Sca-1	<i>Stem cell antigen 1</i>
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SDF-1	<i>Stromal Cell Derived Factor 1</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth factor β</i>
Th1	Cellules T auxiliaires de type 1
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TRAP	Phosphatase Résistante au Tartrate

[Cette page a été laissée intentionnellement blanche]

RÉSUMÉ

L'infection par *Plasmodium*, l'agent étiologique de la malaria, génère une anémie et une inflammation importante chez l'hôte, lesquels déclenchent une hématopoïèse de stress. Dernièrement, il a été montré que l'anémie causée par la phlébotomie (saignement) et l'inflammation induite par l'injection de lipopolysaccharides chez la souris induisent une mobilisation des cellules souches hématopoïétiques (HSC) de la moelle osseuse (MO) vers la périphérie, dépendante de l'activité de résorption osseuse des ostéoclastes. Dans le but d'étudier l'importance de cette activité dans le contexte d'une hématopoïèse de stress en réponse à une anémie hémolytique et un état d'inflammation systémique, nous avons évalué l'implication des ostéoclastes dans la mobilisation des HSC et l'érythropoïèse de stress causée par la malaria. Pour cela, des souris BALB/c ont été traitées 5 jours avec de la calcitonine (une hormone inhibitrice de l'activité des ostéoclastes) et au 3^{ème} jour de traitement, les souris ont été infectées avec *P. chabaudi adami* DK. Ce parasite provoque une inflammation systémique et une anémie hémolytique aigüe, qui déclenchent la production des érythrocytes dans la rate (érythropoïèse de stress) et génèrent une splénomégalie importante. Nous avons suivi la parasitémie, la concentration en hémoglobine sanguine et la réticulocytose quotidiennement. Des souris phlébotomisées ont servi comme contrôles représentatifs d'une anémie en absence d'inflammation. Un jour après le pic de parasitémie, différents paramètres hématopoïétiques ont été évalués dans la MO et la rate. Notre analyse a révélé un nombre réduit de HSC et de précurseurs érythroïdes dans la rate, et une rétention des précurseurs érythroïdes dans la MO des souris traitées avec de la calcitonine, ce qui confirme une inhibition de la mobilisation. Cependant, la production de réticulocytes est restée comparable chez les souris traitées avec la calcitonine et les souris témoins infectées, ainsi que chez des souris phlébotomisées. De façon remarquable, la parasitémie et l'anémie causées par l'infection ont été plus importantes chez des souris traitées avec de la calcitonine, qui ont développé aussi une réticulocytose plus prolongée. Cette hausse dans l'infection pourrait être conséquente à une production déficiente des macrophages dans la MO, étant donné que l'administration de calcitonine a réduit drastiquement leur nombre dans la MO et la rate des souris infectées. De façon intéressante, aucun effet majeur n'a été constaté sur les populations des macrophages des souris naïves et phlébotomisées, prétraitées avec de la calcitonine. Notre analyse *in vitro* a révélé une inhibition de l'apparition des colonies *Macrophage - Colony Forming Unit* (M-CFU) par la calcitonine, dans un milieu de culture semi-solide supplémenté de *Macrophage - Colony Stimulating*

Factor (M-CSF). Paradoxalement, aucun effet n'a été constaté sur la différenciation de macrophages à partir de précurseurs hématopoïétiques stimulés seulement avec du M-CSF. Dans l'ensemble, nos résultats indiquent que l'érythropoïèse de stress causée par la malaria ou la phlébotomie chez la souris ne nécessitent pas la mobilisation des HSC. Il reste à être établi si la chute marquée des macrophages dans la MO et la rate des souris infectées prétraitées avec la calcitonine est reliée à une inhibition de leur production dans la MO par la calcitonine, ou si la calcitonine affecte aussi la survie des phagocytes en situation de stress oxydatif d'origine hémolytique.

Mots clés : malaria, anémie, érythropoïèse de stress, calcitonine, macrophages.

INTRODUCTION

La malaria est une maladie provoquée par des protozoaires du genre *Plasmodium*, caractérisée par une inflammation systémique et une anémie hémolytique aigue (1). Dans notre laboratoire, nous utilisons une espèce de *Plasmodium* donnant lieu à une infection non létale chez la souris : *P. chabaudi adami* DK. L'anémie induite par la réplication de ce parasite au sein des érythrocytes déclenche une érythropoïèse de stress afin de produire de nouveaux érythrocytes pour compenser ceux détruits par le parasite (2).

L'érythropoïèse de stress est le processus par lequel les cellules souches hématopoïétiques (HSC) et les progéniteurs érythroïdes prolifèrent intensivement et se différencient pour générer de nouveaux érythrocytes en réponse à une hypoxie. La majorité des HSC sont localisées dans la moelle osseuse (MO) au niveau de l'endosteum, une couche cellulaire composée d'ostéoblastes et de cellules stromales séparant la MO du tissu osseux (3,4). Ces cellules établissent des contacts étroits avec les cellules de l'endosteum formant ainsi un microenvironnement spécifique appelé niche endostéale de HSC (5). De manière physiologique ou en réponse à différents stimuli, les HSC quittent ces niches pour entrer dans la circulation sanguine (6,7). Ces cellules circulantes peuvent, soit se nicher dans des organes hématopoïétiques extra-médullaires comme la rate et le foie, ou soit regagner la MO par un processus appelé « homing » (8,9). En condition d'anémie aigüe, comme lors de la malaria, une importante mobilisation de HSC de la MO vers la rate a lieu (10,11).

Dernièrement, il a été démontré que les ostéoclastes, des cellules normalement impliquées dans la dégradation de la matrice osseuse, ont un rôle clé dans la

mobilisation des HSC. En réponse à des stimuli de stress hématopoïétique comme l'inflammation induite par l'injection de lipopolysaccharide (LPS) ou l'anémie induite par saignement, les ostéoclastes dégradent les composantes qui retiennent les HSC au sein des niches endostéales, provoquant ainsi la mobilisation des HSC (12). En effet, la calcitonine, une hormone connue pour inhiber l'activité des ostéoclastes, réduit l'égression des HSC induite par le LPS. Cependant, le rôle de la mobilisation des HSC dépendante des ostéoclastes dans l'érythropoïèse de stress en condition d'inflammation n'a pas été étudié en détail.

Dans cette étude, nous avons montré que l'inhibition de l'activité des ostéoclastes par la calcitonine inhibe la mobilisation des HSC de la MO vers la rate et réduit le nombre de progéniteurs érythroïdes dans la rate lors de l'infection par *P. c. adami* DK. Cependant, la mobilisation des HSC dépendante des ostéoclastes ne semble pas nécessaire pour la résolution de l'anémie induite par l'infection ou par la phlébotomie. Enfin, les souris traitées à la calcitonine présentent une parasitémie accrue associée à une diminution du nombre de macrophages dans la MO et la rate. Le mécanisme par lequel la calcitonine module le nombre de macrophages lors de la malaria reste encore à être déterminé.

CHAPITRE 1 : ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Remodelage osseux

Les principales fonctions de l'os sont la protection des organes internes et la MO, l'attachement des muscles et l'hémostasie du calcium et du phosphate. Comme représenté dans la figure 1.1, deux types de structures osseuses sont retrouvées : l'os cortical qui assure la résistance du squelette et l'os trabéculaire qui contient la MO (13).

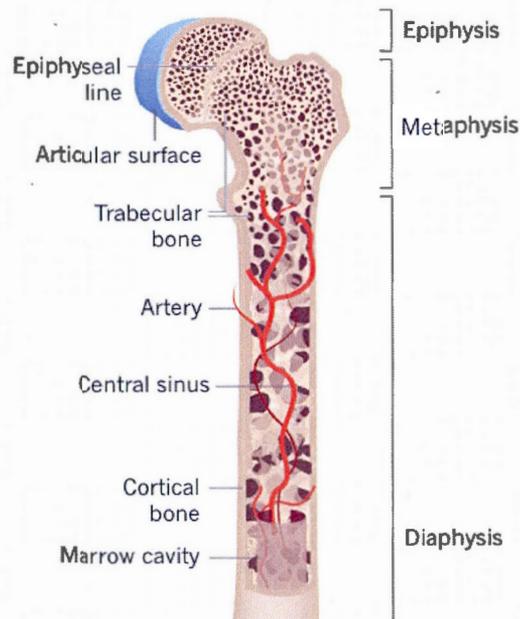


Figure 1.1 Macrostructures osseuses. Le tissu osseux est composé de l'os trabéculaire et l'os cortical. Les os sont irrigués par un important réseau d'artères et de veines. Les structures trabéculaires de l'os servent de niche pour la MO. Figure tirée de Morrison *et al.* (14).

L'os se compose d'une matrice extracellulaire et de cellules osseuses (ostéocytes). La matrice osseuse est principalement constituée de fibres de collagène de type I et de cristaux d'hydroxyapatite qui lui confèrent sa résistance (figure 1.2). Tout au long de la vie, le tissu osseux subit un renouvellement constant reposant sur la dégradation de l'os vieux et son remplacement par un nouveau tissu osseux. Ainsi, il y a une maintenance de la forme, de la taille et de la qualité du squelette. Ce processus est finement régulé par l'action coordonnée de deux types cellulaires, les ostéoclastes et les ostéoblastes (15).

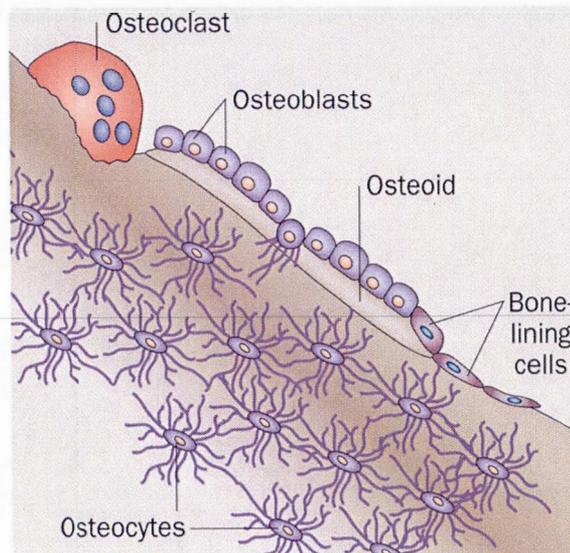


Figure 1.2 Microstructure osseuse. L'os se compose d'une matrice extracellulaire formée de collagène de type I et cristaux d'hydroxyapatites, et de cellules (ostéocytes). Le remodelage osseux débute par la dégradation de la matrice osseuse par les ostéoclastes et se poursuit par la synthèse de l'ostéoïde par les ostéoblastes. Les ostéocytes sont des ostéoblastes prisonniers de l'os. Figure tirée de Digirolamo *et al.* (16).

Les ostéoclastes sont de grosses cellules plurinucléées dérivées des HSC (17–20). La voie de différenciation des ostéoclastes à partir des précurseurs myéloïdes est commune avec celle des macrophages (21,22) et des cellules dendritiques (23). La génération d'ostéoclastes est majoritairement contrôlée par le *Macrophage - Colony Stimulating Factor* (M-CSF) (24) et le *Receptor Activator Nuclear factor- κ B ligand* (RANKL) (25). La principale fonction physiologique connue des ostéoclastes est la dégradation de la matrice osseuse et pour cela, les ostéoclastes se fixent sur la matrice osseuse et développent une bordure plissée vers l'os (26,27). Ils vont par la suite sécréter de l'acide chlorhydrique (28,29), de la phosphatase résistante au tartrate (TRAP) (30,31) et des enzymes lysosomales comme les métalloprotéases MMP-9 et MMP-14 (32), la cathepsine K (33–35) et des collagénases (36) qui dégradent la matrice osseuse dans la lacune de résorption (figure 1.3).

La fonction des ostéoclastes est régulée par de nombreuses cytokines et hormones et notamment par la calcitonine. Ce peptide est impliqué dans l'inhibition de leur activité de résorption osseuse (37–39).

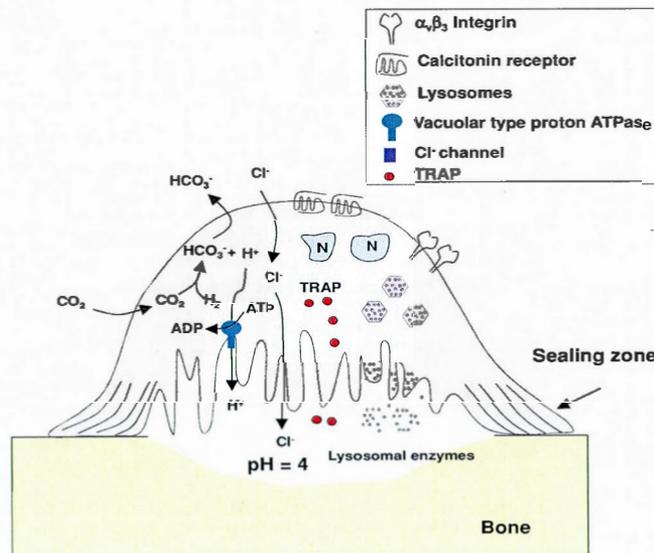


Figure 1.3 La résorption osseuse par les ostéoclastes. La fixation des ostéoclastes sur l'os déclenche leur polarisation et la sécrétion dans la lacune de résorption de l'acide chlorhydrique, le TRAP et d'enzymes lysosomales provoquant la dégradation de la matrice osseuse. Les ostéoclastes sont caractérisés par l'expression du récepteur à la calcitonine, lequel est impliqué dans l'inhibition de leur activité de résorption. Figure tirée de Nakamura *et al.* (40).

Les ostéoblastes sont les autres cellules impliquées dans le remodelage osseux. Ces cellules, d'origine mésenchymateuse, sont responsables de la formation de la matrice osseuse (41). En effet, ils produisent l'ostéoïde qui est formé de collagène de type I et d'autres protéines matricielles. L'ostéoïde va par la suite se minéraliser pour devenir la matrice osseuse (42). Les ostéoblastes, à force de produire de la matrice osseuse, peuvent se retrouver emprisonnés dans l'os et deviennent alors des ostéocytes, qui perdent progressivement leur capacité à produire la matrice osseuse. Les ostéocytes sont capables de détecter des fractures dans l'os grâce à leurs mécanosenseurs. Ils communiquent alors l'information aux autres cellules osseuses via leurs extensions cytoplasmiques (43).

Les ostéoblastes et d'autres cellules stromales s'organisent en une couche cellulaire recouvrant l'os, appelée endosteum. Ainsi, l'endosteum sépare la MO de l'os (44). Les ostéoblastes de l'endosteum établissent des contacts étroits avec les cellules de la MO et notamment avec les HSC, formant ainsi des niches hématopoïétiques (5).

1.2 Les niches endostéales

Grâce à leur capacité d'auto-renouvellement, de différenciation et de prolifération intensive, les HSC génèrent toutes les cellules sanguines et immunitaires tout au long de la vie. La majorité des HSC se retrouvent dans la MO (3,45,46), mais elles sont également présentes dans la rate et le foie (47,48). Les HSC sont caractérisées par un profil unique d'expression de marqueurs de surface. Contrairement à la majorité des cellules de la moelle osseuse, les HSC sont considérées « lineage » négatives, c'est-à-dire qu'elles ne présentent pas certains marqueurs de différenciation comme le CD3, le CD19, le GR1, le Ter119, le CD11b et le CD45R. Le CD3 et le CD19 sont des marqueurs spécifiques, respectivement, des lymphocytes T (49) et des lymphocytes B (50), l'expression du GR1 est associée aux cellules de la lignée myéloïde (51,52), tandis que le Ter119 est un marqueur spécifique de la lignée érythroïde (53). Le CD11b quand à lui est un marqueur associé aux macrophages/monocytes, aux cellules dendritiques, ainsi qu'à certaines sous-population de cellules T (54). Le CD45R est un marqueur plus généralement exprimé par les lymphocytes B (55), lymphocytes T (56) et les cellules NK (57).

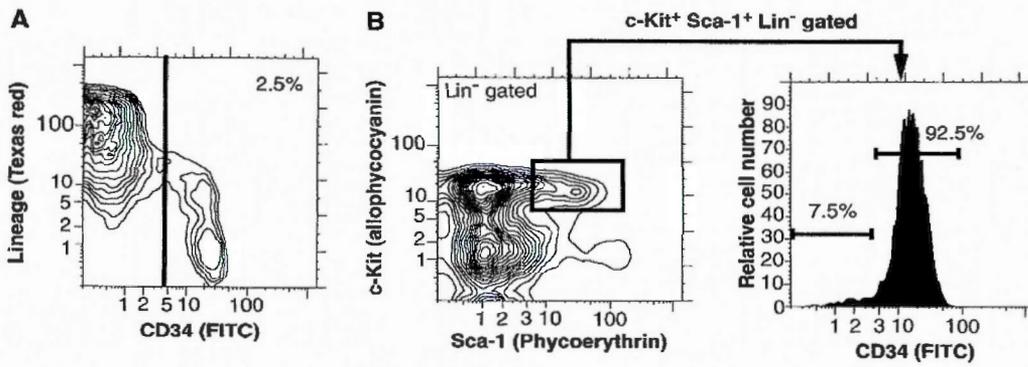


Figure 1.4 Immunophénotypage des cellules souches hématopoïétiques par cytofluorométrie en flux. (A) Les cellules de la MO sont représentées en fonction de l'expression du CD34 et du marquage au cocktail « lineage ». (B) Les cellules « lineage » négatives sont représentées en fonction de l'expression du c-Kit et de Sca-1. Les cellules « lineage » négatives et positives pour c-Kit et Sca-1 sont considérées comme étant des HSC. Plus de 90% des HSC expriment le CD34. Figure tirée d'Osawa *et al.* (46).

Comme présenté dans la figure 1.4, les HSC expriment les marqueurs de surface c-Kit et *Stem cell antigen 1* (Sca-1)(46). Le c-Kit est le récepteur du *Stem Cell Factor* (SCF) (58). La protéine membranaire Sca-1 est utilisée comme marqueur des HSC, mais sa fonction reste encore inconnue (59). Ces cellules se divisent en deux sous-populations principales, les HSC à long-terme, qui sont CD34 négatives et les HSC à court-terme, CD34 positives (46). En conditions homéostatiques, les HSC à long-terme se divisent peu et possèdent une forte capacité d'auto-renouvellement, leur permettant de reconstituer toutes les cellules de la lignée sanguine (60–62). Les HSC à court-terme ont une capacité d'auto-renouvellement plus limitée et s'engagent plus rapidement dans une voie de différenciation (63–65).

Les HSC établissent des contacts étroits avec les cellules de l'endosteum formant ainsi un microenvironnement spécifique appelé niche endostéale de cellules souches hématopoïétiques (4,5). Les HSC à long-terme sont principalement retrouvées dans les niches endostéales (66), dont le maintien nécessite les ostéoblastes et les cellules stromales de la MO (67,68). Ces derniers forment un microenvironnement spécifique permettant de réguler le pool de HSC dans la MO. En effet, au sein ces niches, les HSC sont en état de quiescence (69,70), et cet état est maintenu par la fixation de plusieurs molécules exprimées à la surface des ostéoblastes comme la N-cadherine, l'angiopoïétine-1 et la thrombopoïétine et l'interaction avec leur récepteur respectif à la surface des HSC principales, soient la N-cadherine, le Tie-2 et le c-Mpl, respectivement (66,70-74).

1.3 Implication des cellules osseuses dans la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques

En condition homéostatique, une faible proportion de cellules souches et de progéniteurs hématopoïétiques (HSPC) quittent spontanément la MO pour entrer dans la circulation sanguine (6,7). Ces cellules circulantes peuvent, soit s'établir dans des organes hématopoïétiques extra-médullaires comme la rate et le foie, soit regagner la MO par un processus appelé « homing » (8,9) (figure 1.5). Les HSC circulant se distinguent des HSC des niches hématopoïétiques par l'expression de CD34 à leur surface (46,75).

Il a été rapporté que les ostéoblastes contribuent à la rétention des HSPC au sein des niches endostéales. En effet, Visnjic *et al.* ont démontré que la déplétion spécifique des ostéoblastes diminue le nombre de HSPC dans la MO, augmente le nombre de HSPC en circulation et stimule l'hématopoïèse extra-médullaire. De plus,

l'expression de la N-cadhérine, une molécule d'adhésion cellulaire calcium-dépendante, à la surface des ostéoblastes et des HSC est cruciale pour le maintien de ces niches (71). De ce fait, les interactions ostéoblastes/HSC jouent un rôle primordial dans la formation et le maintien des niches endostéales de HSC.

La voie SDF-1/CXCR4 est également impliquée dans la formation des niches, et dans la survie et mobilisation des HSC. Le *Stromal Cell Derived Factor 1* (SDF-1), également appelé CXCL12, est une chimiokine de la famille des CXC ayant comme récepteur CXCR4, lequel est exprimé à la surface des HSC. Les ostéoblastes et les cellules stromales de l'endosteum expriment fortement le SDF-1 à leur surface, permettant ainsi la rétention des HSC au niveau des niches endostéales (76–78). En effet, les HSC migrent selon le gradient de SDF-1, et une augmentation du niveau plasmatique SDF-1 induit une égression des HSC de la MO (79,80). De plus, la déplétion spécifique du CXCR4 chez les HSC réduit leur viabilité (81) et stimule leur mobilisation de la MO vers la rate (82).

Les ostéoblastes expriment la forme membranaire du SCF, qui est le ligand du récepteur c-Kit exprimé à la surface des HSC (58,83). La cascade de signalisation activée par la fixation du SCF sur c-Kit stimule la survie des HSC (84). De plus, l'interaction SCF/c-Kit participe également au maintien des niches endostéales de HSC (85).

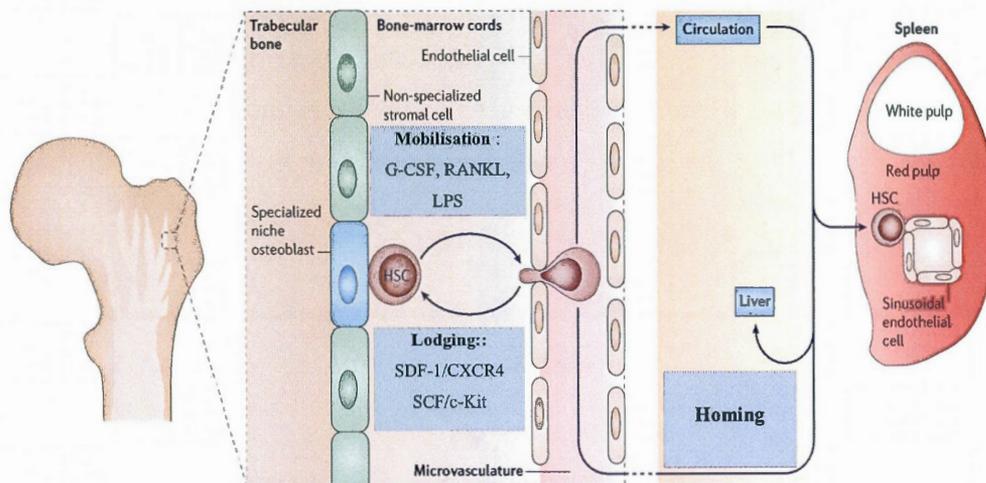


Figure 1.5 Mobilisation, « homing » et ancrage des cellules souches hématopoïétiques. Les HSC sont majoritairement localisées dans la MO, au niveau de microenvironnements spécialisés appelés niches de cellules souches hématopoïétiques. Leur rétention au sein de ces niches dépend des voies SDF-1/CXCR4, SCF/c-Kit et N-cadherine. L'égression des HSC en dehors de la MO a lieu de manière homéostatique, mais est stimulée davantage par le *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF), le RANKL, l'anémie et l'injection de LPS. Les HSC sortant de la MO nichent dans des tissus périphériques (rate ou le foie) ou retournent dans la MO (phénomène de *homing*). Figure tirée de Digirolamo *et al.* (16).

Dernièrement, il a été démontré que les ostéoclastes contribuent à la mobilisation des HSPC. Des situations de stress hématopoïétique, comme la réaction inflammatoire stimulée par le LPS ou l'anémie induite par saignement, déclenchent une mobilisation des HSPC dépendante des ostéoclastes. Plus spécifiquement, la stimulation de l'activité des ostéoclastes par le RANKL mobilise les HSPC, tandis que l'inhibition des ostéoclastes par la calcitonine exerce un effet opposé. Kollet *et al.* ont démontré que les ostéoclastes stimulent la mobilisation des HSPC en produisant la cathepsine K, une enzyme protéolytique qui clive le SDF-1 et le SCF. La dégradation de ces facteurs de rétention au sein des niches hématopoïétiques

endostéales induit la mobilisation des HSPC vers la circulation (12) (figure 1.6). De plus, les ostéoclastes produisent d'autres molécules pouvant intervenir dans la mobilisation, comme la MMP-9 (86,87), la cathepsine G (34) et l'interleukine 8 (IL-8) (88,89).

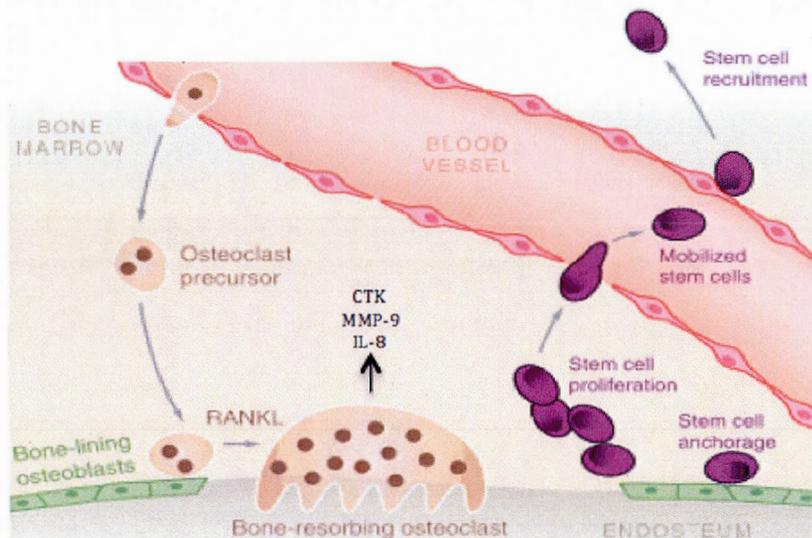


Figure 1.6 Mobilisation des cellules souches hématopoïétiques dépendante des ostéoclastes. La stimulation de l'activité des ostéoclastes par le RANKL augmente leur production d'enzymes protéolytiques MMP-9 et cathepsine K, lesquelles interrompent les interactions entre les HSC et les ostéoblastes, entraînant la sortie des HSC de la MO vers la circulation. Figure tirée de Kollet *et al.* (12).

1.4 Induction de la mobilisation des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques

La mobilisation des HSPC peut être stimulée par différents signaux de stress hématopoïétique comme l'inflammation, l'anémie ou lors d'une atteinte médullaire (12,90). Cette mobilisation diminue le nombre de HSPC dans la MO et l'augmente dans le sang et la rate (91).

Les cytokines les mieux connues pour stimuler la mobilisation des HSPC sont le *Granulocyte – Colony Stimulating Factor* (G-CSF) (92) et le *Granulocyte/Macrophage – Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) (93). L'interleukine 1 (IL-1) (94) et l'IL-8 (88) déclenchent également la mobilisation des HSPC. Le G-CSF est la principale cytokine stimulant la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques en neutrophiles (95). Comme l'ablation du récepteur G-CSF chez les HSPC n'affecte pas leur égression, il a été suggéré que le G-CSF agit de manière indirecte, via d'autres cellules (96). Lors de la mobilisation dépendante du G-CSF, l'activité de résorption osseuse des ostéoclastes augmente en causant une diminution de la masse osseuse (97,98). Une importante augmentation de la production et de l'activation des neutrophiles est aussi constatée, probablement expliquée par l'action connue du G-CSF sur la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques en neutrophiles (95). Les neutrophiles activés produisent différentes enzymes protéolytiques comme l'élastase de neutrophile, la cathepsine G, la MMP-9, qui sont aussi capables de cliver des facteurs impliqués dans la rétention des HSC dans les niches endostéales, comme le SDF-1, le CXCR4, c-Kit et le SCF (87,99–102).

1.5 La calcitonine

La calcitonine est un peptide de 32 acides aminés, avec un pont disulfide intramoléculaire et une extrémité carboxy amidée, qui appartient à une famille

d'hormones avec une grande similitude structurelle (103). La calcitonine est principalement produite par les cellules parafolliculaires des glandes thyroïdiennes en réponse à une augmentation de la calcémie (104,105). La séquence peptidique de la calcitonine est très conservée parmi de nombreuses espèces, incluant l'Homme, la souris et le saumon (103). La calcitonine est principalement connue pour son action hypocalcémisante : elle inhibe l'activité de résorption osseuse des ostéoclastes ainsi que leur formation (37–39). De plus, la calcitonine augmente l'excrétion du calcium par les reins (106).

L'amyline, la *calcitonin gene-related peptide* (CGRP), l'adrénomédulline et l'adrénomédulline 2 partagent des similarités structurelles avec la calcitonine, permettant de les regrouper au sein d'une même famille (107–110). Le récepteur de la calcitonine (CTR) est une protéine à 7 domaines transmembranaires couplée à une protéine G (111). L'hétérodimérisation du CTR avec l'une des trois protéines modulatrices *Receptor Activity Modifying Protein* (RAMP1, 2 ou 3) génère le récepteur à l'amyline (112).

Le *Calcitonine receptor - Like Receptor* (CLR) est une autre protéine à 7 domaines transmembranaires couplée à une protéine G, présentant une homologie avec le CTR. L'association du CLR avec le RAMP1 forme le récepteur à CGRP (113), alors que l'hétérodimérisation du CLR avec RAMP2 ou RAMP3 génère le récepteur aux adrénomédullines. Il existe un certain degré de réactions croisées entre les différents récepteurs et les ligands au sein de la famille de la calcitonine. L'amyline semble également avoir la capacité de se fixer sur le CTR (114,115). Les ostéoclastes et leur précurseurs tardifs expriment fortement le CTR (116), tandis que les macrophages expriment les récepteurs pour le CGRP, l'amyline, l'adrénomédulline et l'adrénomédulline 2 (114). Les ostéoblastes expriment le récepteur pour le CGRP et l'adrénomédulline (117).

Jusqu'en 2013, la calcitonine de saumon était utilisée comme l'un des traitements de l'ostéoporose. Cette maladie, d'origine complexe, est caractérisée par une diminution de la masse osseuse favorisant le risque de fracture et la calcitonine est utilisée comme inhibiteur de l'activité de résorption osseuse des ostéoclastes permettant ainsi un accroissement de la masse osseuse (118,119).

1.6 L'érythropoïèse homéostatique

L'érythropoïèse est le processus par lequel les HSC prolifèrent progressivement, se différencient et génèrent plusieurs milliards d'érythrocytes chaque jour, et cela afin de compenser les cellules sénescents. Les érythrocytes ont pour fonction de transporter l'oxygène des poumons vers les tissus périphériques. En cas d'anémie sévère cette production peut augmenter de 20 fois afin d'assurer une oxygénation correcte des tissus périphériques (45,120,121).

Des études ont démontré que l'érythropoïèse se déroule dans différents organes dépendamment du stade de développement de l'organisme. L'érythropoïèse prend naissance au stade embryonnaire dans le sac vitellin (122). Au stade fœtal, le foie devient le principal organe producteur de globule rouges (9). Durant la période postnatale, l'érythropoïèse s'effectue majoritairement dans la MO, mais peut aussi avoir lieu dans la rate. Chez la souris, la rate est responsable de 10% de la production homéostatique d'érythrocytes (123).

L'érythropoïèse est principalement régulée par une hormone, l'érythropoïétine (EPO). L'érythropoïèse se divise en trois stades développementaux, et débute lorsqu'une HSC pluripotente se différencie en progéniteur multipotent appelé *Colony*

Forming Unit Granulocyte Erythrocyte Megacaryocyte Macrophage (CFU-GEMM). L'engagement dans la voie érythrocytaire du CFU-GEMM génère un *Burst Forming Unit Erythroid* (BFU-E), qui se différencie ensuite en *Colony Forming Unit Erythroid* (CFU-E). Les BFU-E et les CFU-E sont des précurseurs érythropoïétiques précoces qui ne sont pas morphologiquement identifiables. Ils sont caractérisés par leur capacité de prolifération sur milieu semi-solide contenant de l'EPO. Les BFU-E sont des cellules hautement prolifératives et génèrent de grosses colonies sur milieu semi-solide, alors que les CFU-E donnent de petites colonies. De plus, les CFU-E répondent fortement à l'EPO contrairement aux BFU-E (124–126).

Lors du second stade développemental, les CFU-E continuent leur différenciation pour donner des précurseurs tardifs morphologiquement identifiables. Le premier précurseur tardif est le proérythroblaste (ProE), une cellule de 20 μm présentant un cytoplasme basophile et un noyau ovoïde, avec au moins un nucléole et une chromatine fine. Le ProE se différencie ensuite en érythroblaste basophile (EryA), qui est légèrement plus petit et dont le cytoplasme est encore plus basophile. Le noyau de la cellule EryA ne contient pas de nucléole et sa chromatine présente un début de condensation. Le stade suivant de maturation est l'érythroblaste polychromatophile (EryB) qui possède une chromatine condensée et un cytoplasme entre basophile et acidophile. Ce dernier se différencie en érythroblaste orthochromatique (EryC) dont le cytoplasme est nettement acidophile et le noyau fortement condensé. Lors du dernier stade de maturation, le réticulocyte démantèle sa machinerie traductionnelle, expulse des organites et prend une forme de disque biconcave pour devenir un érythrocyte mature (127).

Au fur et à mesure des divisions cellulaires, les précurseurs érythroïétiques tardifs réduisent progressivement leur taille, accumulent de l'hémoglobine qui participe au changement de colorant du cytoplasme de basophile à acidophile, et subissent une condensation de la chromatine et une énucléation (120,121). Les modifications morphologiques et les étapes de différenciation érythrocytaire sont schématisées dans les figures 1.7 et 1.8.

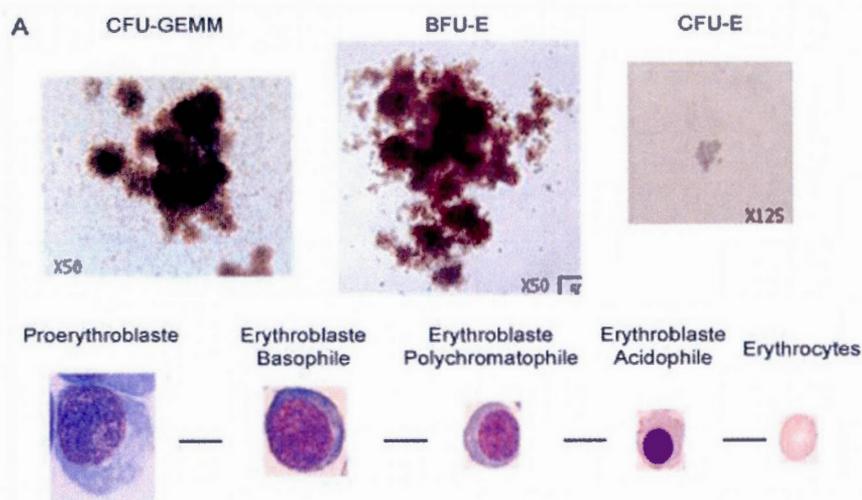


Figure 1.7 Morphologie des différentes cellules érythroïétiques. (A) Des colonies différentes (CFU-GEMM, BFU-E et CFU-E) sont formées à partir des progéniteurs érythroïétiques après 14 jours de culture en milieu semi-solide. Les stades morphologiquement identifiables sont colorés en May-Grünwald Giemsa. Figure tirée de Chambellan *et al.* (128).

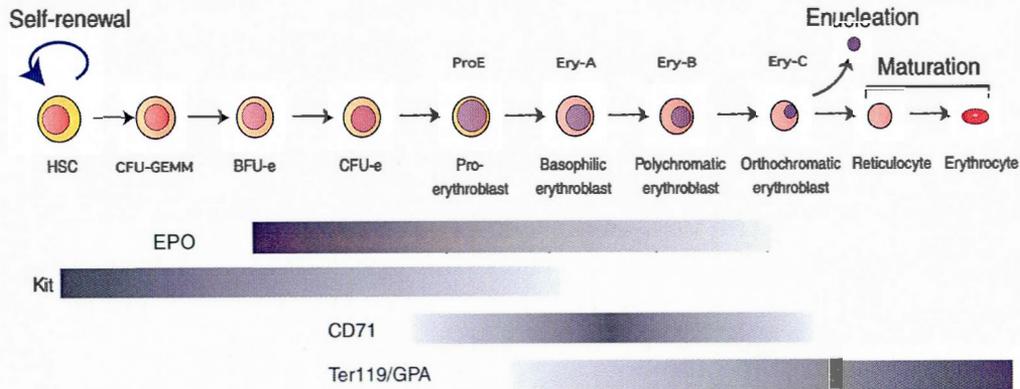


Figure 1.8 La lignée érythrocytaire. Les différents stades de la différenciation de la lignée érythrocytaire sont représentés en fonction de leur réponse à l'EPO, de l'expression de c-Kit, du CD71 et du Ter119. Figure tirée de Dzierzak *et al.* (129).

Comme présentés dans la figure 1.8, plusieurs marqueurs de surface sont exprimés lors de la différenciation érythrocytaire, notamment le récepteur de la transferrine (CD71) et la Glycophorine A (GPA). CD71 est impliqué dans la captation du complexe fer-transferrine par les précurseurs érythropoïétiques (130). La GPA est une protéine de surface sialylée spécifique des stades tardifs de la lignée érythropoïétique. L'utilisation de l'anticorps Ter119 permet de marquer spécifiquement les populations érythrocytaires car il reconnaît une molécule associée à la GPA (53). En se basant sur la cinétique d'expression de ces deux marqueurs, Liu *et al.* ont développé une technique cytofluorométrique permettant de trier les différentes populations d'érythroblastes au sein des tissus hématopoïétiques. Donc, en combinant l'évaluation de la taille relative avec un double marquage anti-CD71 et Ter119, il est possible d'identifier et/ou isoler les ProE, les EryA, les EryB et les EryC (figure 1.9) (131).

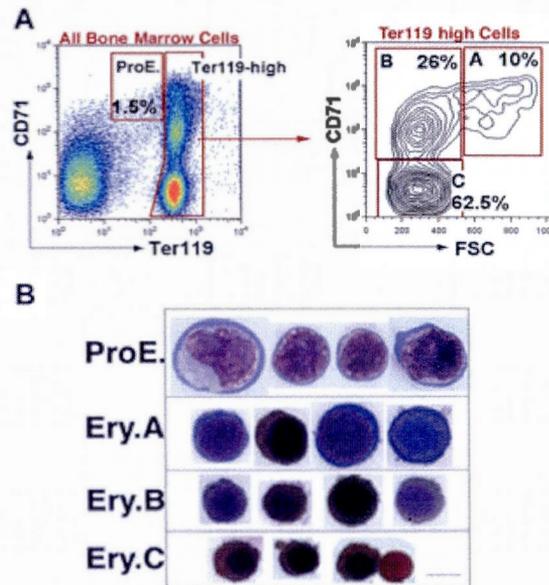


Figure 1.9 Identification par cytofluorométrie des différents stades de développement des érythroblastes. (A) Profil de cytométrie de la MO marquée avec des anticorps anti-CD71 et Ter119. Les cellules Ter119-high se séparent en fonction de leur taille relative (forward scatter, FSC) et de CD71, permettant ainsi la discrimination des populations EryA, EryB et EryC. Les EryA, les EryB et les EryC sont respectivement caractérisées par un profil $\text{Ter119}^{\text{high}}/\text{CD71}^{\text{high}}/\text{FSC}^{\text{high}}$, $\text{Ter119}^{\text{high}}/\text{CD71}^{\text{high}}/\text{FSC}^{\text{low}}$ et $\text{Ter119}^{\text{high}}/\text{CD71}^{\text{low}}/\text{FSC}^{\text{low}}$. (B) Préparations de cytocentrifugation des sous-populations de ProE, EryA, EryB et Ery C colorées avec du diaminobenzidine et contre-colorées avec du Giemsa. La barre représente 5 μm . Figure tirée de Liu *et al.* (131).

1.7 L'érythropoïétine

L'érythropoïétine (EPO) est une glycoprotéine de 34 kDa produite majoritairement par les fibroblastes interstitiels péritubulaires du cortex rénal (132,133). La production de l'EPO est contrôlée par le niveau d'oxygénation tissulaire. En cas d'hypoxie, la production d'EPO est augmentée, ce qui augmente la production d'érythrocytes afin d'améliorer l'oxygénation (134,135).

L'EPO est indispensable pour la survie, la prolifération et la différenciation des précurseurs érythroïdes (136,137). Les précurseurs érythroïdes expriment le récepteur à l'EPO (EPOR) et cette expression est maximale chez les CFU-E et les ProE, pour ensuite décroître au cours de la différenciation (129). La fixation de l'EPO sur son récepteur active la voie JAK2/STAT5, impliquée dans l'expression de la protéine anti-apoptotique bcl-xL (138,139). L'EPO active également la voie PI3K/AKT qui à son tour active le facteur de transcription GATA-1 (140–144). GATA-1 est impliqué dans l'expression de bcl-xL (144) ainsi que dans la différenciation érythrocytaire (145,146). L'activation de la voie PI3K/AKT induit aussi la phosphorylation et la rétention cytoplasmique du facteur de transcription FoxO3. La famille des facteurs de transcription Forkhead de classe O compte quatre membres FoxO1, FoxO3, FoxO4 et FoxO6 impliqués dans de nombreuses fonctions comme le développement des cellules souches, l'apoptose, l'activation du système immunitaire, le contrôle de la fertilité et la modulation du métabolisme (147–149).

En absence de phosphorylation, FoxO3 est transféré dans le noyau et induit l'expression de la protéine antiproliférative BTG1 et des protéines pro-apoptotiques BIM et TRAIL. Donc l'inhibition de FoxO3 par l'EPO semble cruciale pour la prolifération des érythroblastes (150–152). Cependant, l'activation de FoxO3 semble nécessaire pour la régulation de la maturation, du cycle cellulaire et de la durée de vie des cellules érythroïdes. En effet, l'absence de FoxO3 induit un blocage du cycle

cellulaire chez les érythroblastes tardifs. De plus, FoxO3 est impliqué dans la défense contre le stress oxydant, car il induit l'expression d'enzymes anti-oxydantes telles que la catalase, la superoxyde dismutase 2 (SOD2) et la glutathion peroxydase. Des érythroblastes déficients en FoxO3 présentent un niveau élevé d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui se traduit par une diminution de l'espérance de vie des érythrocytes. Le traitement des érythroblastes déficients en FoxO3 avec un antioxydant comme le N-acétyl-cystéine améliore la maturation et la durée de vie des érythrocytes. Cette information nous indique que la résistance au stress oxydatif est primordiale pour la maturation érythrocytaire (143). De plus, les souris qui surexpriment l'EPO produisent plus d'érythrocytes, mais ils entrent en sénescence précocement (153). Cela suggère que la surexpression de l'EPO pourrait retarder l'action de FoxO3, et les érythrocytes produits seraient moins bien équipés en système antioxydant ce qui réduirait leur espérance de vie. Cette hypothèse est soutenue par des recherches récentes qui montrent une espérance de vie significativement réduite chez les érythrocytes des souris déficientes pour l'AMPK1, une kinase impliquée dans l'homéostasie énergétique. Ces érythrocytes présentent un stress oxydatif accru consécutif à une diminution de l'expression de FoxO3 et d'enzymes anti-oxydantes chez les érythroblastes (154).

Au cours de la différenciation érythrocytaire il y a l'activation successive des facteurs de transcription GATA-1 et FoxO3, impliqués dans la maturation des érythroblastes à des stades différents. Chez les érythroblastes précoces (CFU-E à EryA), l'EPO active GATA-1 et inhibe FoxO3, permettant la prolifération et la différenciation. Néanmoins, chez les stades tardifs EryB et EryC, FoxO3 n'est plus inhibé par l'EPO puisque l'EPOR n'est plus exprimé. FoxO3 induit ainsi l'expression d'enzymes anti-oxydantes qui renforcent la résistance aux ROS et la survie des érythroblastes. En effet, les érythroblastes synthétisent et accumulent une importante quantité d'hémoglobine au cours de leur maturation. Cependant, le fer contenu dans l'hémoglobine génère des ROS par la réaction de Fenton (155). L'expression de ces

enzymes anti-oxydantes est donc cruciale pour la survie des érythroblastes tardifs.

1.8 L'érythropoïèse de stress

En condition physiologique, l'érythropoïèse a lieu à un taux constant principalement dans la MO (123). L'hypoxie tissulaire causée par une anémie déclenche une érythropoïèse de stress, laquelle permet la production rapide d'un grand nombre d'érythrocytes afin d'accroître l'oxygénation tissulaire (45,120,121,156). Ce phénomène est dû à une augmentation de la production d'EPO par les reins en réponse à l'hypoxie tissulaire induite par l'anémie (135). L'augmentation de la concentration plasmatique d'EPO stimule alors la prolifération et la différenciation des progéniteurs érythroïdes de la MO (157,158). Selon ce point de vue, l'EPO apparaît comme le déclencheur de l'érythropoïèse de stress, et les progéniteurs érythroïdes de la MO impliqués dans l'érythropoïèse de stress semblent être les mêmes que ceux régulant l'érythropoïèse physiologique (131,159).

Cependant, l'érythropoïèse de stress semble plus complexe. En effet, en condition d'anémie aiguë, une importante mobilisation de HSPC de la MO vers la rate a lieu, et la rate devient alors le principal site érythropoïétique (10,11). Des différences ont été constatées entre les précurseurs érythroïdes provenant de la MO et ceux déjà présents dans la rate. En condition d'anémie, les BFU-E de stress présents dans la rate génèrent en milieu semi-solide de plus grosses colonies et plus rapidement que les BFU-E de la MO. De plus, les BFU-E de la MO nécessitent de l'interleukine-3 (IL-3), de l'IL-6 et de l'EPO pour proliférer, alors que les BFU-E de stress ne nécessitent que de l'EPO (10). Aussi, contrairement aux progéniteurs de la MO, les progéniteurs érythroïdes de stress de la rate répondent au facteur de croissance *Bone Morphogenic Protein 4* (BMP4), impliqué dans la prolifération, la

différenciation et la survie de nombreux types cellulaires (160). Des conditions de stress hypoxiques augmentent la production de BMP4, qui stimule ensuite la prolifération des progéniteurs érythroïdes spléniques. Dernièrement, il a été démontré que l'activation de la signalisation Hedgehog était nécessaire pour le développement de ces progéniteurs érythroïdes de stress (11). Cette voie de signalisation est induite par une famille de facteurs solubles : Sonic Hedgehog, Indian Hedgehog et Desert Hedgehog, lesquels sont impliqués dans le développement embryonnaire et la régulation de nombreux types de cellules tels que la lignée érythroïde (161–163). De plus, d'autres facteurs comme le SCF, l'EPO et l'hypoxie participent également au développement de la réponse érythropoïétique de stress (10,164,165).

Il a été dernièrement reporté que les progéniteurs érythroïdes spléniques de stress expriment CD71, du Ter119 et de c-Kit, alors que les progéniteurs érythroïdes homéostatiques de la MO n'expriment que le CD71 et le Ter119 (164). De plus, des expériences de transplantation de MO ont montré que des cellules de la MO ayant migré dans la rate adoptent un phénotype de « stress », ce qui suggère que le microenvironnement splénique stimule l'induction de ces progéniteurs spécialisés (11), et ces progéniteurs semblent avoir la capacité d'auto-renouvellement au sein de la rate (166).

Dans l'ensemble, ces informations amènent à concevoir un nouveau modèle de l'érythropoïèse de stress soutenue par une population de progéniteurs érythroïdes spécialisés résidant dans la rate, avec des propriétés conférées par le microenvironnement splénique. L'hypoxie induite par l'anémie stimule la production d'EPO et de BMP4, qui agissent en synergie avec le SCF afin de promouvoir une expansion rapide des progéniteurs érythroïdes de stress présents dans la rate. Durant la période de recouvrement de l'anémie, les HSPC de la MO migrent dans la rate, et sous l'action du signal Hedgehog, adoptent un profil de progéniteurs érythroïdes de stress afin de reconstituer le pool splénique de ces progéniteurs (figure 1.10).

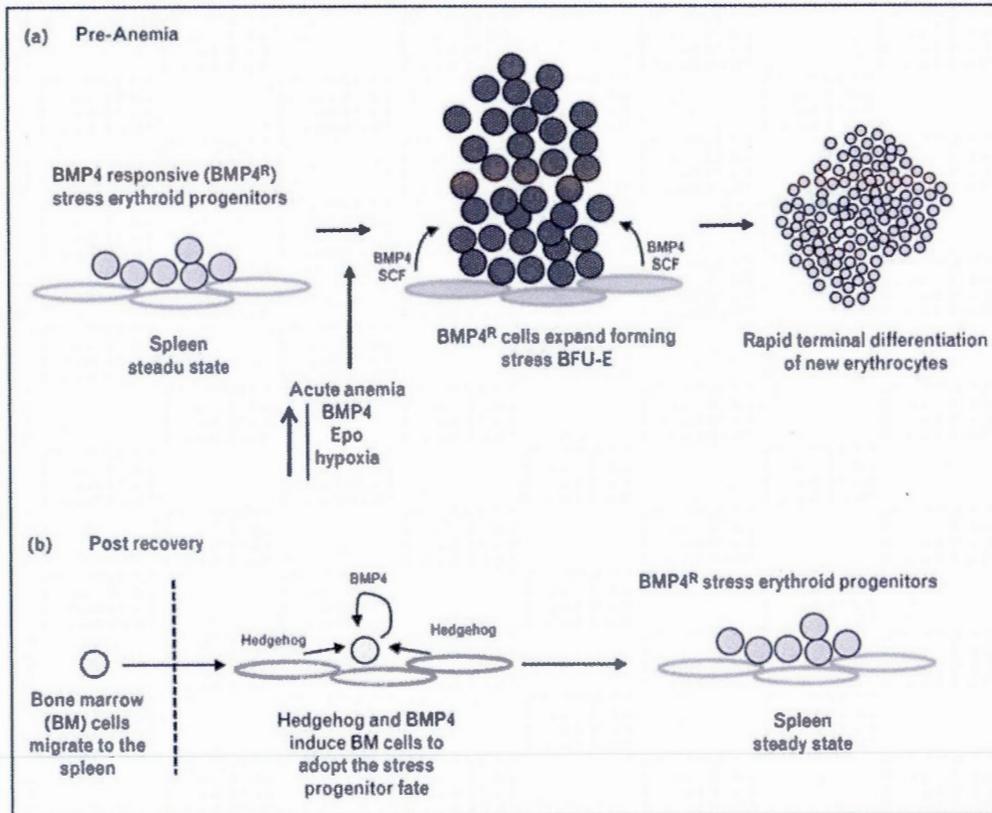


Figure 1.10 Modèle de l'érythropoïèse de stress. L'anémie aigue stimule la production d'EPO et de BMP4 qui agissent en synergie avec le SCF afin d'induire une expansion rapide des progéniteurs érythroïdes de stress dans la rate. Lors de la période de recouvrement de l'anémie, le pool de progéniteurs érythroïdes de stress splénique est reconstitué par la migration des HSPC de la MO vers la rate, lesquels sous l'action du signal Hedgehog adoptent un profil de progéniteurs érythroïdes de stress. Figure tirée de Paulson *et al.* (167).

1.9 La malaria

La malaria ou paludisme est une maladie parasitaire affectant chaque année 200 millions d'individus, dont 2,5 millions en meurent, la classant ainsi parmi les maladies infectieuses les plus mortelles. La malaria est causée par un protozoaire du genre *Plasmodium*, lequel est transmis à l'hôte par la pique d'un moustique vecteur *Anophèle*. Il existe une spécificité d'hôte parmi les différentes espèces de *Plasmodium*, dont quatre espèces infectant l'Homme : *P. malaria*, *P. ovale*, *P. vivax* et *P. falciparum*. La majorité des décès est due à *P. falciparum*, et *P. malaria*. *P. ovale* cause peu de symptômes, alors que *P. vivax* provoque des accès fébriles aigus, mais ces parasites sont plus rarement mortels (168).

La symptomatologie de l'infection par *Plasmodium* est caractérisée par de la fièvre, des céphalées, une anémie sévère, une acidose métabolique, un œdème pulmonaire, une insuffisance rénale et la malaria cérébrale. Ces symptômes résultent d'une réponse inflammatoire excessive, de l'hypoxie induite par la destruction des érythrocytes et une inhibition de l'activité de la MO, d'une hypoglycémie, d'une acidose lactique et de l'adhésion des érythrocytes parasités à l'épithélium vasculaire (169,170).

Comme présenté dans la figure 1.11, l'infection par *Plasmodium* débute par l'inoculation de sporozoïtes dans le système sanguin de l'hôte par la pique d'un moustique *Anophèle* femelle infecté. Une fois en circulation, les sporozoïtes pénètrent le foie et infectent les hépatocytes. Au sein des hépatocytes, les parasites entrent en cycle de réplication asexuée formant des schizontes exo-érythrocytaires, et ce cycle asymptomatique est appelé phase pré-érythrocytaire. Quelques jours plus tard, l'éclatement des schizontes mûres libère des centaines de mérozoïtes dans la circulation sanguine, lesquels vont alors infecter les érythrocytes. À l'intérieur des érythrocytes, les mérozoïtes se différencient en trophozoïdes, puis en schizontes, et à

ce stade, les parasites sont observables en microscopie optique sur des frottis sanguins, permettant la détermination du niveau de parasitose (parasitémie). Lorsque les mérozoïtes atteignent leur maturation à l'intérieur du schizonte, l'érythrocyte parasité éclate libérant ainsi une vingtaine de mérozoïtes, lesquels infectent d'autres érythrocytes. Cette phase de réplication érythrocytaire est responsable des symptômes cliniques de l'infection. En réponse à des facteurs encore inconnus, les mérozoïtes peuvent se différencier en gamétocytes mâles et femelles, lesquels peuvent être absorbés par un *Anophèle* se nourrissant. Une fois dans l'intestin du moustique, les gamétocytes fusionnent pour former un zygocyte qui s'intègre dans la membrane intestinale et devient un oocyte. Après plusieurs cycles de réplication asexuée, l'oocyte libère des sporozoïtes qui migrent vers les glandes salivaires du moustique. Durant un repas sanguin, l'*Anophèle* infecté inocule les sporozoïtes dans un hôte recréant un nouveau cycle parasitaire (171–176).

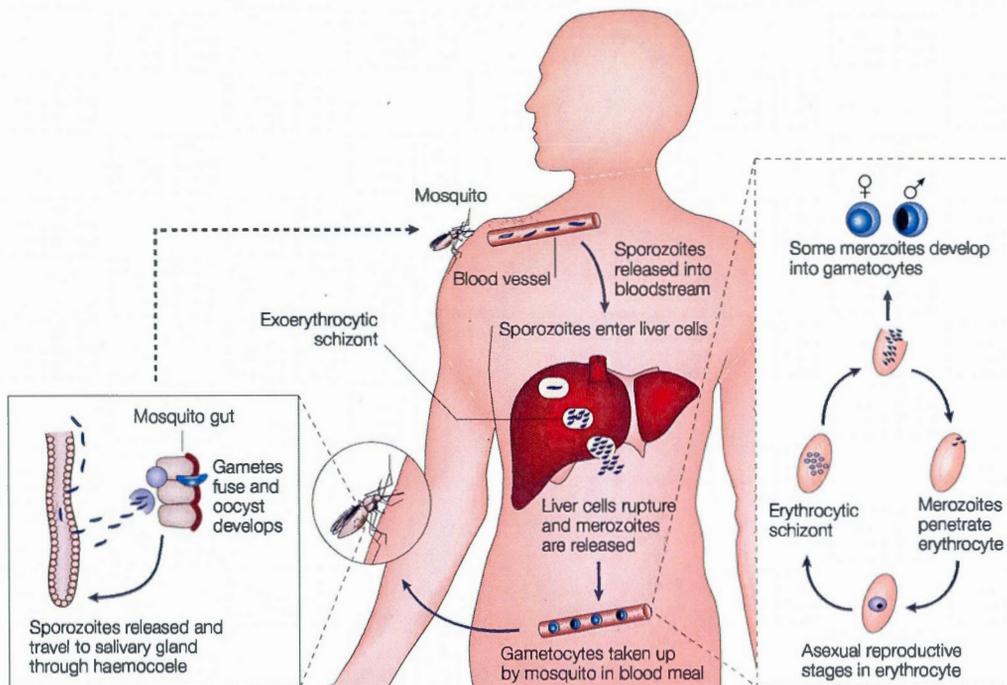


Figure 1.11 Le cycle de vie de *Plasmodium*. Les sporozoïtes transmis par le vecteur anophèle infectent les hépatocytes de l'hôte et génèrent des schizontes exoérythrocytaires, qui mûrissent et libèrent des centaines de mérozoïtes dans la circulation. Ces formes infectent des érythrocytes et y génèrent des schizontes érythrocytaires, puis de nouveaux mérozoïtes qui continuent la propagation intraérythrocytaire. Certains mérozoïtes se différencient en gamétocytes, qui sont absorbés par un Anophèle se nourrissant du sang infecté. Dans l'intestin du moustique, les gamétocytes forment un zygote, lequel s'intègre dans la membrane intestinale et devient un oocyte. L'oocyte mature libère des sporozoïtes qui migrent dans les glandes salivaires du moustique. Figure tirée de Stevenson *et al.* (175).

L'utilisation d'espèces de *Plasmodium* infectant les souris et isolées des rongeurs sauvages de l'Afrique a permis de faire des avancées majeures dans l'étude de la pathogénèse et de la réaction immunitaire lors de la malaria. Les espèces murines couramment étudiées en laboratoire sont *P. chabaudi*, *P. berghei*, *P. yoelii* et

P. vinckei (177–179). Ces parasites diffèrent entre autre par leur virulence et par la réponse immunitaire qu'ils induisent. Les sous-espèces et les souches de *P. chabaudi* (*P. chabaudi chabaudi* AS and *P. chabaudi adami*) non létales sont principalement utilisées pour l'étude de la réaction immunitaire, de l'immunosuppression et de l'anémie (1,180). L'étude de la malaria cérébrale chez la souris se fait principalement avec le parasite *P. berghei* ANKA (181). Les souches de *P. yoelii* (*P. yoelii* 17XL, *P. yoelii* 17XNL et *P. yoelii* YM) sont utilisées pour l'étude de la réponse immunitaire et de la pathogénèse, mais les études de chimiothérapie sont couramment menées sur *P. vinckei* (182). Dépendamment de l'haplotype de la souris hôte, l'infection par *P. berghei*, *P. yoelii* 17 XL, *P. v. vinckei* ou *P. c. adami* souche DS peut être létale.

Dans le cadre de ce projet, nous avons étudié l'anémie induite par l'infection à *P. c. adami* souche DK. Ce modèle d'infection non létal cause une forte anémie, et est très bien caractérisé dans notre laboratoire (183). De façon générale, les souches de *Plasmodium* non létales sont utilisées pour étudier le système immunitaire et les souches létales sont plus adaptées à l'analyse de l'efficacité des chimiothérapies anti-malariques.

1.10 La réponse immunitaire lors de la malaria

Le contrôle de la réplication de *Plasmodium* au stade érythrocytaire est primordial pour assurer la survie de l'hôte. La réponse immunitaire innée contrôle la parasitémie avant qu'une réponse adaptative soit mise en place, permettant l'élimination complète des parasites (184–186). La réponse immunitaire contre la malaria débute par la reconnaissance de motifs parasitaires par les Pattern-Recognition Receptors (PPR) comme les Toll Like Receptors (TLR) (187) et le CD38 (188) exprimés à la surface ces cellules dendritiques (DC), des macrophages et des

cellules B, lesquels sont regroupés dans la famille des cellules présentatrices de l'antigène (CPA). Par la suite, ces CPA s'activent, phagocytent les érythrocytes parasités et présentent les antigènes du parasite associés aux molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe II. Les CPA activées vont alors exprimer plus de molécules du CMH de classe II, de CD80 et de CD86 qui sont des molécules impliquées dans l'activation des cellules T auxiliaires (189). Par la suite, les CPA vont activer les cellules T auxiliaires CD4 (190,191) (figure 1.12).

Les cellules T auxiliaires CD4 se divisent en deux sous-populations antagonistes, les cellules T auxiliaires de type 1 (Th1) et les cellules T auxiliaires de type 2 (Th2), lesquels se distinguent par les cytokines qu'elles produisent et par la réponse adaptative qu'elles régulent. Les cellules Th1 produisent principalement de l'interleukine 2 (IL-2) et de l'interféron- γ (IFN- γ). Les cellules Th1 activent les cellules effectrices comme les macrophages et les cellules NK et induisent la production de certains sous-types d'IgG par les cellules B. Les cellules Th2 produisent principalement de l'interleukine 4 (IL-4), de l'interleukine 5 (IL-5), de l'interleukine 6 (IL-6) et l'interleukine 10 (IL-10). Les cellules Th2 régulent la réponse aux allergènes et les réactions d'hypersensibilité immédiate. L'IL-4 et l'IL-10 produites par les Th2 inhibent la réponse Th1 et l'IFN- γ sécrété par les Th1 inhibe la réponse Th2 (192).

Les CPA activées par les parasites produisent de l'interleukine 12 (IL-12) qui oriente la polarisation des cellules T auxiliaires vers une réponse de type Th1 (193). L'IL-12 va également stimuler la sécrétion d'IFN- γ par les NK (194,195). Les cellules Th1 vont alors sécréter de l'IFN- γ qui accentue la polarisation des cellules T auxiliaires en Th1 et stimule l'activité phagocytaire des macrophages (196). Les cellules Th1 produisent également de l'IL-2, laquelle stimule la sécrétion d'IFN- γ par les NK (197,198). Les Th1 vont également stimuler la sécrétion par les cellules B d'IgG2a et IgG2b dirigés contre le parasite (199,200). Cette réponse adaptative est

régulée à la baisse par l'interleukine 10 (IL-10) (201) et le *Transforming Growth factor* β (TGF- β) (202) (figure 1.12).

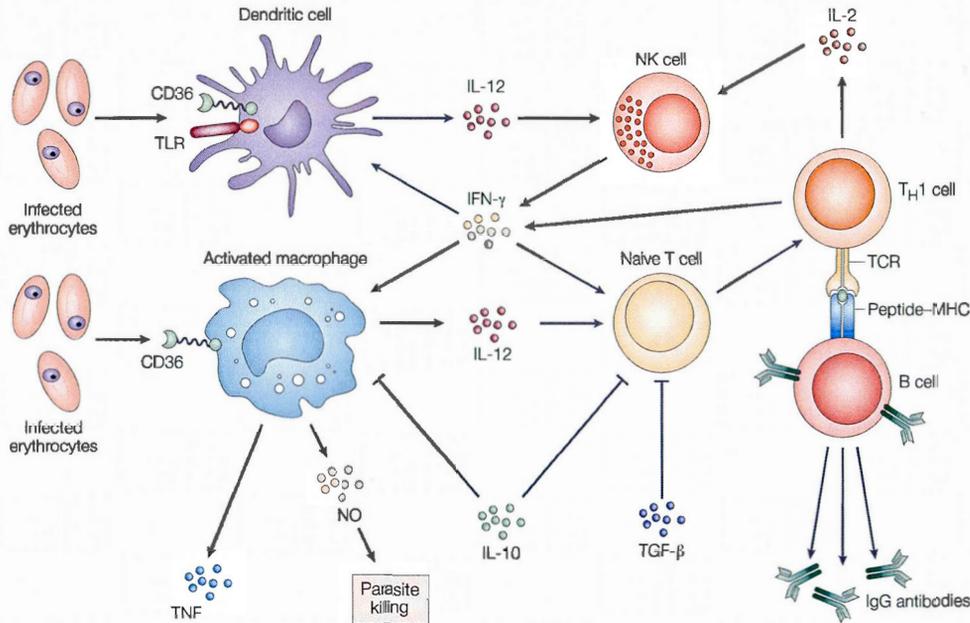


Figure 1.12 Immunité anti-*Plasmodium*. Suite à la reconnaissance de motifs moléculaires parasitaires par des récepteurs (PPR), ou sous l'action de cytokines pro-inflammatoires, les cellules dendritiques et les macrophages s'activent et produisent de l'interleukine-12. Cette cytokine stimule la sécrétion d'IFN- γ par les cellules natural killer (NK) et la différenciation des cellules T helper 1. Ces dernières stimulent la production d'anticorps dirigés contre le parasite par les cellules B et produisent de l'IL-2, qui augmente la production d'IFN- γ . L'IFN- γ stimule la maturation des DC et l'activation des macrophages. Des cytokines comme l'IL-10 et le TGF- β régulent négativement cette réponse. Figure tirée de Stevenson *et al.* (175).

Comme présenté précédemment, les macrophages en tant qu'APC jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire lors de la malaria, et sont impliqués dans la réponse immunitaire innée. Lorsque les mérozoïtes pénètrent dans les érythrocytes, ils laissent à la surface des cellules certaines protéines parasitaires (203,204),

lesquelles peuvent être reconnues par des récepteurs exprimés par les macrophages. Ces protéines parasitaires vont alors activer le système du complément ce qui induit une accumulation du facteur C3b à la surface des érythrocytes infectés. Ce dernier est reconnu par les macrophages via leur récepteur au complément CR1 et induit l'opsonisation (phagocytose facilitée) des érythrocytes parasités (205,206). Le développement d'anticorps opsonisants (isotype IgG2a et IgG2b) reconnaissant les antigènes parasitaires à la surface des érythrocytes infectés permet d'accroître leur phagocytose par les macrophages. En effet, grâce à leur Fc γ R, les phagocytes reconnaissent le fragment constant des anticorps fixés à la surface des érythrocytes parasités et des mérozoïtes, et les phagocytent (199,207,208). Enfin, les macrophages sont capables de reconnaître certains motifs parasitaires via leurs PRR, ce qui provoque leur activation et la production de cytokines pro-inflammatoires. Les macrophages expriment le récepteur éboueur CD36, lequel est impliqué dans la reconnaissance et la phagocytose des érythrocytes parasités (209). Les glycoposphatidylinositoles (GPI) du *Plasmodium* sont reconnus par le CD36 et le TLR-2 exprimés à la surface des macrophages (210–212). De plus, les microparticules provenant des érythrocytes parasités activent le TLR-4 exprimé à la surface des macrophages (213). L'hémozoïne, un produit de dégradation de l'hémoglobine synthétisé par le parasite, peut être internalisé par les macrophages et activer le TLR-9 et le Nalp3, et cet effet est relié à la fixation des fragments d'ADN par l'hémozoïne, qui est le ligand du TLR-9 et du Nalp3. L'activation du TLR-9 conduit à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α (214) tandis que l'activation du Nalp-3 provoque la formation de l'inflammasome et la production de l'IL-1 β par les macrophages (215) (figure 1.13).

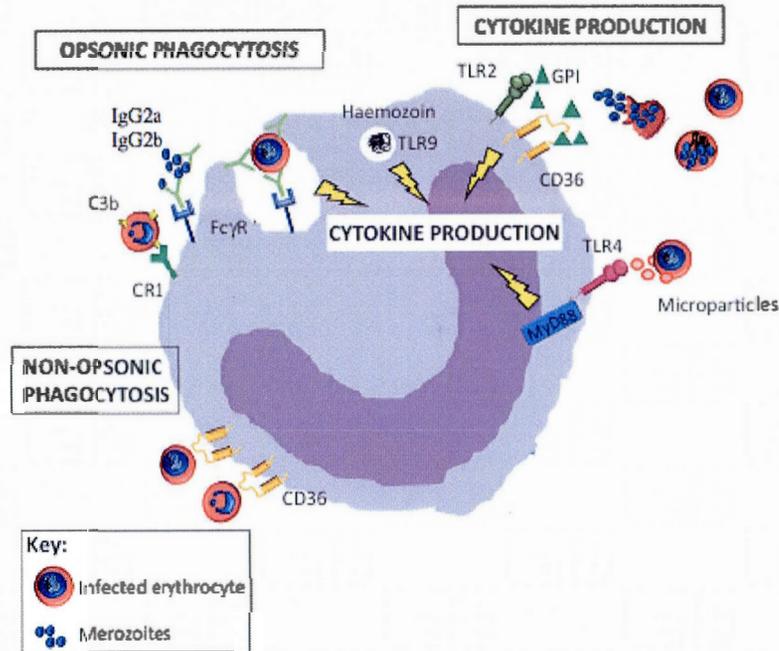


Figure 1.13 Implication des macrophages dans le contrôle de l'infection par le *Plasmodium*. Les macrophages reconnaissent le C3b et les anticorps opsonisants à la surface des érythrocytes infectés et à la surface des parasites. Certains motifs parasitaires peuvent être reconnus par les PRR (CD36, TLR-2, -4 et -9), provoquant ainsi l'activation et la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages. Figure tirée de Chua *et al.* (216).

CHAPITRE 2 : HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

L'infection par *P.c. adami* DK induit une inflammation systémique et une anémie hémolytique aigue (1). Le développement d'une érythropoïèse de stress est nécessaire pour la résolution de l'anémie (156). Lors d'une anémie hémolytique aigue, une importante mobilisation de HSC de la MO vers la rate a lieu, et cet organe devient alors le principal site de l'érythropoïèse de stress (10,11). Dernièrement, il a été démontré que l'anémie causée par la phlébotomie et l'inflammation induite par l'injection de LPS provoquaient une mobilisation des HSC de la MO vers la périphérie dépendante de l'activité de résorption osseuse des ostéoclastes (12). En se basant sur l'état des connaissances actuelles, nous avons postulé l'hypothèse que la mobilisation des HSC dépendante des ostéoclastes est aussi nécessaire pour le développement de l'érythropoïèse de stress et la résolution de l'anémie induite par *P. c. adami* DK.

Afin d'évaluer cette hypothèse, nous avons suivi la réponse érythropoïétique et la splénomégalie lors de la malaria chez des souris traitées avec la calcitonine, une hormone connue pour inhiber l'activité des ostéoclastes (38). Pour distinguer les effets de l'inhibition des ostéoclastes par la calcitonine sur la résolution de l'anémie de ceux induits par l'inflammation lors de l'infection, des souris phlébotomisées présentant une anémie non hémolytique sans inflammation ont été utilisées comme modèle comparatif. Les objectifs que nous nous sommes fixés étaient de :

1. Vérifier que l'activité des ostéoclastes est nécessaire pour provoquer la mobilisation des HSC lors de la malaria et de la phlébotomie. Pour cela, le nombre de HSC dans la MO et dans la rate a été analysé par cytofluorométrie au jour 8 post-infection ou au jour 5 post-phlébotomie chez des souris traitées

ou non à la calcitonine. Selon notre hypothèse, nous nous attendions à ce que les souris traitées à la calcitonine présentent moins de cellules totales et de HSC dans la rate en réponse à la phlébotomie et à l'infection. Une rétention des cellules hématopoïétiques dans la MO était également attendue.

2. Évaluer l'impact de l'inhibition de la mobilisation des HSC par la calcitonine sur le développement de l'érythropoïèse de stress et la résolution de l'anémie lors de la malaria et de la phlébotomie. Pour cela, le nombre de progéniteurs érythroïdes dans la MO et dans la rate a été analysé par cytofluorométrie au jour 8 post-infection ou au jour 5 post-phlébotomie chez des souris traitées ou non à la calcitonine. Quotidiennement, l'hémoglobine et les réticulocytes ont été mesurés respectivement par dosage et par cytofluorométrie. Selon notre hypothèse, le traitement à la calcitonine devrait inhiber le développement de l'érythropoïèse de stress dans la rate des souris infectées et phlébotomisées. De plus, la calcitonine devrait accentuer l'anémie chez les souris infectées. Enfin, suite à l'infection et à la phlébotomie, un pic plus faible de réticulocytes devrait être observé chez les souris traitées à la calcitonine.

CHAPITRE 3 : MÉTHODOLOGIE

3.1 Modèle animal

Des souris BALB/c femelles âgées de 6 à 8 semaines (Charles River, Canada) ont été utilisées pour l'étude. Afin d'évaluer l'impact de l'inhibition de la mobilisation des HSC par la calcitonine sur la résolution de l'anémie induite par saignement, les souris ont été injectées par voie intra-péritonéale avec 200 µl d'une solution saline contenant 5 µg/ml de calcitonine de saumon (Biotrend, Suisse) pendant 5 jours consécutifs. Au 3^{ème} jour de traitement, 300 µl de sang ont été prélevés de la veine sub-mandibulaire, et le volume de sang perdu a été remplacé par de la solution physiologique saline par injection intra-péritonéale. Pour déterminer l'impact de l'inhibition de la mobilisation des HSC par la calcitonine sur la résolution de l'anémie induite par l'infection à *P. c. adami* DK, les souris ont été injectées par voie intra-péritonéale avec 200 µl de solution physiologique saline à 5 µg/ml de calcitonine de saumon (Biotrend, Suisse) par souris pendant 5 jours consécutifs. Au 3^{ème} jour de traitement, les souris ont été infectées avec 10⁵ globules rouges parasités par *P. c. adami* DK dans 200 µl de solution physiologique saline. Les souris phlébotomisées et les souris infectées par *P. c. adami* DK ont été euthanasiées respectivement au jour du pic de réticulocytose (jour 5 post-phlébotomie) et au jour du pic de parasitémie (jour 8 post-infection) par inhalation de CO₂.

3.2 Détermination de la cinétique d'infection

Le suivi de la parasitémie a été effectué quotidiennement à l'aide de frottis sanguins colorés au réactif de Giemsa (Sigma, USA). Le pourcentage de globules rouges parasités a été déterminé sur un total de 200 globules rouges par microscopie optique au grossissement 1000x.

3.3 Détermination de la réticulocytose

Afin de suivre le taux de réticulocytes sanguins quotidiennement, 1 μ l de sang a été prélevé de l'extrémité de la queue et dilué dans 1 ml de Tampon Phosphate Saline (PBS) contenant 0,2 μ g/ml d'anti-CD71 (clone RI7217) conjugué à l'isothiocyanate fluorescente (FITC) (Biolegend, USA) et 0,2 μ g/ml d'anti-Ly76 (clone Ter119) conjugué à phycoérythrine (PE) (Biolegend, USA). Les cellules ont été incubées à l'obscurité pendant 15 minutes à 4 °C, puis centrifugées à 1200 rpm durant 10 minutes, et le surnageant a été éliminé. Le culot cellulaire a été mis en suspension dans 1 ml de PBS et les cellules ont été analysées au cytofluoromètre de flux BD Accuri C6 (Becton Dickinson, Canada). Les cellules double-positives pour le CD7-FITC et le Ly76-PE sont considérées comme des réticulocytes.

3.4 Dosage de l'hémoglobine sanguine

Des mesures de l'hémoglobine ont été effectuées quotidiennement à partir de 2 μ l de sang prélevés de l'extrémité de la queue et dilués dans 500 μ l de réactif de

Drabkin (Sigma, USA). Après 15 minutes d'incubation, 200 µl de solution ont été déposés dans une plaque de 96 puits (Costar, USA) afin de mesurer l'absorbance à 540 nm avec un lecteur de plaques. Une courbe standard d'hémoglobine de rat (Sigma, USA) a été réalisée selon les instructions du manufacturier du réactif de Drabkin. Chaque échantillon a été mesuré en duplicata.

3.5 Préparation des cellules de la rate

Les rates prélevées des souris ont été déposées dans un pétri de 30 mm (Sarstedt, Canada) contenant 5 ml de milieu RPMI 1640 (Gibco, Canada) supplémenté de 10 % de Sérum Fœtal Bovin (FBS) (Wisent, Canada), 50 unités/ml de pénicilline G (Sigma, USA) et 50 µg/ml de streptomycine (Sigma, USA) (ce milieu sera référé par la suite comme RPMI complet). Chaque rate a été homogénéisée jusqu'à obtenir une suspension cellulaire, laquelle a été resuspendue dans 10 ml de RPMI complet. La suspension cellulaire a été centrifugée pendant 10 minutes à 1200 rpm et le surnageant a été décanté. Le culot cellulaire a été resuspendu dans 1 ml de tampon de lyse de globules rouges (red blood cell lysing buffer) (Sigma, USA) et incubé pendant 3 minutes, puis lavé avec 9 ml de RPMI complet pendant 10 minutes à 1200 rpm. La concentration des splénocytes a été ajustée à 1 million de cellules/ml par un compte cellulaire suite à une coloration au bleu de Trypan (Sigma, USA) pour déterminer le pourcentage de viabilité cellulaire.

3.6 Préparation des cellules de la moelle osseuse

La MO des fémurs et des tibias a été récupérée en centrifugeant à 2000 rpm pendant 5 minutes les os dont les extrémités ont été coupées. Le culot cellulaire a été resuspendu dans 5 ml de milieu RPMI 1640 (Gibco, Canada) supplémenté de 10 % de FBS (Wisent, Canada), 50 unités/ml de pénicilline G (Sigma, USA) et 50 µg/ml de streptomycine (Sigma, USA). La concentration des cellules de la moelle osseuse a été ajustée à 1 million de cellules/ml par un compte cellulaire suite à une coloration au bleu de Trypan (Sigma, USA) pour déterminer le pourcentage de viabilité cellulaire.

3.7 Différenciation des Macrophages *in vitro*

Les cellules de la MO à 1×10^6 cellules/ml (1 ml par puits en plaque 24 puits) ont été cultivées dans du RPMI 1640 (Gibco, Canada) supplémenté de 10 % de FBS (Wisent, Canada), 50 unités/ml de pénicilline G (Sigma, USA) et 50 µg/ml de streptomycine (Sigma, USA), de 12,5 ng/ml de M-CSF (eBioscience, USA) et de 0, 35 ou 70 ng/ml de calcitonine de saumon (Biotrend, Suisse). Après 6 jours de culture à 37 °C sous 5 % de CO₂ et dans une atmosphère saturée en humidité, les cellules ont été récoltées et le nombre de macrophages a été déterminé par cytofluorométrie à l'aide d'un double marquage CD11b-FITC et F4/80-PE.

3.8 Cytofluorométrie de flux

Afin de déterminer le nombre de HSC (cellules Lin-/Sca-1+/c-Kit+) dans la MO et la rate, 1 million de cellules ont été incubées dans 1 ml de PBS contenant 1 µl de cocktail « lineage » conjugué à la biotine (MACS, USA), 0,2 µg/ml d'anti-Sca-1 conjugué au FITC (clone D7) (Biolegend, USA), 0,2 µg/ml d'anti-c-Kit conjugué au PE (clone 2B8) (Biolegend, USA) et 0,2 µg/ml de streptavidine conjuguée au Peridin Chlorophyll Protein (PerCP). La détermination du nombre des différents précurseurs de la lignée érythroïdes a été effectuée en incubant un million de cellules de la MO et la rate avec 0,2 µg/ml d'anti-CD71 (clone RI7217) conjugué au (FITC) (Biolegend, USA) et 0,2 µg/ml d'anti-Ly76 (clone Ter119) conjugué au (PE) (Biolegend, USA). Ce marquage permet de distinguer les proérythroblastes (Ter119^{faible}, CD71^{fort}), les érythroblastes basophiles (Ter119^{fort}, CD71^{fort}, FSC^{fort}), les érythroblastes polychromatophiles (Ter119^{fort}, CD71^{fort}, FSC^{faible}), les érythroblastes acidophiles et les réticulocytes (Ter119^{fort}, CD71^{faible}, FSC^{faible}). Le nombre de macrophages (CD11b+/F4/80+) dans la rate et dans la MO ont été évalués en incubant un million de cellules avec 0,2 µg/ml d'anti-CD11b (clone M1/70) couplé au FITC (Biolegend, USA) et 0,2 µg/ml d'anti-F4/80 (clone BM8) couplé au PE (Biolegend, USA). Les cellules ont été incubées avec les anticorps pendant 15 minutes à 4 °C et à l'obscurité, puis centrifugées à 1200 rpm durant 10 minutes et le surnageant a été éliminé. Le culot cellulaire a été mis en suspension dans 1 ml de PBS, les cellules ont été analysées au cytofluoromètre de flux BD Accuri C6 (Becton Dickinson, Canada).

3.9 Génération de *Colony-Forming Unit-Macrophage*

Une suspension cellulaire de MO a été préparée à $2,5 \times 10^5$ cellules/ml dans du RPMI 1640 (Gibco, Canada) supplémenté de 10 % de FBS (Wisent, Canada), 50 unités/ml de pénicilline G (Sigma, USA) et 50 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine (Sigma, USA). Trois cents microlitres de cette suspension ont été ajoutés à 3 ml de MethoCult® medium M 3234 supplémenté de 12,5 ng/ml de M-CSF (eBioscience, USA) et de 0, 35 ou 70 ng/ml de calcitonine de saumon (Biotrend, Suisse). Le mélange a été homogénéisé et après 10 minutes de repos, 1,1 ml ont été ajoutés dans deux pétris de 35 mm (StemCell Technologies) avec une aiguille de 16g à bout franc fixée sur une seringue de 3 ml. Les cellules ont été incubées 6 jours à 37 °C sous 5 % de CO₂ et dans une atmosphère saturée en humidité puis le nombre CFU-M a été compté.

3.10 Analyses Statistiques

Les résultats ont été analysés avec un T-test non paramétrique pour comparer deux groupes ou avec un test one-way ANOVA suivi d'un test de Turkey pour comparer plus que deux groupes.

CHAPITRE 4 : RÉSULTATS

4.1 L'inhibition de la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques par la calcitonine n'altère pas la résolution de l'anémie induite par la phlébotomie

Afin d'élucider la possible implication des ostéoclastes dans la mobilisation de progénitures de la MO vers la périphérie (notamment la rate) lors de l'infection par *P. c. adami*, nous avons tout d'abord utilisé un modèle d'érythropoïèse de stress exempte de réponse inflammatoire. La phlébotomie est une méthode couramment utilisée pour étudier la réponse érythropoïétique induite par une anémie non hémolytique (217–220), et Kollet *et al.* ont démontré que la phlébotomie induit une mobilisation des HSC dépendante de l'activité des ostéoclastes (12).

Dans un premier temps, l'impact de la calcitonine sur la cellularité et le nombre de HSC a été étudié dans la MO et dans la rate en conditions physiologiques et lors de l'anémie induite par phlébotomie. Nos résultats indiquent que la phlébotomie augmente le nombre de cellules seulement dans la MO, et qu'un effet comparable est mesuré chez des souris traitées avec de la calcitonine (figure 4.1 A, B; $p < 0.001$). Il est intéressant de constater que l'administration de calcitonine n'a pas modulé la cellularité de la MO et de la rate en condition physiologique.

Afin d'analyser par cytofluorométrie le pourcentage de HSC (Lin-Sca1+cKit+) dans la MO et la rate, un marquage Sca-1 et c-Kit a été effectué sur les cellules « Lineage » négatives (figure 4.1 C). Lors de la phlébotomie, une augmentation du nombre de HSC dans la MO et dans la rate a été constatée (figure

4.1 D, E; $p < 0.05$ et $p < 0.001$, respectivement). Même si la hausse du nombre de HSC dans la MO a été plus importante chez des souris traitées avec de la calcitonine (figure 4.1 D; $p < 0.001$) cet effet n'a pas été statistiquement significatif par rapport aux souris seulement phlébotomisées. La calcitonine ne semble pas moduler le nombre de HSC dans la rate chez les souris phlébotomisées.

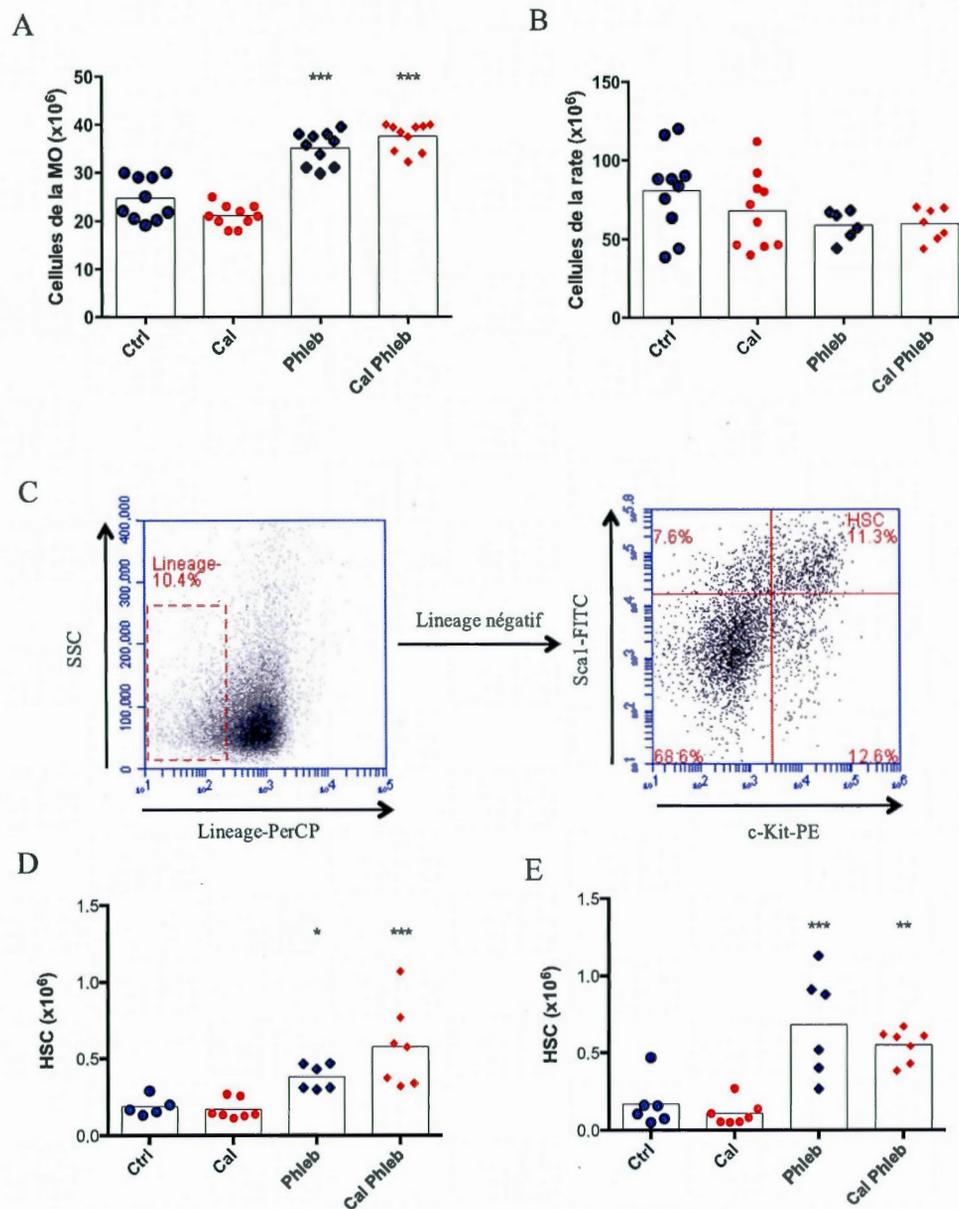


Figure 4.1 Impact de la calcitonine sur la cellularité et le nombre de cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse et la rate des souris rendues anémiques par phlébotomie. Pendant 5 jours consécutifs, les souris ont été traitées avec de la calcitonine (Cal et Cal Phleb) ou du PBS (Ctrl et Phleb) et au 3^{ème} jour de traitement, certaines souris ont été saignées (Phleb et Cal Phleb). Les souris contrôles

et phlébotomisées ont été euthanasiées au jour 5 post-phlébotomie (n=5-10). Les cellules de la MO (fémur et tibia) et de la rate ont été récupérées et comptées (A et B). L'analyse de l'expression de c-Kit et du Sca-1 sur la population lineage négative a permis de déterminer le pourcentage de HSC (Lin-cKit+Sca1+) (C) et d'estimer le nombre total de HSC dans la MO et dans la rate par cytofluorométrie en flux (D et E respectivement). L'analyse statistique a été effectuée avec un One-Way ANOVA suivi d'un post-test de Turkey. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ et *** $P < 0.001$ représentent la différence par rapport aux contrôles (Ctrl).

Afin de mesurer l'impact de la calcitonine sur la résolution de l'anémie induite par la phlébotomie, le niveau d'hémoglobine sanguin, ainsi que la réticulocytose ont été suivis quotidiennement. En réponse à une phlébotomie modérée, le taux d'hémoglobine sanguine a chuté significativement le lendemain du saignement pour ensuite se rétablir rapidement (figure 4.2 A, $p < 0,001$). L'anémie causée par la phlébotomie a stimulé une production de réticulocytes à partir du jour 2 post-saignement, et cette réponse est devenue significative les jours 3 et 4 (figure 4.2 B; $p < 0.01$ et $p < 0.0001$, respectivement). Il est important de souligner qu'aucune différence significative n'a été constatée entre les souris traitées à la calcitonine et les souris contrôles par rapport aux niveaux d'hémoglobine et à la réticulocytose (figure 4.2 A, B).

De plus, des résultats préliminaires ont montré que le pic de réticulocytose était atteint le jour 6 post-phlébotomie (les données après le jour 6 ne sont pas présentées). Par la suite, nous avons donc effectué nos analyses au jour 5 post-phlébotomie afin d'être sûr que l'érythropoïèse de stress était bien engagée lors de nos expériences.

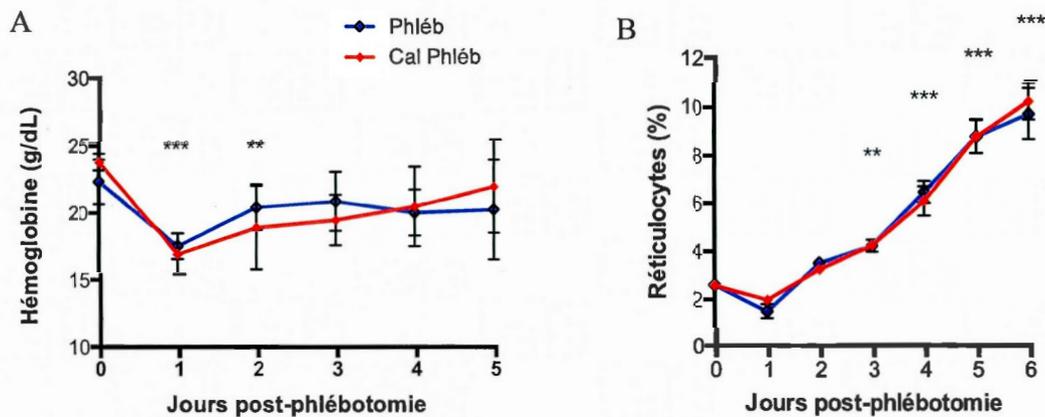


Figure 4.2 Effet de la calcitonine sur la concentration d'hémoglobine et réticulocytose causé par la phlébotomie. Les souris ont été traitées avec la calcitonine (Cal Phleb) ou du PBS (Phleb) pendant 5 jours consécutifs. Au 3^{ème} jour de traitement (jour 0 post-phlébotomie), les souris ont été saignées, puis la concentration en hémoglobine (A) et la réticulocytose (B) ont été mesurées quotidiennement. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de dix souris par groupe. L'analyse statistique a été effectuée avec un T-test non paramétrique. ** $P < 0.01$ et *** $P < 0.001$ représentent la différence par rapport aux valeurs du jour 0.

Nous avons également vérifié l'impact de la calcitonine sur les populations de progéniteurs érythroïdes en réponse à la phlébotomie (figure 4.3). Pour cela, le pourcentage de progéniteurs érythroïdes immatures (Ter119+ CD71+) et de progéniteurs érythroïdes matures (Ter119+ CD71-) a été analysé par cytofluorométrie chez les populations 7-AAD négatives qui sont les cellules viables (figure 4.3 A). Nos résultats indiquent une hausse significative du nombre de progéniteurs

érythroïdes immatures (cellules Ter119+CD71+) dans la MO (figure 4.3 B; $p < 0.001$), au jour 5 après saignement. Cependant, aucun effet majeur n'a été constaté pour les progéniteurs érythroïdes immatures (cellules Ter119+CD71+). De plus, l'administration de calcitonine n'a pas modulé cette réponse (figure 4.3 B, C). Nos résultats montrent également que la phlébotomie n'influence pas le nombre de progéniteurs érythroïdes immatures et matures dans la rate. La calcitonine ne semble pas avoir d'effet sur le nombre de progéniteurs érythroïdes dans la rate en condition physiologique ou lors de la phlébotomie (figure 4.3 D, E).

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que l'activité des ostéoclastes ne semble pas être requise pour l'augmentation des HSC dans la rate, l'érythropoïèse de stress et la résolution de l'anémie induite par la phlébotomie.

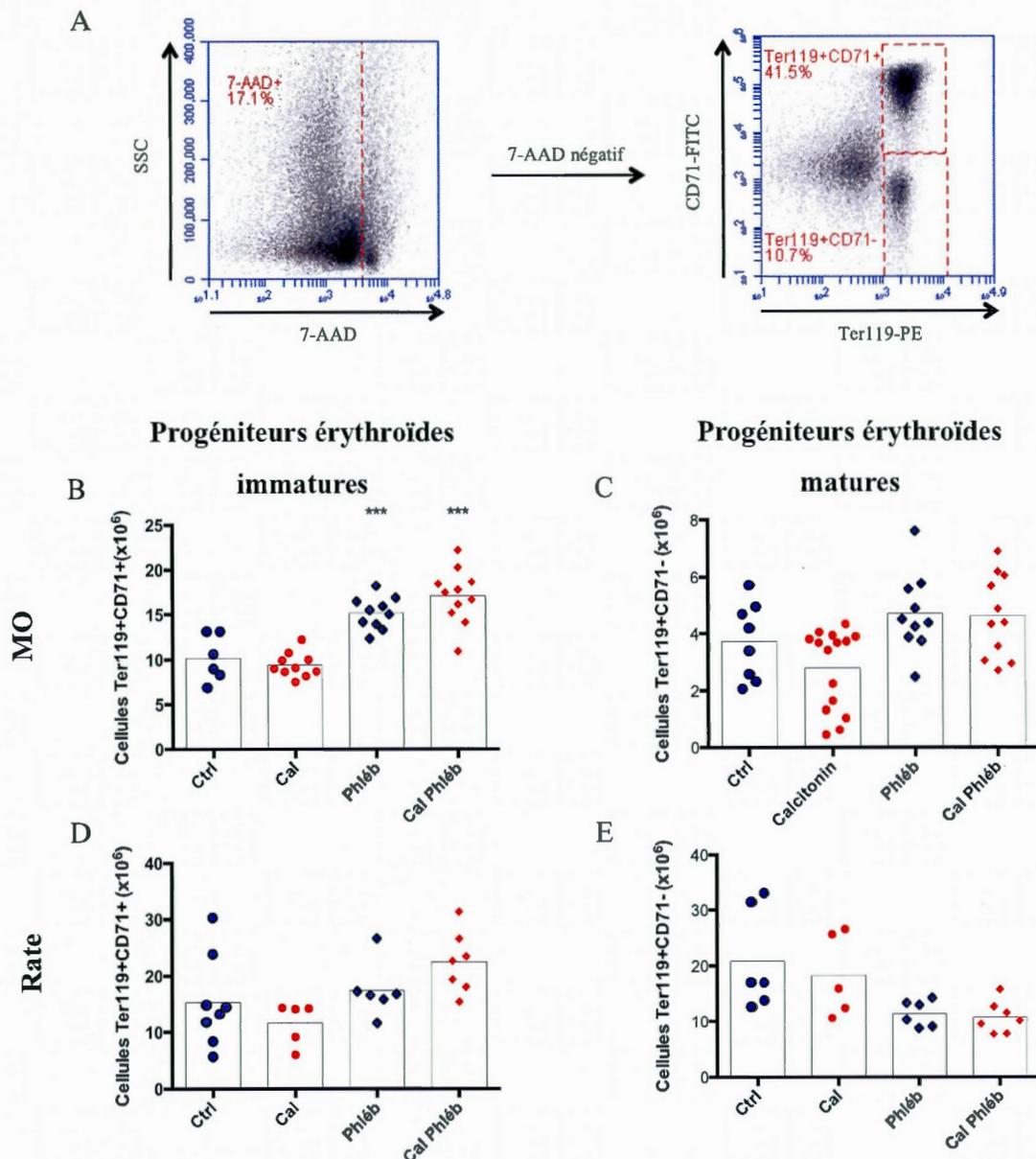


Figure 4.3 Impact de la calcitonine sur l'érythropoïèse de stress induite par la phlébotomie. L'analyse des populations de progéniteurs érythroïdes immatures (Ter119+CD71+) et matures (Ter119+CD71-) a été effectuée par cytofluorométrie sur la population 7-AAD négative (cellules viables) (A). Pendant 5 jours consécutifs, les souris ont été traitées avec la calcitonine (Cal et Cal Phleb) ou du PBS (Ctrl et Phleb), et au 3^{ème} jour de traitement, certaines souris ont été saignées (Phleb et Cal

Phleb). Les souris contrôles et phlébotomisées ont été euthanasiées au jours 5 post-phlébotomie (n=6-10). Les cellules de la MO (fémur et tibia) et de la rate ont été récupérées pour analyser le nombre de progéniteurs érythroïdes immatures et matures dans la MO (B et C) et dans la rate (D et E) par cytofluorométrie. L'analyse statistique a été effectuée avec un One Way ANOVA suivi d'un post-test de Turkey. ***P<0.001 représente la différence par rapport aux contrôles (Ctrl).

4.2 L'administration de calcitonine exacerbe la parasitémie et l'anémie chez les souris infectées par *P. c. adami* DK sans altérer la réponse érythropoïétique.

Kollet *et al.* ont démontré que l'inflammation induite par l'injection de LPS ainsi que l'anémie causée par une phlébotomie induisaient une mobilisation des HSC dépendante des ostéoclastes (12). Cependant, ces auteurs ont centré leur étude sur la mobilisation des progéniteurs hématopoïétiques et leur inhibition par la calcitonine, sans analyser les effets sur les populations érythroïdes et/ou la résolution de l'anémie.

Dans ce contexte, l'objectif primaire de notre étude était d'évaluer dans quelle mesure les ostéoclastes sont engagés dans la mobilisation de HSC et la réponse à l'anémie lors de l'infection par *P. c. adami* DK. Ce parasite cause une forme non létale de malaria chez la souris BALB/c, laquelle est caractérisée par une inflammation et une anémie hémolytique aigue (1). Lors de l'infection par *P. chabaudi*, la parasitémie est détectable par frotti sanguin à partir du jour 4 post-infection et atteint un pic le jour 8 pour ensuite être résolue spontanément. Une splénomégalie importante a lieu chez des souris infectées, laquelle est maximale 2 à 3 jours après le pic d'infection (221). Ce modèle murin de la malaria s'avère un excellent moyen pour étudier l'implication des HSC de la MO dans la résolution de

l'infection et de l'anémie dans un contexte inflammatoire. En effet, lors de la malaria on observe une forte production de cytokines pro-inflammatoires et un engagement majeur des macrophages participant au contrôle de l'infection (216).

Dans un premier temps, l'impact de la calcitonine sur le nombre de cellules dans la MO et la rate au pic d'infection (jour 8 post-infection) a été étudié (figure 4.4). La splénomégalie induite par l'infection a été corroborée chez les animaux infectés par rapport au poids de la rate (figure 4.4 A; $p < 0.001$). Cet effet a été significativement atténué par le traitement à la calcitonine (figure 4.4 A; $p < 0.01$). Comparativement aux souris contrôles, les souris infectées présentaient moins de cellules dans la MO (figure 4.4 B; $p < 0,001$) et significativement plus dans la rate (figure 4.4 C; $p < 0,001$). Le traitement à la calcitonine a partiellement restauré la cellularité de la MO chez les souris infectées (figure 4.4 B, $p < 0,01$), tandis que dans la rate, il a réduit drastiquement le nombre de cellules par rapport aux contrôles infectés (figure 4.4 C; $p < 0.001$).

Concernant la population de HSC, l'infection a mené à une augmentation de leur nombre dans la MO (figure 4.4 D, $p < 0.01$) et dans la rate (figure 4.4 E; $p < 0.001$). De manière intéressante, l'administration de calcitonine n'a pas modifié le nombre de HSC dans la MO chez les souris infectées (figure 4.4 C, D), mais a drastiquement réduit celui dans la rate (figure 4.4 D); $p < 0.001$).

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que l'activité des ostéoclastes semble requise pour le développement de la splénomégalie et l'augmentation de HSC dans la rate lors de l'infection.

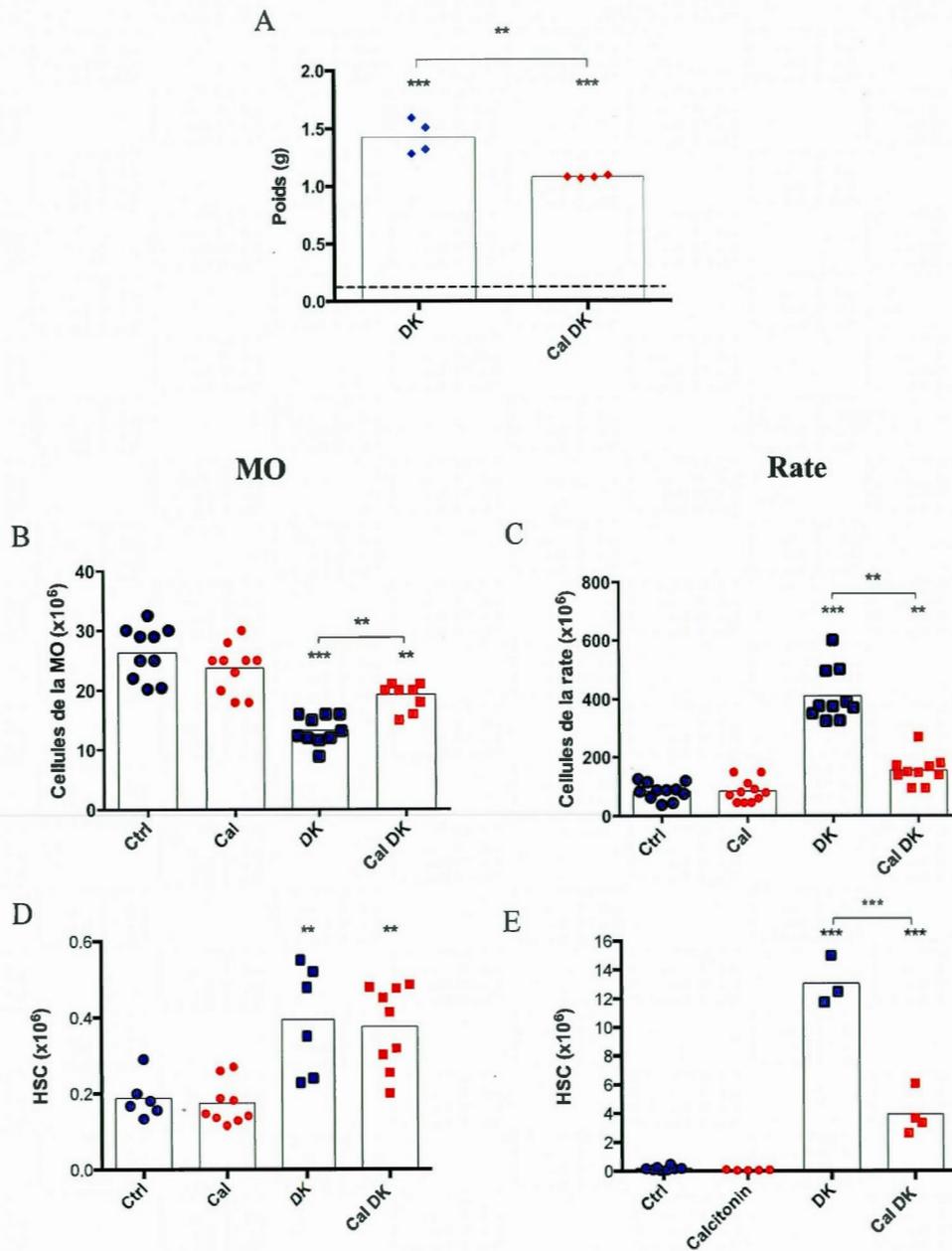


Figure 4.4 Impact de la calcitonine sur la cellularité et le nombre de cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse et la rate lors de la malaria. Pendant 5 jours consécutifs, les souris ont été traitées avec la calcitonine (Cal et Cal DK) ou du PBS (Ctrl et DK). Au 3^{ème} jour de traitement, les souris ont été infectées

par voie intra-péritonéale avec 10^5 globules rouges parasités par *P. c. adami* DK (DK et Cal DK). Les souris ont été euthanasiées au jour 8 post-infection (n=3-10). Le poids des rates des souris infectées a été mesuré. Les pointillés représentent la valeur des souris contrôles (A). Les cellules de la MO (fémur et tibia) et de la rate ont été récupérées et comptées (B et C respectivement) et le pourcentage et nombre de HSC Lin-cKit+Sca1+ ont été déterminés par cytofluorométrie en flux (D et E respectivement). L'analyse statistique a été effectuée avec un One-Way ANOVA suivi d'un post-test de Turkey. **P<0.01 et ***P<0.001 représente la différence par rapport aux contrôles (Ctrl).

Une deuxième expérience a été réalisée pour suivre la réponse érythropoïétique de stress durant l'infection. Cette réponse de stress se déclenche immédiatement après le pic de parasitémie, au moment où l'anémie devient plus accentuée (183). Le niveau d'hémoglobine sanguin et la réticulocytose ont été suivis durant l'infection, jusqu'à sa résolution complète.

En réponse à l'infection, le taux d'hémoglobine sanguine a significativement chuté le jour 8 post-infection pour atteindre un minimum au jour 10 et ensuite remonter progressivement (figure 4.5 A, $p<0.01$ et $p<0.001$ respectivement). L'anémie causée par l'infection a stimulé une réticulocytose à partir du jour 11 post-infection (figure 4.5 B, $p<0.001$). Les souris infectées et traitées avec la calcitonine ont présenté une anémie accrue notamment aux jours 11 et 12 post-infection (figure 4.5 A, $p<0.05$ et $p<0.01$ respectivement). De plus, ces souris ont répondu par une réticulocytose plus importante au jour 14 post-infection (figure 4.5 B, $p<0,05$).

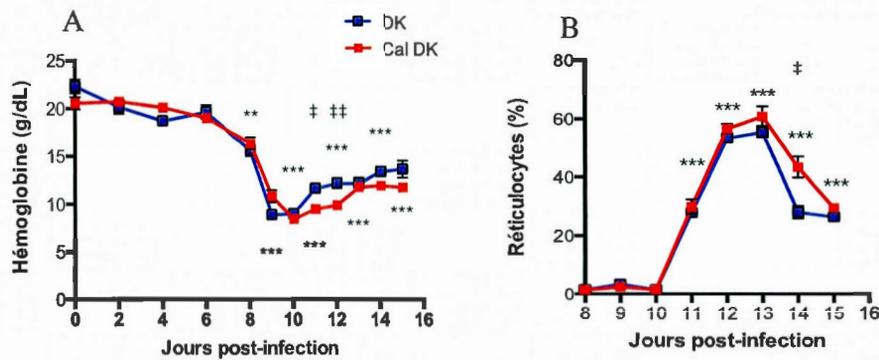


Figure 4.5 Impact de la calcitonine sur la concentration d'hémoglobine et réticulocytose causée par la malaria. Les souris ont été traitées avec de la calcitonine (Cal DK, n=5-10) ou du PBS (DK, n=5-10) pendant 5 jours consécutifs. Au 3^{ème} jour de traitement, les souris ont été infectées par voie intra-péritonéale avec 10^5 globules rouges parasités par *P. c. adami* DK (DK et Cal DK), puis la concentration en hémoglobine (A) et la réticulocytose (B) ont été estimées quotidiennement. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de dix souris par groupe. L'analyse statistique a été effectuée avec un T-test non paramétrique. †P<0.05 et ††P<0.01 représente la différence entre les deux groupes. **P<0.01 et ***P<0.001 représentent la différence par rapport aux valeurs du jour 0.

Dans le but de déterminer si l'inhibition de la mobilisation des HSC de la MO vers la rate influence l'érythropoïèse de stress lors de l'infection par *P. c. adami* DK, cinq des dix souris appartenant à chaque groupe expérimental ont été sacrifiées le jour 8 post-infection, pour estimer le nombre de progéniteurs érythroïdes immatures et matures dans la MO et dans la rate. Les données ont montré une chute du nombre de progéniteurs érythroïdes immatures (Ter119+CD71+) et matures (Ter119+CD71-) dans la MO des souris infectées par rapport aux contrôles naïves (figure 4.6 A, B,

$p < 0.001$). L'administration de calcitonine n'a pas modulé ces populations dans la MO (figure 4.6 A, B).

Dans la rate, une importante augmentation du nombre de progéniteurs érythroïdes immatures dans la rate a été constatée en réponse à l'infection (figure 4.6 C, $p < 0.001$), mais le nombre de progéniteurs érythroïdes matures est resté inchangé (figure 4.6 D). Le traitement à la calcitonine a réduit significativement le nombre de progéniteurs érythroïdes immatures dans la rate des souris infectées (figure 4.6 C, $p < 0.001$), sans pour autant altérer le nombre de progéniteurs érythroïdes matures (figure 4.6 D).

Globalement, ces résultats indiquent que la mobilisation des HSC dépendante des ostéoclastes semble requise pour le développement de l'érythropoïèse de stress dans la rate. Cependant, l'inhibition des ostéoclastes ne semble pas avoir d'effet majeur sur la résolution de l'anémie lors de la malaria.

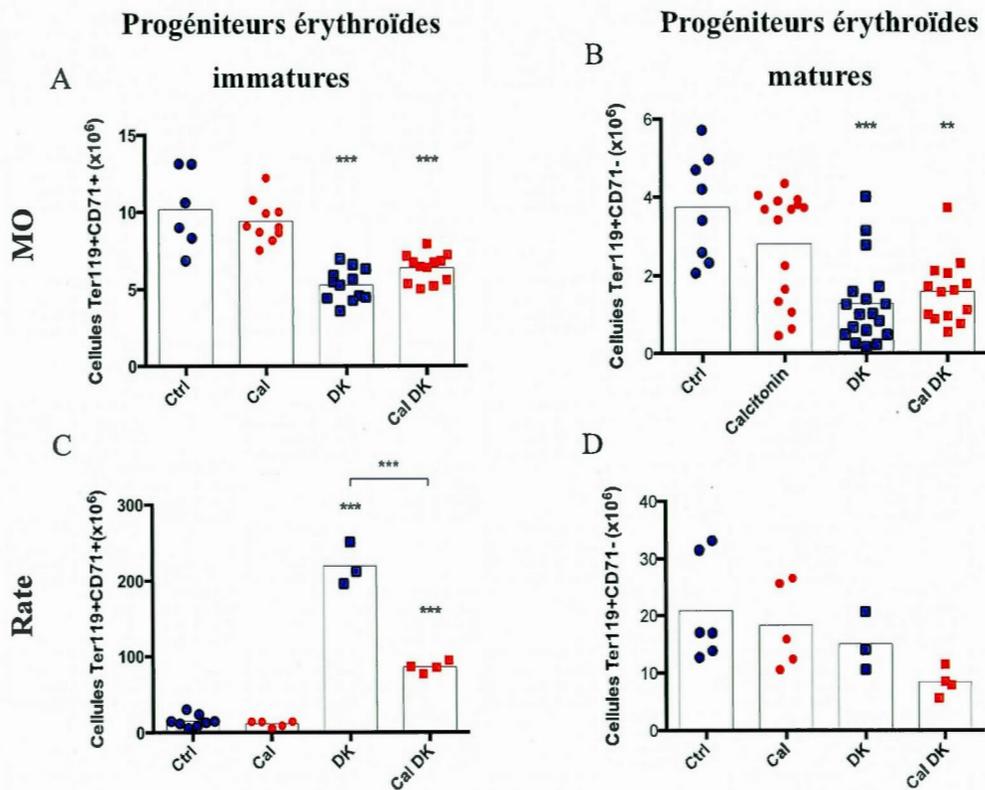


Figure 4.6 Effet de la calcitonine sur l'érythropoïèse de stress induite par la malaria. Les souris ont été traitées avec la calcitonine (Cal et Cal DK) ou du PBS (Ctrl et DK) pendant 5 jours consécutifs. Au 3^{ème} jour de traitement, les souris ont été infectées par voie intra-péritonéale avec 10^5 globules rouges parasités par *P. c. adami* DK (DK et Cal DK; n=4-16). Les souris contrôles et infectées ont été euthanasiées au jour 8 post-infection, les cellules de la MO (fémur et tibia) et de la rate ont été récupérées et comptées, et le nombre de progéniteurs érythroïdes immatures et matures dans la MO (B et C) et dans la rate (D et E) ont été estimés par cytofluorométrie. L'analyse statistique a été effectuée avec un One-Way ANOVA suivi d'un post-test de Turkey. **P<0.01 et ***P<0.001 représente la différence par rapport aux contrôles (Ctrl).

Les résultats ont mis en évidence une anémie plus accentuée chez des souris traitées avec de la calcitonine aux jours 11 et 12 post-infection, et un pourcentage plus élevé de réticulocytes en circulation le jour 14 post-infection. Ces modifications ont été accompagnées d'une exacerbation de l'infection chez le groupe d'animaux traités avec de la calcitonine les jours 5, 7, 8 et 12 post-infection (figure 4.7 A). En effet, les souris traitées à la calcitonine ont présenté une parasitémie cumulative (somme de charge parasitaire estimée durant les 12 jours d'infection) plus importante (figure 4.7 B; $p < 0.001$) ainsi qu'un pic de parasitémie plus importante (figure 4.7 C; $p < 0.05$).

Dans l'ensemble, nos résultats indiquent que le traitement à la calcitonine accentue l'infection par *P. c. adami* DK.

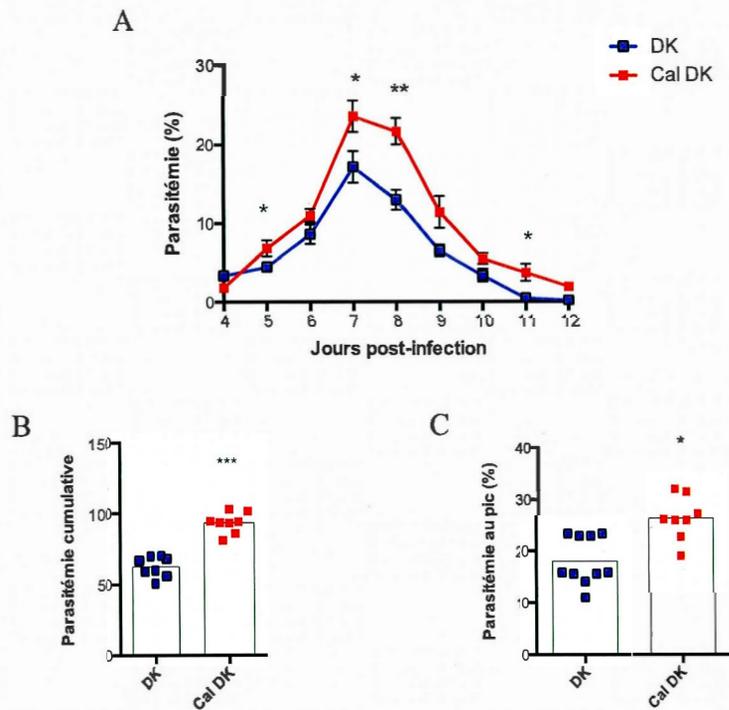


Figure 4.7 Effet de la calcitonine sur la parasitémie lors de l'infection par *P. c. adami* DK. Les souris ont été traitées avec la calcitonine (Cal DK; n=5-10) ou du PBS (DK; n=5-10) pendant 5 jours consécutifs. Au 3^{ème} jour de traitement, les souris ont été infectées par voie intra-péritonéale avec 10^5 globules rouges parasités par *P. c. adami* DK (DK et Cal DK), et la parasitémie a été évaluée quotidiennement sur frottis sanguins colorés au Giemsa (A); la parasitémie cumulative de 5 souris par groupe (B) et la parasitémie au pic de 10 souris par groupe (C) ont été déterminées. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 10 souris jusqu'au jour 8, et de 5 souris jusqu'au jour 12. L'analyse statistique a été effectuée avec un T-test non paramétrique. * $P < 0.05$ et ** $P < 0.01$ représente la différence entre les deux groupes.

4.3 La calcitonine réduit le nombre de macrophages spléniques et médullaires lors de l'infection par *P. c. adami* DK

Comme cité précédemment, les macrophages sont des cellules phagocytaires jouant un rôle primordial dans l'élimination des parasites lors de la malaria et une altération de leur fonction influe sur la clairance parasitaire (216).

L'analyse de la population de macrophages (cellules CD11b+F4/80+) dans la MO et dans la rate au jour 8 post-infection a été réalisée par cytofluorométrie avec un marquage CD11b et F4/80, chez la population 7-AAD négative qui sont les cellules viables (figure 4.8 A). A des fins comparatives, le nombre de macrophages dans la MO et la rate ont également été évalués au 5^{ème} jour post-phlébotomie, chez des souris contrôles ou traitées à la calcitonine.

Nos résultats montrent qu'en condition physiologique (souris non-anémiques), le traitement à la calcitonine n'a pas affecté le nombre de macrophages dans la MO et dans la rate (figure 4.8 B, C $p < 0.05$). La phlébotomie n'a pas changé le nombre de macrophages dans la MO et la rate. Dans ce contexte, la calcitonine n'a pas modulé le nombre de macrophages médullaires et spléniques chez des souris phlébotomisées (fig. 20B, C). Cependant, l'infection a causé une forte augmentation du nombre de macrophages dans la MO (figure 4.8 B, $p < 0.01$) et la rate (figure 4.8 C, $p < 0.001$) et le traitement à la calcitonine a réduit significativement cette réponse dans la MO (figure 4.8 B, $p < 0.05$) ainsi que dans la rate (figure 4.8 C, $p < 0.001$).

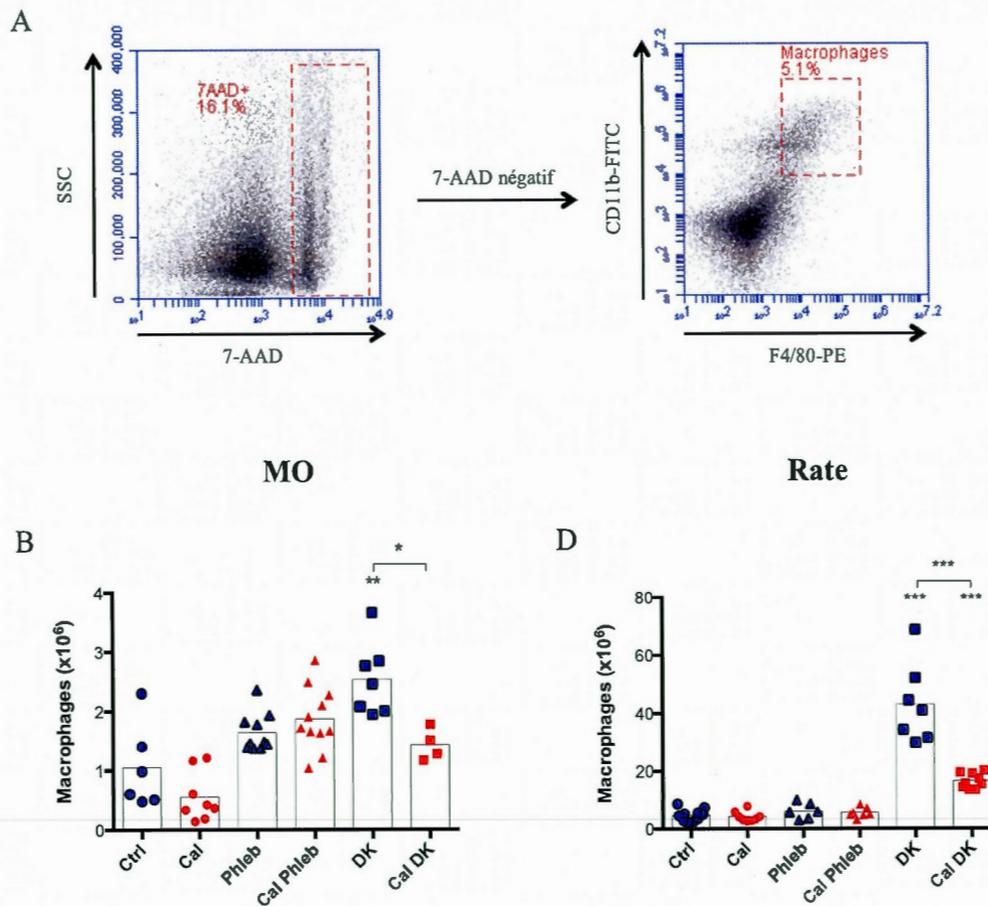


Figure 4.8 Modulation de la population de macrophages par la calcitonine lors de la phlébotomie et de la malaria. Le pourcentage de macrophages dans la MO et la rate a été déterminé par cytofluorométrie à l'aide d'un double marquage CD11b et F4/80 sur une population 7-AAD négatives (A). Les souris ont été traitées avec la calcitonine (Cal, Cal Phleb et Cal et DK) ou du PBS (Ctrl, Phleb et DK) pendant 5 jours consécutifs. Au 3^{ème} jour de traitement, les souris ont été saignées (Phleb et Cal Phleb) ou infectées par voie intra-péritonéale avec 10^5 globules rouges parasités par *P. c. adami* DK (DK et Cal DK). Les souris phlébotomisées et les souris contrôles ont été euthanasiées au jour 5 post-phlébotomie, alors que les souris infectées ont été sacrifiées au jour 8 post-infection (n=4-10). Puis, l'analyse du nombre de

macrophages dans la MO (B) et la rate (C) a été réalisée. L'analyse statistique a été effectuée avec un One Way ANOVA suivi d'un post-test de Turkey. *P<0.05; **P<0.01 et ***P<0.001 représente la différence par rapport aux contrôles (Ctrl).

La production de macrophages est principalement contrôlée par le M-CSF, une cytokine stimulant la prolifération et la différenciation des progéniteurs myéloïdes en macrophages matures (222). L'engagement des HSC dans la voie myéloïde génère des GM-CFU qui mûrissent en M-CFU, lesquels prolifèrent et se différencient en macrophages sous l'action du M-CSF (223–225).

Afin d'évaluer si la calcitonine influence directement la génération des macrophages, la génération de colonies M-CFU et la différenciation des macrophages à partir des cellules de la MO *in vitro* ont été comparées en absence et présence de calcitonine (35 et 70 ng/ml). Ces concentrations de calcitonine ont été choisies en se basant sur des travaux étudiant l'effet de la calcitonine *in vitro* (226,227).

De façon intéressante, la calcitonine a inhibé la production de M-CFU dans un milieu de culture semi-solide supplémenté de M-CSF (Methocult M3234) (figure 4.9 A, B). Par contre, aucun effet inhibiteur n'a été constaté sur le nombre de macrophages produits en réponse à la stimulation unique avec du M-CSF dans du milieu RPMI complet (figure 4.9 C).

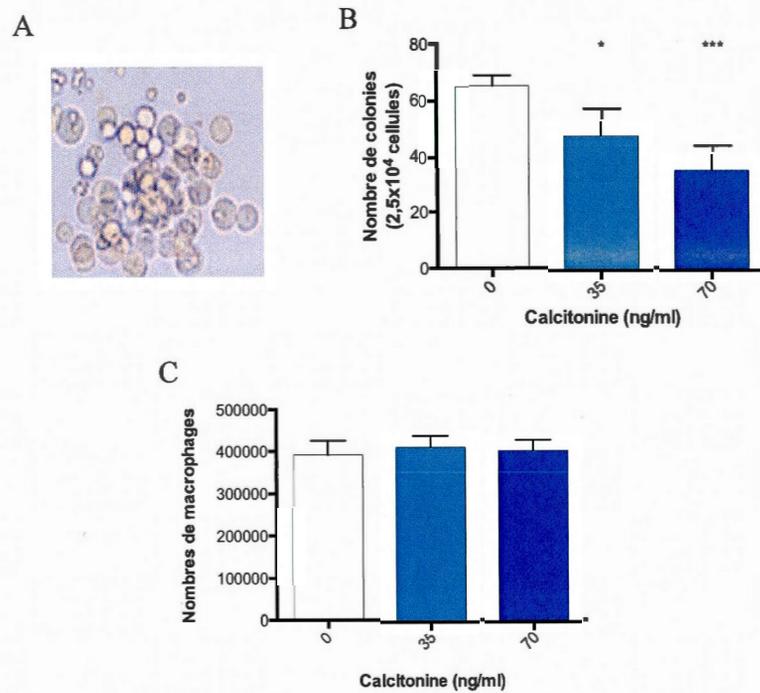


Figure 4.9 Impact de la calcitonine sur la production de colonies *Macrophages – Colony Forming Unit* et la différenciation de précurseurs en macrophages (*in vitro*). Les cellules de la MO ($2,5 \times 10^4$ cellules) ont été cultivées en milieu semi-solide (Methocult M 3234) pendant 6 jours en présence de 12,5 ng/ml de M-CSF et de 0, 35 ou 70 ng/ml de calcitonine, puis le nombre de colonies M-CFU générées (A) a été déterminé par comptage (B). En parallèle, les cellules de la MO (1×10^6 cellules) ont été cultivées pendant 6 jours en présence de 12,5 ng/ml de M-CSF et de 0, 35 ou 70 ng/ml de calcitonine, puis le nombre de macrophages (cellules CD11b+ F4/80+) a été analysé par cytofluorométrie à l'aide d'un double marquage CD11b et F4/80 (C). Les résultats représentent la moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes. L'analyse statistique a été effectuée avec un One Way ANOVA suivi d'un post-test de Turkey. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ représente la différence par rapport aux contrôles.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer, par une stratégie d'inhibition, dans quelle mesure les ostéoclastes influencent l'hématopoïèse lors de la malaria. Nous avons analysé l'impact de l'inhibition de l'activité des ostéoclastes par la calcitonine sur l'égression des HSC, l'induction de l'érythropoïèse de stress, la production de réticulocytes et l'anémie chez des souris infectées par *P. c. adami* DK. Des souris phlébotomisées ont été considérées comme modèle représentatif d'un stress érythropoïétique en absence d'inflammation.

L'infection par *P. c. adami* DK génère une inflammation systémique et une anémie hémolytique aigue chez la souris (1), suivies aussitôt d'une réponse hématopoïétique de stress, nécessaire pour fournir de nouveaux érythrocytes (156) et des cellules phagocytaires (macrophages et neutrophiles) impliquées dans la clairance parasitaire (216,228,229). Le contrôle de l'infection par *P. c. adami* est précédé par le développement d'une myélopoïèse extra-médullaire (230) et le recrutement des monocytes (231) dans la rate. Cet organe est primordial pour le développement d'une immunité antiparasitaire (232). Les macrophages spléniques, dont le nombre augmente fortement durant l'infection (233), reconnaissent et détruisent les érythrocytes parasités (234), mais ont leur durée de vie diminuée à cause de l'érythrophagocytose accrue et l'apoptose concomitante causée par l'hémoglobine et l'hème (235). En réponse à une anémie hémolytique aigue, la mobilisation des HSC de la MO vers la rate et le développement d'une érythropoïèse de stress dans cet organe sont constatés (10,11). L'étude relativement récente de Kollet et *al.*, rapporte que l'anémie causée par la phlébotomie ou l'inflammation induite par l'injection de

LPS provoquent une égression des HSC de la MO vers la périphérie, dépendante de l'activité de résorption osseuse des ostéoclastes (12). Ces observations nous ont amenés à émettre initialement l'hypothèse que la mobilisation des HSC dépendante des ostéoclastes serait aussi importante pour répondre à l'hypoxie/anémie et soutenir la production de cellules nécessaires pour contrer l'infection *P. c. adami* DK. En effet, ce modèle infectieux combine les deux situations de stress exploitées séparément par Kollet et *al.*, l'anémie et l'inflammation.

Le modèle de malaria s'avère particulièrement intéressant pour l'étude de la mobilisation de HSC et de précurseurs hématopoïétiques parce que l'infection peut fournir des stratégies qui favorisent la mobilisation indépendamment de l'activité des ostéoclastes. Premièrement, l'infection stimule la myélopoïèse (230), laquelle facilite l'égression des HSC. En effet, il a été démontré que l'administration répétitive de G-CSF stimule indirectement la mobilisation des HSC et des précurseurs hématopoïétiques via l'induction de la myélopoïèse et l'activation de neutrophiles (92,96,236,237). Deuxièmement, malgré la stimulation de la myélopoïèse, l'hémolyse et le stress oxydatif reliés à l'hème et l'hémoglobine conduisent à l'apoptose des macrophages (235,238–240) et il a été rapporté que l'élimination des macrophages semble suffisante pour induire la mobilisation des HSPC (241,242). Dans ce contexte, la malaria pourrait affecter la population de macrophages CD169+, impliquée dans la rétention des HSC dans la MO (241). Troisièmement, l'hémolyse altère le métabolisme osseux via l'hémine (2), et la malaria semble générer une dysfonction des ostéoclastes et ostéoblastes vers le pic d'infection. Dans l'ensemble, ces observations rendent notre étude pertinente.

Afin d'évaluer notre hypothèse initiale, le premier objectif était de mettre en évidence l'implication des ostéoclastes dans la mobilisation des HSC lors de la malaria, et de comparer cette mobilisation par rapport à la phlébotomie. L'implication

précoce des ostéoclastes durant l'infection pourrait être stimulée par une production rapide d'IFN- γ par les cellules NK lors de la malaria (198,243), une cytokine qui stimule l'activité des ostéoclastes (244). Dans ce même contexte, l'injection de LPS déclenche une production importante d'IFN- γ par les cellules NK, les macrophages et les cellules dendritiques (245) et provoque une mobilisation des HSC dépendante de l'activité des ostéoclastes (12). À la lumière de ces observations, la possible action mobilisatrice des HSC exercée par les ostéoclastes pourrait être stimulée par l'IFN- γ lors de la malaria. De plus cette cytokine est le principal activateur de la fonction phagocytaire des macrophages, laquelle est primordiale pour le contrôle de la parasitémie (246). Il serait intéressant d'évaluer davantage l'importance de l'IFN- γ dans l'axe ostéoclastes-mobilisation-malaria, en analysant l'impact de la calcitonine sur la production d'IFN- γ par les cellules NK. En plus, il serait aussi pertinent d'évaluer comment une déficience spécifique du récepteur à l'IFN- γ chez les ostéoclastes affecte la mobilisation des HSC lors de la malaria.

Nos données ont mis en évidence une baisse importante du nombre de HSC dans la rate des souris prétraitées avec la calcitonine lors la phase d'infection aiguë, ce qui suggère une inhibition de la mobilisation. Ces résultats suggèrent indirectement que l'activité des ostéoclastes est nécessaire pour le développement de la splénomégalie durant l'infection, causée par l'établissement d'une hématopoïèse extra-médullaire dans la rate (247) et le développement d'une réponse immunitaire contre le parasite (248). Plusieurs études ont rapporté une corrélation entre le niveau de splénomégalie et le nombre de HSC présentes dans la rate lors de l'infection à *Plasmodium* (249,250), et le recrutement des HSC dans la rate semble requis pour le développement d'une myélopoïèse extra-médullaire et le contrôle de l'infection (230).

Contrairement à l'étude de Kollet *et al.* (12), l'administration de calcitonine n'a pas influencé le nombre de HSC et l'érythropoïèse de stress dans la rate des souris

phlébotomisées, malgré le fait d'avoir utilisé les mêmes conditions expérimentales que ces auteurs. Cette équipe avait prélevé 300 μ l de sang par la veine de la queue et nous avons récupéré le même volume de sang par la veine sub-mandibulaire, car elle permet d'obtenir un grand volume sanguin rapidement avec le moins de stress pour l'animal. Le contraste entre la phlébotomie et l'infection pourrait être relié à la cinétique et au niveau d'anémie. En effet, l'infection par *P. c. adami* DK induit une anémie aigue et progressive, alors que les conditions de phlébotomie utilisées provoquent plutôt une anémie modérée et ponctuelle. Étant donné qu'une hausse majeure des HSC n'a été constatée que dans la rate des souris infectées il est possible que phlébotomie n'a pas été assez importante pour stimuler une réponse modulable par la calcitonine. En plus, l'infection cause une réponse inflammatoire qui est absente chez les souris phlébotomisées et qui peut influencer la mobilisation. Par contre, le fait que des conditions expérimentales de phlébotomie plus sévères (prélèvement de 400 μ l pendant 3 jours consécutifs) semblent être suffisantes pour déclencher une forte réponse érythropoïétique dans la rate (251), suggère plutôt le besoin d'une méthode plus efficace. L'injection de phénylhydrazine, un agent chimique provoquant l'hémolyse serait un modèle plus représentatif de l'infection à considérer pour des expériences futures (2,241).

Le second objectif de notre étude était d'évaluer si la mobilisation des HSC exerce une influence sur l'érythropoïèse extra-médullaire en réponse à l'infection. En effet, lors de leur étude Kollet et *al.*, n'avaient pas analysé les populations érythroïdes extra-médullaires. Grover et *al.* ont rapporté que l'EPO, à des concentrations semblables à celles rencontrées lors d'une anémie aigue, stimule la différenciation des HSC vers la lignée érythroïde. Dans ce contexte, une corrélation entre le nombre de HSC et les progéniteurs érythroïdes dans la rate est généralement observée (252). Dans notre étude, en accord avec la réduction du nombre de HSC, une diminution du

nombre de progéniteurs érythroïdes immatures a été aussi constatée dans la rate de souris infectées prétraitées avec la calcitonine. Ramos *et al.* ont démontré que l'altération de l'érythropoïèse de stress caractérisée par une diminution du pourcentage de progéniteurs érythroïdes, semblable à celle mesurée dans notre modèle expérimental, cause une diminution du pic de réticulocytes, ainsi qu'une réticulocytose et une anémie plus prolongées en réponse à l'anémie (251). Étonnamment, des cinétiques de réticulocytose comparables ont été mesurées lors de l'infection par *P. c. adami* DK chez des souris prétraités avec la calcitonine puis infectées et les souris infectées. Cette information nous suggère des différences durant l'infection, qui ne permettent pas une extrapolation si claire.

Lors de la malaria, l'anémie/hypoxie provoque une hausse de la concentration plasmatique de l'EPO (253), et des recherches récentes ont démontré que la surexpression de l'EPO amène à une splénomégalie et une érythropoïèse extramédullaire accrue (254) comparables à celles rencontrées lors de la malaria. Cependant, les érythrocytes générés dans de telles circonstances semblent moins résistants au stress oxydatif, et ont une durée de vie réduite (153). Étant donné que les érythrocytes proviennent de la différenciation et de la prolifération des progéniteurs érythroïdes régulées par l'EPO (125,126), ces derniers pourraient aussi être plus sensibles au stress oxydatif, et rentrer en apoptose. À titre spéculatif, il est possible que l'importante production d'EPO lors de l'infection génère une production robuste des précurseurs qui n'aboutissent pas nécessairement à maturation, et que lors du traitement avec la calcitonine, l'érythropoïèse de stress soit optimisée pour générer des réticulocytes mieux équipés à contrer le stress oxydatif. Dans ce contexte, l'EPO exerce des effets anti-apoptotiques chez les précurseurs érythroïdes intermédiaires, plus spécifiquement les EryA, qui expriment des récepteurs pour l'EPO (138–146). Parallèlement, l'EPO inhibe la voie de régulation contrôlée par le facteur de transcription FoxO3. Chez les stades plus matures, les EryB-EryC n'expriment plus le récepteur à l'EPO, FoxO3 contrôle la synthèse d'enzymes antioxydantes qui

permettront ensuite aux cellules énucléées de survivre en circulation, jusqu'à l'épuisement de cet arsenal antioxydant (149,154). Pour tenter de comprendre la différence dans le nombre de progéniteurs érythroïdes retrouvée entre les souris prétraitées ou non à la calcitonine lors de la malaria, il serait pertinent d'analyser l'impact de la calcitonine sur la concentration plasmatique d'EPO, ainsi que sur le niveau d'apoptose et de stress oxydatif chez les précurseurs érythroïdes lors de la malaria.

Des recherches récentes ont démontré que des progéniteurs érythroïdes de stress de la rate possèdent la capacité de répondre à une situation d'anémie indépendamment de l'érythropoïèse médullaire. Le développement de cette population cellulaire est contrôlé par le facteur de croissance BMP4 qui stimule fortement la prolifération de ces précurseurs érythroïdes de stress en réponse à l'anémie. Ces cellules possèdent des propriétés d'auto-renouvellement qui leur permettent d'assurer une érythropoïèse effective en absence de HSC (166). Une population similaire de progéniteurs érythroïdes dépendants du BMP4 a été identifiée dans le foie (255) et une érythropoïèse hépatique a été rapportée chez des souris infectées par *P. yoelii* (253). Nous nous attendons à des effets comparables ayant lieu sur l'activité érythropoïétique dans la rate et le foie, l'engagement de ces progéniteurs hépatiques dans le développement de la réponse extra-médullaire robuste lors de la malaria pourrait supporter une réponse efficace à l'anémie indépendante des HSC de la MO. Dans ce sens, il sera primordial d'analyser aussi l'érythropoïèse dans le foie pour des expériences futures, ainsi que de suivre les niveaux de BMP4 plasmatique, splénique et hépatique dans notre modèle expérimental.

En corrélation avec une parasitémie exacerbée, une anémie plus accentuée a été constatée chez des souris traitées avec de la calcitonine aux jours 11 et 12 post-infection, qui a été suivie par une hausse des réticulocytes en circulation le jour 14

post-infection. Étant donné la corrélation entre l'anémie et la parasitémie (256), l'exacerbation de l'infection chez le groupe des souris prétraitées avec la calcitonine pourrait en effet expliquer une anémie plus prononcée. De plus, nos résultats ont mis en évidence une baisse importante de la population de macrophages dans la MO et dans la rate le jour 8 post-infection chez les souris prétraitées avec la calcitonine, lesquelles ont développé une infection plus importante à partir du jour 5 post-infection. Les macrophages sont des cellules phagocytaires jouant un rôle primordial dans l'élimination des parasites lors de la malaria et une altération de leur fonction ou leur déplétion influence la clairance parasitaire (216,228,229).

En rapport aux causes possibles amenant à une diminution de la population de macrophages, Riopel et *al.* ont démontré que la déficience en GM-CSF lors de l'infection par *P. chabaudi* AS amène à une faible production de cellules phagocytaires et à une parasitémie exacerbée (247). En effet, le GM-CSF et le M-CSF induisent la différenciation des précurseurs myéloïdes en macrophages (222). À la lumière de ces informations, il serait pertinent d'étudier si la modulation du nombre de macrophages dans la MO et dans la rate par la calcitonine pourrait être occasionnée par une baisse de la sécrétion du GM-CSF et/ou du M-CSF lors de l'infection. Pour compliquer notre interprétation des données, des recherches récentes ont révélé l'existence des macrophages résidents dans la rate et poumons, capables de repeupler leur nombre, indépendamment de la migration des HSC et des monocytes. Ces macrophages prolifèrent en réponse à la production locale de M-CSF et de GM-CSF (257), et en conditions inflammatoires comme celles rencontrées lors de la malaria (258), ils sont fortement stimulés par l'IL-4 des cellules Th2 (259).

À part leur rôle dans le contrôle de l'infection, les macrophages régulent aussi l'érythropoïèse (260), et certaines recherches les ont associés avec des conditions d'érythropoïèse pathologique exacerbée comme la polycythémie vraie. Dans cette pathologie, la déplétion expérimentale de macrophages diminue la splénomégalie et

l'érythroïèse, tel que nous l'avons constaté chez des souris prétraitées avec la calcitonine (219). Dans l'ensemble, il existe la possibilité que la réduction de la splénomégalie chez des souris prétraitées avec la calcitonine soit causée par la déplétion des macrophages.

La possibilité que la calcitonine agisse directement sur les cellules de la lignée myéloïde doit être considérée dans l'interprétation de nos résultats, malgré le fait que *in vitro*, des concentrations de calcitonine relativement plus faibles que celles utilisées *in vivo*, n'ont pas affecté la différenciation de macrophages. Les macrophages n'expriment pas des récepteurs à la calcitonine (CTR) fonctionnels, mais ils expriment le récepteur à l'amyline, lequel est formé du CTR associé soit à la molécule RAMP1, 2 ou 3. (114). La calcitonine et l'amyline sont des peptides de la même famille partageant de grandes similitudes structurelles provoquant des réactions croisées au niveau de leur récepteur respectif (114,115,261). L'amyline est un peptide hypoglycémiant principalement produit par les cellules β du pancréas en réponse à une augmentation de la glycémie (262). La fixation de l'amyline sur son récepteur cause une augmentation de la concentration intracellulaire d'Adénosine Monophosphate cyclique (AMPC) (263) et une activation de *l'extracellular-signal regulated kinase* $\frac{1}{2}$ (ERK1/2) (264). Il a été démontré qu'une concentration élevée en AMPC intracellulaire chez les macrophages réduirait leur capacité de prolifération en réponse au M-CSF (265). Est-ce que des concentrations de calcitonine élevées, comme celles utilisées pour inhiber la mobilisation dans notre modèle expérimental, peuvent activer des voies de signalisation normalement associées à l'amyline ? Cette possibilité devra être évaluée *in vitro*.

Deux résultats de notre étude, sont apparemment en contradiction. Nous avons évalué si la calcitonine altère la différenciation des macrophages à partir des précurseurs hématopoïétiques en réponse au M-CSF et nos résultats montrent que la calcitonine inhibe la génération des colonies M-CFU à partir de progéniteurs

hématopoïétiques *in vitro* sans pour autant réduire le nombre total de macrophages différenciés *in vitro*. Muguruma et al. ont montré que les précurseurs des ostéoclastes, Ostéoclasts-Colony Forming Unit (O-CFU), présents dans la MO proliféraient également en présence de M-CSF. En milieu semi solide, les O-CFU génèrent des colonies morphologiquement proches des M-CFU. Les O-CFU présentent des caractéristiques d'ostéoclastes comme notamment l'expression du récepteur à la calcitonine (266). Cette diminution apparente du nombre de M-CFU en réponse à la calcitonine pourrait être due à l'inhibition de la génération de ces O-CFU. En effet, notre analyse basée sur les critères morphologiques et sur la prolifération en réponse au M-CSF ne permet pas de dissocier clairement les O-CFU des M-CFU. La diminution apparente du nombre de M-CFU en présence de calcitonine pourrait être causée par l'inhibition de la génération des O-CFU par la calcitonine sans pourtant affecter la production de macrophages.

Le mécanisme par lequel la calcitonine réduit le nombre de macrophages lors de la malaria reste encore inconnu. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénomène. La calcitonine pourrait avoir une action indirecte en modulant la sécrétion de cytokines régulant la génération des macrophages et ainsi inhiber le développement de la myélopoïèse. L'inhibition de la mobilisation des HSC dans la rate par la calcitonine pourrait également inhiber la myélopoïèse extra-médullaire. La calcitonine pourrait également avoir une action directe sur les macrophages et altérer leur prolifération. L'utilisation de souris ayant une défiance pour le CTR restreinte aux macrophages permettrait de déterminer si la calcitonine a une action directe ou indirecte sur la population de macrophages lors de la malaria. En théorie, si la calcitonine agit directement sur les macrophages, lors de l'infection par *P. c. adami* DK, ces souris déficientes pour le CTR uniquement chez les macrophages ne devraient pas présenter de diminution du nombre des macrophages en réponse à l'administration de calcitonine.

L'implication des ostéoclastes dans la mobilisation reste encore controversée. Des travaux portant sur la mobilisation des HSC ont montré que l'inhibition de l'activité des ostéoclastes augmentait la mobilisation des HSPC en réponse au G-CSF (242,267). Des études ont démontré que chez différents modèles de souris ne produisant pas d'ostéoclastes actifs (op/op, oc/oc, c-Fos KO, RANKL KO) la mobilisation des HSPC induite par le G-CSF était accrue. Cependant ces souris présentent toutes des altérations de l'hématopoïèse (267–269). Mansour *et al.*, ont démontré que la déficience en ostéoclastes diminue le nombre de HSPC dans la MO, réduit la différenciation des ostéoblastes et l'expression de gènes impliqués dans la maintenance des HSC et diminue le « homing » des HSPC (268). Dans l'ensemble, ces informations semblent indiquer que les ostéoclastes sont également impliqués dans le maintien des niches endostéales. Donc, chez des souris déficientes en ostéoclastes, l'augmentation de la mobilisation des HSC accrue en réponse au G-CSF pourrait être due à une altération de l'intégrité de ces niches.

CHAPITRE 6 : CONCLUSION

Cette étude suggère que l'infection par *P. c. adami* DK induit une mobilisation des HSC de la MO vers la rate dépendante de l'activité des ostéoclastes. De plus, l'égression des HSC est essentielle pour le développement de la splénomégalie lors de la malaria. Néanmoins, l'établissement d'une réponse érythropoïétique de stress suite à l'anémie ne semble pas nécessiter la mobilisation des HSC. En effet, des populations de progéniteurs érythroïdes résidentes dans la rate seraient suffisantes pour répondre à l'anémie. Enfin, le traitement à la calcitonine exacerbe l'infection par *P. c. adami* DK. Cet effet est corrélé à une diminution de la population de macrophages dans la MO et dans la rate, inhérente à une inhibition de la myélopoïèse.

Dans la continuité de ce projet, il est essentiel de déterminer si la mobilisation des HSC dépendante des ostéoclastes est déclenchée par la sécrétion d'IFN- γ suite à l'inflammation induite par la malaria. De plus, les conséquences de l'inhibition de la mobilisation des HSC par la calcitonine sur le développement de myélopoïèse extra-médullaire et la résolution de l'infection devront être étudiées. Dans ce contexte, il serait intéressant d'évaluer si la calcitonine module les niveaux de GM-CSF et de M-CSF. Il est également primordial de déterminer si l'impact de la calcitonine sur l'infection et la population de macrophages découle de son action sur la mobilisation des HSC ou si cet effet est relié à une autre propriété intrinsèque à la calcitonine encore inconnue. Pour cela, l'impact de l'alendronate, un autre inhibiteur des ostéoclastes, lors de l'infection par *P. c. adami* DK pourrait être comparé à celui de la calcitonine. Il serait également pertinent de déterminer si la calcitonine a une action directe sur les cellules de la lignée myéloïde. En effet, seulement les cellules myéloïdes déjà engagées dans la voie de différenciation ostéoclastique sont connues

pour répondre à la calcitonine et aucune action sur les macrophages et leur précurseurs n'a été rapportée.

BIBLIOGRAPHIE

1. Lamb TJ, Langhorne J. The severity of malarial anaemia in *Plasmodium chabaudi* infections of BALB/c mice is determined independently of the number of circulating parasites. *Malar J*. 2008 Jan;7(1):68.
2. Moreau R, Tshikudi Malu D, Dumais M, Dalko E, Gaudreault V, Roméro H, et al. Alterations in bone and erythropoiesis in hemolytic anemia: comparative study in bled, phenylhydrazine-treated and *Plasmodium*-infected mice. *PLoS One*. 2012 Jan;7(9):e46101.
3. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest*. 2006 May;116(5):1195–201.
4. Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells : inferences for the localization of stem cell niches
Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells : inferences for the localization of stem cell niches. 2014;2293–9.
5. Adams GB, Scadden DT. The hematopoietic stem cell in its place. *Nat Immunol*. Nature Publishing Group; 2006 Apr 20;7(4):333–7.
6. Abkowitz JL, Robinson AE, Kale S, Long MW, Chen J. Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure. 2003;102(4):1249–53.

7. Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, Johnson FL, Weissman IL. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science*. 2001 Nov 30;294(5548):1933–6.
8. Massberg S, Schaerli P, Knezevic-Maramica I, Köllnberger M, Tubo N, Moseman EA, et al. Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):994–1008.
9. Wolber FM, Leonard E, Michael S, Orschell-Traycoff CM, Yoder MC, Srour EF. Roles of spleen and liver in development of the murine hematopoietic system. *Exp Hematol*. Elsevier; 2002 Sep 1;30(9):1010–9.
10. Lenox LE, Perry JM, Paulson RF. BMP4 and Madh5 regulate the erythroid response to acute anemia. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2741–8.
11. Perry JM, Harandi OF, Porayette P, Hegde S, Kannan AK, Paulson RF. Maintenance of the BMP4-dependent stress erythropoiesis pathway in the murine spleen requires hedgehog signaling. *Blood*. 2009 Jan 22;113(4):911–8.
12. Kollet O, Dar A, Shvitiel S, Kalinkovich A, Lapid K, Sztainberg Y, et al. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med*. 2006 Jun;12(6):657–64.
13. Boskey AL, Posner AS. Bone structure, composition, and mineralization. *Orthop Clin North Am*. 1984 Oct;15(4):597–612.
14. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014 Jan 16;505(7483):327–34.

15. Bone Diseases - Macroscopic, Histological, and Radiological Diagnosis of Structural Changes in [Internet]. [cited 2014 Jun 24]. Available from: <http://www.springer.com/medicine/rheumatology/book/978-3-540-65061-4>
16. DiGirolamo DJ, Clemens TL, Kousteni S. The skeleton as an endocrine organ. *Nat Rev Rheumatol*. Nature Publishing Group; 2012 Nov;8(11):674–83.
17. Ash P, Loutit JF, Townsend KM. Osteoclasts derived from haematopoietic stem cells. *Nature*. 1980 Feb 14;283(5748):669–70.
18. Scheven BA, Visser JW, Nijweide PJ. In vitro osteoclast generation from different bone marrow fractions, including a highly enriched haematopoietic stem cell population. *Nature*. 321(6065):79–81.
19. Kurihara N, Suda T, Miura Y, Nakauchi H, Kodama H, Hiura K, et al. Generation of osteoclasts from isolated hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1989 Sep;74(4):1295–302.
20. Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev*. 1992 Feb;13(1):66–80.
21. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, et al. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Sep;87(18):7260–4.
22. Takahashi N, Udagawa N, Tanaka S, Murakami H, Owan I, Tamura T, et al. Postmitotic osteoclast precursors are mononuclear cells which express macrophage-associated phenotypes. *Dev Biol*. 1994 May;163(1):212–21.

23. Jacome-Galarza CE, Lee S-K, Lorenzo JA, Aguila HL. Identification, characterization, and isolation of a common progenitor for osteoclasts, macrophages, and dendritic cells from murine bone marrow and periphery. *J Bone Miner Res.* 2013 May;28(5):1203–13.
24. Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, et al. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature.* 1990 May 31;345(6274):442–4.
25. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature.* 1999 Jan 28;397(6717):315–23.
26. Lakkakorpi PT, Väänänen HK. Kinetics of the osteoclast cytoskeleton during the resorption cycle in vitro. *J Bone Miner Res.* 1991 Aug;6(8):817–26.
27. Nakamura I, Takahashi N, Sasaki T, Jimi E, Kurokawa T, Suda T. Chemical and physical properties of the extracellular matrix are required for the actin ring formation in osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 1996 Dec;11(12):1873–9.
28. Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science.* 1989 Aug 25;245(4920):855–7.
29. Väänänen HK, Karhukorpi EK, Sundquist K, Wallmark B, Roininen I, Hentunen T, et al. Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H(+)-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts. *J Cell Biol.* 1990 Sep;111(3):1305–11.
30. Hayman a. R, Bune a. J, Bradley JR, Rashbass J, Cox TM. Osteoclastic Tartrate-resistant Acid Phosphatase (Acp 5): Its Localization to Dendritic Cells

and Diverse Murine Tissues. *J Histochem Cytochem.* 2000 Feb 1;48(2):219–27.

31. Darden AG, Ries WL, Wolf WC, Rodriguiz RM, Key LL. Osteoclastic superoxide production and bone resorption: stimulation and inhibition by modulators of NADPH oxidase. *J Bone Miner Res.* 1996 May;11(5):671–5.
32. Andersen TL, del Carmen Ovejero M, Kirkegaard T, Lenhard T, Foged NT, Delaissé J-M. A scrutiny of matrix metalloproteinases in osteoclasts: evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by other cells. *Bone.* 2004 Nov;35(5):1107–19.
33. Troen BR. The role of cathepsin K in normal bone resorption. *Drug News Perspect.* 17(1):19–28.
34. Goto T, Yamaza T, Tanaka T. Cathepsins in the osteoclast. *J Electron Microsc (Tokyo).* 2003 Jan;52(6):551–8.
35. Gowen M, Lazner F, Dodds R, Kapadia R, Feild J, Tavarria M, et al. Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization. *J Bone Miner Res.* 1999 Oct;14(10):1654–63.
36. Holliday LS, Welgus HG, Fliszar CJ, Veith GM, Jeffrey JJ, Gluck SL. Initiation of Osteoclast Bone Resorption by Interstitial Collagenase. *J Biol Chem.* 1997 Aug 29;272(35):22053–8.
37. Yamamoto Y, Noguchi T, Takahashi N. [Effects of calcitonin on osteoclast]. *Clin Calcium.* 2005 Mar;15(3):147–51.
38. Granholm S, Lundberg P, Lerner UH. Calcitonin inhibits osteoclast formation in mouse haematopoietic cells independently of transcriptional regulation by

- receptor activator of NF- κ B and c-Fms. *J Endocrinol.* 2007 Dec;195(3g):415–27.
39. Marzia M, Chiusaroli R, Neff L, Kim N-Y, Chishti AH, Baron R, et al. Calpain is required for normal osteoclast function and is down-regulated by calcitonin. *J Biol Chem.* 2006 Apr 7;281(14):9745–54.
 40. Nakamura I, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Suda T. Regulation of osteoclast function. *Mod Rheumatol.* 2012 Apr;22(2):167–77.
 41. Mutsaers AJ, Walkley CR. Cells of origin in osteosarcoma: mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells? *Bone.* 2014 May;62:56–63.
 42. Nakashima K, de Crombrughe B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet. Elsevier;* 2003 Aug 8;19(8):458–66.
 43. Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Jan;36(1):1–8.
 44. Islam A, Glomski C, Henderson ES. Bone lining (endosteal) cells and hematopoiesis: a light microscopic study of normal and pathologic human bone marrow in plastic-embedded sections. *Anat Rec.* 1990 Jul;227(3):300–6.
 45. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell.* 2008 Feb 22;132(4):631–44.
 46. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science.* 1996 Jul 12;273(5272):242–5.

47. Morita Y, Iseki A, Okamura S, Suzuki S, Nakauchi H, Ema H. Functional characterization of hematopoietic stem cells in the spleen. *Exp Hematol.* Elsevier; 2011 Mar 1;39(3):351–9.e3.
48. Matsuoka S, Ebihara Y, Xu M, Ishii T, Sugiyama D, Yoshino H, et al. CD34 expression on long-term repopulating hematopoietic stem cells changes during developmental stages. *Blood.* 2001 Jan 15;97(2):419–25.
49. Recio MJ, Moreno-Pelayo MA, Kilic SS, Guardo AC, Sanal O, Allende LM, et al. Differential Biological Role of CD3 Chains Revealed by Human Immunodeficiencies. *J Immunol.* American Association of Immunologists; 2007 Feb 2;178(4):2556–64.
50. Cherukuri A, Cheng PC, Pierce SK. The role of the CD19/CD21 complex in B cell processing and presentation of complement-tagged antigens. *J Immunol.* 2001 Jul 1;167(1):163–72.
51. Fleming TJ, Fleming ML, Malek TR. Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol.* 1993 Sep 1;151(5):2399–408.
52. Rose S, Misharin A, Perlman H. A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment. *Cytometry A.* 2012 Apr;81(4):343–50.
53. Kina T, Ikuta K, Takayama E, Wada K, Majumdar S, Weissman IL, et al. The monoclonal antibody TER-119 recognizes a molecule associated with glycophorin A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage. *Br J Haematol.* 2000 May;109(2):280–7.

54. Ross GD. Role of the lectin domain of Mac-1/CR3 (CD11b/CD18) in regulating intercellular adhesion. *Immunol Res.* 2002 Jan;25(3):219–27.
55. Coffman RL, Weissman IL. B220: a B cell-specific member of the T200 glycoprotein family. *Nature.* 1981 Feb 19;289(5799):681–3.
56. Renno T, Attinger A, Rimoldi D, Hahne M, Tschopp J, MacDonald HR. Expression of B220 on activated T cell blasts precedes apoptosis. *Eur J Immunol.* 1998 Feb;28(2):540–7.
57. Blasius AL, Barchet W, Cella M, Colonna M. Development and function of murine B220+CD11c+NK1.1+ cells identify them as a subset of NK cells. *J Exp Med.* 2007 Oct 29;204(11):2561–8.
58. Lyman SD, Jacobsen SE. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood.* 1998 Feb 15;91(4):1101–34.
59. Holmes C, Stanford WL. Concise review: stem cell antigen-1: expression, function, and enigma. *Stem Cells.* 2007 Jun;25(6):1339–47.
60. Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 16;96(6):3120–5.
61. Bradford GB, Williams B, Rossi R, Bertoncello I. Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment. *Exp Hematol.* 1997 May;25(5):445–53.
62. Jordan CT, Lemischka IR. Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. *Genes Dev.* 1990 Feb;4(2):220–32.

63. Yang L, Bryder D, Adolfsson J, Nygren J, Månsson R, Sigvardsson M, et al. Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2717-23.
64. Christensen JL, Weissman IL. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Dec 4;98(25):14541-6.
65. Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, et al. Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell*. 2005 Apr 22;121(2):295-306.
66. Wilson A, Murphy MJ, Oskarsson T, Kaloulis K, Bettess MD, Oser GM, et al. c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. 2004;2747-63.
67. Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J, Aguila HL. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood*. 2004 May 1;103(9):3258-64.
68. Nakamura Y, Arai F, Iwasaki H, Hosokawa K, Kobayashi I, Gomei Y, et al. Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells. *Blood*. American Society of Hematology; 2010 Sep 2;116(9):1422-32.
69. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. 2003;841-6.

70. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Harris S, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *2003;425(October):0–5.*
71. Arai F, Hosokawa K, Toyama H, Matsumoto Y, Suda T. Role of N-cadherin in the regulation of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Aug;1266:72–7.
72. Haug JS, He XC, Grindley JC, Wunderlich JP, Gaudenz K, Ross JT, et al. N-cadherin expression level distinguishes reserved versus primed states of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2008 Apr 10;2(4):367–79.
73. Wilson A, Oser GM, Jaworski M, Blanco-Bose WE, Laurenti E, Adolphe C, et al. Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Jun;1106:64–75.
74. Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Takubo K, Nakamura Y, et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell.* 2007 Dec 13;1(6):685–97.
75. Yilmaz OH, Kiel MJ, Morrison SJ. SLAM family markers are conserved among hematopoietic stem cells from old and reconstituted mice and markedly increase their purity. *Blood.* 2006 Feb 1;107(3):924–30.
76. Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, Hangoc G, Cooper S, Plett PA, et al. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med.* 2005 Apr 18;201(8):1307–18.

77. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. Elsevier; 2006 Dec 12;25(6):977–88.
78. Dar A, Kollet O, Lapidot T. Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice. *Exp Hematol*. 2006 Aug;34(8):967–75.
79. Wright DE. Hematopoietic Stem Cells Are Uniquely Selective in Their Migratory Response to Chemokines. *J Exp Med*. 2002 May 2;195(9):1145–54.
80. Hattori K. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*. 2001 Jun 1;97(11):3354–60.
81. Broxmeyer HE, Kohli L, Kim CH, Lee Y, Mantel C, Cooper S, et al. Stromal cell-derived factor-1 / CXCL12 directly enhances survival / antiapoptosis of myeloid progenitor cells through CXCR4 and G_i proteins and enhances engraftment of competitive , repopulating stem cells. 2003;73(May).
82. Nie Y, Han Y-C, Zou Y-R. CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J Exp Med*. 2008 Apr 14;205(4):777–83.
83. Miyazawa K, Williams D a, Gotoh a, Nishimaki J, Broxmeyer HE, Toyama K. Membrane-bound Steel factor induces more persistent tyrosine kinase activation and longer life span of c-kit gene-encoded protein than its soluble form. *Blood*. 1995 Feb 1;85(3):641–9.

84. Li C, Johnson G. Stem cell factor enhances the survival but not the self-renewal of murine hematopoietic long-term repopulating cells. *Blood*. 1994 Jul 15;84(2):408–14.
85. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*. 2012 Jan 26;481(7382):457–62.
86. Pruijt JF, Fibbe WE, Laterveer L, Pieters RA, Lindley IJ, Paemen L, et al. Prevention of interleukin-8-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by inhibitory antibodies against the metalloproteinase gelatinase B (MMP-9). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 14;96(19):10863–8.
87. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002 May 31;109(5):625–37.
88. Laterveer L, Lindley IJ, Hamilton MS, Willemze R, Fibbe WE. Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability. *Blood*. 1995 Apr 15;85(8):2269–75.
89. Rothe L, Collin-Osdoby P, Chen Y, Sunyer T, Chaudhary L, Tsay A, et al. Human osteoclasts and osteoclast-like cells synthesize and release high basal and inflammatory stimulated levels of the potent chemokine interleukin-8. *Endocrinology*. 1998 Oct;139(10):4353–63.
90. Mollee P, Pereira D, Nagy T, Song K, Saragosa R, Keating A, et al. Cyclophosphamide, etoposide and G-CSF to mobilize peripheral blood stem

cells for autologous stem cell transplantation in patients with lymphoma. *Bone Marrow Transplant.* 2002 Sep;30(5):273-8.

91. Morrison SJ, Wright DE, Weissman IL. Cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor induces hematopoietic stem cells to proliferate prior to mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Mar 4;94(5):1908-13.
92. Chaisiripoomkere W, Jootar S, Ungkanont A. Effect of G-CSF on peripheral blood progenitor cell mobilization and collection from healthy donors. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2001 Sep;19(3):183-90.
93. Gianni AM, Siena S, Bregni M, Tarella C, Stern AC, Pileri A, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating haemopoietic stem cells for autotransplantation. *Lancet.* 1989 Sep 9;2(8663):580-5.
94. Fibbe WE, Hamilton MS, Laterveer LL, Kibbelaar RE, Falkenburg JH, Visser JW, et al. Sustained engraftment of mice transplanted with IL-1-primed blood-derived stem cells. *J Immunol.* 1992 Jan 15;148(2):417-21.
95. Dale DC, Liles WC, Summer WR, Nelson S. Review: granulocyte colony-stimulating factor--role and relationships in infectious diseases. *J Infect Dis.* 1995 Oct;172(4):1061-75.
96. Liu F, Poursine-Laurent J, Link DC. Expression of the G-CSF receptor on hematopoietic progenitor cells is not required for their mobilization by G-CSF. *Blood.* 2000 May 15;95(10):3025-31.
97. Takamatsu Y, Simmons PJ, Moore RJ, Morris HA, To LB, Lévesque JP. Osteoclast-mediated bone resorption is stimulated during short-term administration of granulocyte colony-stimulating factor but is not responsible

- for hematopoietic progenitor cell mobilization. *Blood*. 1998 Nov 1;92(9):3465–73.
98. Watanabe T, Suzuya H, Onishi T, Kanai S, Kaneko M, Watanabe H, et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on bone metabolism during peripheral blood stem cell mobilization. *Int J Hematol*. 2003 Jan;77(1):75–81.
99. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Mar;8(3):221–33.
100. Valenzuela-Fernández A, Planchenault T, Baleux F, Staropoli I, Le-Barillec K, Leduc D, et al. Leukocyte elastase negatively regulates Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 binding and functions by amino-terminal processing of SDF-1 and CXCR4. *J Biol Chem*. 2002 May 3;277(18):15677–89.
101. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol*. 2002 Sep;30(9):973–81.
102. Lévesque J-P, Hendy J, Winkler IG, Takamatsu Y, Simmons PJ. Granulocyte colony-stimulating factor induces the release in the bone marrow of proteases that cleave c-KIT receptor (CD117) from the surface of hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*. 2003 Feb;31(2):109–17.
103. Breimer LH, MacIntyre I, Zaidi M. Peptides from the calcitonin genes: molecular genetics, structure and function. *Biochem J*. 1988 Oct 15;255(2):377–90.
104. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *Int J Exp Pathol*. 2000 Dec;81(6):405–22.

105. COPP DH, CAMERON EC, CHENEY BA, DAVIDSON AG, HENZE KG. Evidence for calcitonin--a new hormone from the parathyroid that lowers blood calcium. *Endocrinology*. 1962 May;70:638-49.
106. Warshawsky H, Goltzman D, Rouleau MF, Bergeron JJ. Direct in vivo demonstration by radioautography of specific binding sites for calcitonin in skeletal and renal tissues of the rat. *J Cell Biol*. 1980 Jun;85(3):682-94.
107. Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, et al. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature*. 304(5922):129-35.
108. Ogawa A, Harris V, McCorkle SK, Unger RH, Luskey KL. Amylin secretion from the rat pancreas and its selective loss after streptozotocin treatment. *J Clin Invest*. 1990 Mar;85(3):973-6.
109. Hinson JP, Kapas S, Smith DM. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev*. 2000 Apr;21(2):138-67.
110. Hong Y, Hay DL, Quirion R, Poyner DR. The pharmacology of adrenomedullin 2/intermedin. *Br J Pharmacol*. 2012 May;166(1):110-20.
111. Chang CP, Pearse R V, O'Connell S, Rosenfeld MG. Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotropin-releasing factor and sauvagine in mammalian brain. *Neuron*. 1993 Dec;11(6):1187-95.
112. Muff R, Bühlmann N, Fischer JA, Born W. An amylin receptor is revealed following co-transfection of a calcitonin receptor with receptor activity modifying proteins-1 or -3. *Endocrinology*. 1999 Jun;140(6):2924-7.

113. Njuki F, Nicholl CG, Howard A, Mak JC, Barnes PJ, Girgis SI, et al. A new calcitonin-receptor-like sequence in rat pulmonary blood vessels. *Clin Sci (Lond)*. 1993 Oct;85(4):385–8.
114. Granholm S, Lundberg P, Lerner UH. Expression of the calcitonin receptor, calcitonin receptor-like receptor, and receptor activity modifying proteins during osteoclast differentiation. *J Cell Biochem*. 2008 Jun 1;104(3):920–33.
115. Perry KJ, Quiza M, Myers DE, Morfis M, Christopoulos G, Sexton PM. Characterization of amylin and calcitonin receptor binding in the mouse alpha-thyroid-stimulating hormone thyrotroph cell line. *Endocrinology*. 1997 Aug;138(8):3486–96.
116. Lerner UH. Deletions of genes encoding calcitonin/alpha-CGRP, amylin and calcitonin receptor have given new and unexpected insights into the function of calcitonin receptors and calcitonin receptor-like receptors in bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 6(1):87–95.
117. Naot D, Callon KE, Grey A, Cooper GJ, Reid IR, Cornish J. A potential role for adrenomedullin as a local regulator of bone growth. *Endocrinology*. 2001 May;142(5):1849–57.
118. Overman RA, Borse M, Gourlay ML. Salmon calcitonin use and associated cancer risk. *Ann Pharmacother*. SAGE Publications; 2013 Dec 1;47(12):1675–84.
119. Henriksen K, Bay-Jensen A-C, Christiansen C, Karsdal MA. Oral salmon calcitonin--pharmacology in osteoporosis. *Expert Opin Biol Ther*. 2010 Nov;10(11):1617–29.

120. Sachs L. The molecular control of blood cell development. *Science*. 1987 Dec 4;238(4832):1374-9.
121. Lichtman MA, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Joseph T. Williams Hematology, 8th edition (2010).
122. Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development*. 1999 Nov;126(22):5073-84.
123. Pantel K, Loeffler M, Bungart B, Wichmann HE. A mathematical model of erythropoiesis in mice and rats. Part 4: Differences between bone marrow and spleen. *Cell Tissue Kinet*. 1990 Jul;23(4):283-97.
124. Gregory CJ, Eaves C. Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood*. 1978 Mar;51(3):527-37.
125. Heath DS, Axelrad AA, McLeod DL, Shreeve MM. Separation of the erythropoietin-responsive progenitors BFU-E and CFU-E in mouse bone marrow by unit gravity sedimentation. *Blood*. 1976 May;47(5):777-92.
126. Stephenson JR, Axelrad AA, McLeod DL, Shreeve MM. Induction of colonies of hemoglobin-synthesizing cells by erythropoietin in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Jul;68(7):1542-6.
127. Gifford SC, Derganc J, Shevkoplyas SS, Yoshida T, Bitensky MW. A detailed study of time-dependent changes in human red blood cells: from reticulocyte maturation to erythrocyte senescence. *Br J Haematol*. 2006 Nov;135(3):395-404.

128. Chambellan A, Coulon S, Cavailles A, Hermine O, Similowski T. [COPD and erythropoiesis: interactions and consequences]. *Rev Mal Respir.* 2012 Feb;29(2):213–31.
129. Dzierzak E, Philipsen S. Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 Apr;3(4):a011601.
130. Marsee DK, Pinkus GS, Yu H. CD71 (transferrin receptor): an effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol.* 2010 Sep;134(3):429–35.
131. Liu Y, Pop R, Sadegh C, Brugnara C, Haase VH, Socolovsky M. Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. *Blood.* 2006 Jul 1;108(1):123–33.
132. Bachmann S, Le Hir M, Eckardt KU. Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin. *J Histochem Cytochem.* 1993 Mar;41(3):335–41.
133. Maxwell PH, Osmond MK, Pugh CW, Heryet A, Nicholls LG, Tan CC, et al. Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int.* 1993 Nov;44(5):1149–62.
134. Gyabaah K, Aboushwareb T, Guimaraes Souza N, Yamaleyeva L, Varner A, Wang H-J, et al. Controlled regulation of erythropoietin by primary cultured renal cells for renal failure induced anemia. *J Urol.* 2012 Nov;188(5):2000–6.
135. Wang GL, Semenza GL. Molecular basis of hypoxia-induced erythropoietin expression. *Curr Opin Hematol.* 1996 Mar;3(2):156–62.

136. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*. Elsevier; 1995 Oct 6;83(1):59–67.
137. Richmond TD, Chohan M, Barber DL. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol*. 2005 Mar;15(3):146–55.
138. Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell*. 1993 Jul 30;74(2):227–36.
139. Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, Brugnara C, Lodish HF. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}Stat5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell*. 1999 Jul 23;98(2):181–91.
140. Zhao W, Kitidis C, Fleming MD, Lodish HF, Ghaffari S. Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Blood*. 2006 Feb 1;107(3):907–15.
141. Bao H, Jacobs-Helber SM, Lawson AE, Penta K, Wickrema A, Sawyer ST. Protein kinase B (c-Akt), phosphatidylinositol 3-kinase, and STAT5 are activated by erythropoietin (EPO) in HCD57 erythroid cells but are constitutively active in an EPO-independent, apoptosis-resistant subclone (HCD57-SREI cells). *Blood*. 1999 Jun 1;93(11):3757–73.
142. Menon MP, Karur V, Bogacheva O, Bogachev O, Cuetara B, Wojchowski DM. Signals for stress erythropoiesis are integrated via an erythropoietin receptor-phosphotyrosine-343-Stat5 axis. *J Clin Invest*. 2006 Mar;116(3):683–94.

143. Klingmüller U, Wu H, Hsiao JG, Toker A, Duckworth BC, Cantley LC, et al. Identification of a novel pathway important for proliferation and differentiation of primary erythroid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 1;94(7):3016–21.
144. Gregory T, Yu C, Ma A, Orkin SH, Blobel GA, Weiss MJ. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood*. 1999 Jul 1;94(1):87–96.
145. Kadri Z, Maouche-Chretien L, Rooke HM, Orkin SH, Romeo P-H, Mayeux P, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt induced by erythropoietin renders the erythroid differentiation factor GATA-1 competent for TIMP-1 gene transactivation. *Mol Cell Biol*. 2005 Sep;25(17):7412–22.
146. Suzuki M, Moriguchi T, Ohneda K, Yamamoto M. Differential contribution of the Gata1 gene hematopoietic enhancer to erythroid differentiation. *Mol Cell Biol*. 2009 Mar;29(5):1163–75.
147. Brunet A, Bonni A, Zigmund MJ, Lin MZ, Joo P, Hu LS, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999 Mar 19;96(6):857–68.
148. Kashii Y, Uchida M, Kirito K, Tanaka M, Nishijima K, Toshima M, et al. A member of Forkhead family transcription factor, FKHL1, is one of the downstream molecules of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt activation pathway in erythropoietin signal transduction. *Blood*. 2000 Aug 1;96(3):941–9.
149. Maiese K, Hou J, Chong ZZ, Shang YC. Erythropoietin, forkhead proteins, and oxidative injury: biomarkers and biology. *ScientificWorldJournal*. 2009 Jan;9:1072–104.

150. Ghaffari S, Jagani Z, Kitidis C, Lodish HF, Khosravi-Far R. Cytokines and BCR-ABL mediate suppression of TRAIL-induced apoptosis through inhibition of forkhead FOXO3a transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 27;100(11):6523–8.
151. Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol*. 2000 Oct 5;10(19):1201–4.
152. Bakker WJ, Blázquez-Domingo M, Kolbus A, Besooyen J, Steinlein P, Beug H, et al. FoxO3a regulates erythroid differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyl transferase 1. *J Cell Biol*. 2004 Jan 19;164(2):175–84.
153. Bogdanova A, Mihov D, Lutz H, Saam B, Gassmann M, Vogel J. Enhanced erythro-phagocytosis in polycythemic mice overexpressing erythropoietin. *Blood*. 2007 Jul 15;110(2):762–9.
154. Wang S, Dale GL, Song P, Viollet B, Zou M-H. AMPK α 1 deletion shortens erythrocyte life span in mice: role of oxidative stress. *J Biol Chem*. 2010 Jun 25;285(26):19976–85.
155. Winterbourn CC. Oxidative reactions of hemoglobin. *Methods Enzymol*. 1990 Jan;186:265–72.
156. Socolovsky M. Molecular insights into stress erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*. 2007 May;14(3):215–24.
157. Wojchowski DM, Menon MP, Sathyanarayana P, Fang J, Karur V, Houde E, et al. Erythropoietin-dependent erythropoiesis: New insights and questions. *Blood Cells Mol Dis*. 2006 Jan;36(2):232–8.

158. Richmond TD, Chohan M, Barber DL. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol. Elsevier*; 2005 Mar 3;15(3):146–55.
159. Socolovsky M, Murrell M, Liu Y, Pop R, Porpiglia E, Levchenko A. Negative autoregulation by FAS mediates robust fetal erythropoiesis. Aitchison JD, editor. *PLoS Biol. Public Library of Science*; 2007 Oct;5(10):e252.
160. Zhao G-Q. Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *Genesis*. 2003 Jan;35(1):43–56.
161. Detmer K, Thompson AJ, Garner RE, Walker AN, Gaffield W, Dannawi H. Hedgehog signaling and cell cycle control in differentiating erythroid progenitors. *Blood Cells Mol Dis*. 2005;34(1):60–70.
162. Cridland SO, Keys JR, Papathanasiou P, Perkins AC. Indian hedgehog supports definitive erythropoiesis. *Blood Cells Mol Dis*. 2009 Jan;43(2):149–55.
163. Lau C, Outram S V, Saldaña JI, Furmanski AL, Dessens JT, Crompton T. Regulation of murine normal and stress-induced erythropoiesis by Desert Hedgehog. *Blood*. 2012 May 17;119(20):4741–51.
164. Perry JM, Harandi OF, Paulson RF. BMP4, SCF, and hypoxia cooperatively regulate the expansion of murine stress erythroid progenitors. *Blood*. 2007 May 15;109(10):4494–502.
165. Wu D-C, Paulson RF. Hypoxia regulates BMP4 expression in the murine spleen during the recovery from acute anemia. Polymenis M, editor. *PLoS One. Public Library of Science*; 2010 Jan;5(6):e11303.

166. Harandi OF, Hedge S, Wu D-C, McKeone D, Paulson RF. Murine erythroid short-term radioprotection requires a BMP4-dependent, self-renewing population of stress erythroid progenitors. *J Clin Invest.* 2010 Dec;120(12):4507–19.
167. Paulson RF, Shi L, Wu D-C. Stress erythropoiesis: new signals and new stress progenitor cells. *Curr Opin Hematol.* 2011 May;18(3):139–45.
168. WHO. World Malaria Report 2013. 2013 Aug.
169. Hunt NH, Grau GE. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol.* 2003 Sep;24(9):491–9.
170. Kwiatkowski D, Bate CA, Scragg IG, Beattie P, Udalova I, Knight JC. The malarial fever response—pathogenesis, polymorphism and prospects for intervention. *Ann Trop Med Parasitol.* 1997 Jul;91(5):533–42.
171. Kantele A, Jokiranta TS. Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, *Plasmodium knowlesi*. *Clin Infect Dis.* 2011 Jun 1;52(11):1356–62.
172. Buffet PA, Safeukui I, Deplaine G, Brousse V, Prendki V, Thellier M, et al. The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood.* 2011 Jan 13;117(2):381–92.
173. Kooij TWA, Janse CJ, Waters AP. *Plasmodium* post-genomics: better the bug you know? *Nat Rev Microbiol.* Nature Publishing Group; 2006 May 3;4(5):344–57.
174. Scherf A, Lopez-Rubio JJ, Riviere L. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol.* 2008 Jan;62:445–70.

175. Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol*. 2004 Mar;4(3):169–80.
176. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. Nature Publishing Group; 2002 Feb 7;415(6872):673–9.
177. Taylor-Robinson AW. Regulation of immunity to malaria: valuable lessons learned from murine models. *Parasitol Today*. 1995 Sep;11(9):334–42.
178. Fortin A. Susceptibility to malaria as a complex trait: big pressure from a tiny creature. *Hum Mol Genet*. 2002 Oct 1;11(20):2469–78.
179. Langhorne J, Quin SJ, Sanni LA. Mouse models of blood-stage malaria infections: immune responses and cytokines involved in protection and pathology. *Chem Immunol*. 2002 Jan;80:204–28.
180. Black CG, Wang L, Hibbs AR, Werner E, Coppel RL. Identification of the *Plasmodium chabaudi* homologue of merozoite surface proteins 4 and 5 of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*. 1999 May;67(5):2075–81.
181. Jambou R, El-Assaad F, Combes V, Grau GE. In vitro culture of *Plasmodium berghei*-ANKA maintains infectivity of mouse erythrocytes inducing cerebral malaria. *Malar J*. 2011 Jan;10(1):346.
182. Adovelande J, Schrével J. Carboxylic ionophores in malaria chemotherapy: the effects of monensin and nigericin on *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium vinckei petteri* in vivo. *Life Sci*. 1996 Jan;59(20):PL309–15.
183. Dalko E, Gaudreault V, Sanchez Dardon J, Moreau R, Scorza T. Preconditioning with hemin decreases *Plasmodium chabaudi* adami parasitemia and inhibits erythropoiesis in BALB/c mice. *PLoS One*. Public Library of Science; 2013 Jan 24;8(1):e54744.

184. Franklin BS, Parroche P, Ataíde MA, Lauw F, Ropert C, de Oliveira RB, et al. Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Apr 7;106(14):5789–94.
185. Miller JL, Sack BK, Baldwin M, Vaughan AM, Kappe SHI. Interferon-mediated innate immune responses against malaria parasite liver stages. *Cell Rep*. The Authors; 2014 Apr 24;7(2):436–47.
186. Azcárate IG, Marín-García P, Kamali AN, Pérez-Benavente S, Puyet A, Diez A, et al. Differential immune response associated to malaria outcome is detectable in peripheral blood following *Plasmodium yoelii* infection in mice. *PLoS One*. 2014 Jan;9(1):e85664.
187. Baccarella A, Fontana MF, Chen EC, Kim CC. Toll-like receptor 7 mediates early innate immune responses to malaria. *Infect Immun*. 2013 Dec;81(12):4431–42.
188. Schwenk R, Banania G, Epstein J, Kim Y, Peters B, Belmonte M, et al. Ex vivo tetramer staining and cell surface phenotyping for early activation markers CD38 and HLA-DR to enumerate and characterize malaria antigen-specific CD8+ T-cells induced in human volunteers immunized with a *Plasmodium falciparum* adenovirus-vectored . *Malar J*. 2013 Jan;12(1):376.
189. Quin SJ, Seixas EM, Cross CA, Berg M, Lindo V, Stockinger B, et al. Low CD4(+) T cell responses to the C-terminal region of the malaria merozoite surface protein-1 may be attributed to processing within distinct MHC class II pathways. *Eur J Immunol*. 2001 Jan;31(1):72–81.
190. Mota MM, Brown KN, Holder AA, Jarra W. Acute *Plasmodium chabaudi chabaudi* malaria infection induces antibodies which bind to the surfaces of

- parasitized erythrocytes and promote their phagocytosis by macrophages in vitro. *Infect Immun.* 1998 Sep;66(9):4080–6.
191. Malaguarnera L, Musumeci S. The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet Infect Dis.* 2002 Aug;2(8):472–8.
192. Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, Waltenbaugh C. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc Natl Acad Sci.* 1998 Mar 17;95(6):3071–6.
193. Stevenson MM, Su Z, Sam H, Mohan K. Modulation of host responses to blood-stage malaria by interleukin-12: from therapy to adjuvant activity. *Microbes Infect.* 2001 Jan;3(1):49–59.
194. Ing R, Stevenson MM. Dendritic cell and NK cell reciprocal cross talk promotes gamma interferon-dependent immunity to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection in mice. *Infect Immun.* 2009 Feb 1;77(2):770–82.
195. Doolan DL, Hoffman SL. IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8+ T cells in the *Plasmodium yoelii* model. *J Immunol.* 1999 Jul 15;163(2):884–92.
196. Chizzolini C, Grau GE, Geinoz A, Schrijvers D. T lymphocyte interferon-gamma production induced by *Plasmodium falciparum* antigen is high in recently infected non-immune and low in immune subjects. *Clin Exp Immunol.* 1990 Jan;79(1):95–9.
197. Horowitz A, Newman KC, Evans JH, Korbel DS, Davis DM, Riley EM. Cross-talk between T cells and NK cells generates rapid effector responses to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol.* American Association of Immunologists; 2010 Jun 1;184(11):6043–52.

198. Kimura D, Miyakoda M, Honma K, Shibata Y, Yuda M, Chinzei Y, et al. Production of IFN- γ by CD4(+) T cells in response to malaria antigens is IL-2 dependent. *Int Immunol*. 2010 Dec 1;22(12):941–52.
199. Su Z, Stevenson MM. IL-12 Is Required for Antibody-Mediated Protective Immunity Against Blood-Stage *Plasmodium chabaudi* AS Malaria Infection in Mice. *J Immunol*. 2002 Feb 1;168(3):1348–55.
200. Taylor-Robinson AW, Smith EC. Modulation of experimental blood stage malaria through blockade of the B7/CD28 T-cell costimulatory pathway. *Immunology*. 1999 Mar;96(3):498–504.
201. Taylor-Robinson AW, Phillips RS. Functional characterization of protective CD4+ T-cell clones reactive to the murine malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *Immunology*. 1992 Sep;77(1):99–105.
202. Omer FM, de Souza JB, Riley EM. Differential Induction of TGF- Regulates Proinflammatory Cytokine Production and Determines the Outcome of Lethal and Nonlethal *Plasmodium yoelii* Infections. *J Immunol*. American Association of Immunologists; 2003 Nov 7;171(10):5430–6.
203. Moxon CA, Grau GE, Craig AG. Malaria: modification of the red blood cell and consequences in the human host. *Br J Haematol*. Wiley-Blackwell; 2011 Sep 1;154(6):670–9.
204. Helegbe GK, Huy NT, Yanagi T, Shuaibu MN, Yamazaki A, Kikuchi M, et al. Rate of red blood cell destruction varies in different strains of mice infected with *Plasmodium berghei*-ANKA after chronic exposure. *Malaria Journal*. BioMed Central Ltd; 2009. p. 91.

205. Silver KL, Higgins SJ, McDonald CR, Kain KC. Complement driven innate immune response to malaria: fuelling severe malarial diseases. *Cell Microbiol.* 2010 Aug;12(8):1036–45.
206. Fernandez-Arias C, Lopez JP, Hernandez-Perez JN, Bautista-Ojeda MD, Branch O, Rodriguez A. Malaria inhibits surface expression of complement receptor 1 in monocytes/macrophages, causing decreased immune complex internalization. *J Immunol.* 2013 May 1;190(7):3363–72.
207. Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas A-M, Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol.* Nature Publishing Group; 2008 Jul 1;9(7):725–32.
208. A E Tebo PGKAJFL. Fc γ receptor-mediated phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in vitro. *Clinical and Experimental Immunology.* Wiley-Blackwell; 2002. p. 300.
209. Erdman LK, Cosio G, Helmers AJ, Gowda DC, Grinstein S, Kain KC. CD36 and TLR interactions in inflammation and phagocytosis: implications for malaria. *J Immunol.* 2009 Nov 15;183(10):6452–9.
210. Patel SN, Serghides L, Smith TG, Febbraio M, Silverstein RL, Kurtz TW, et al. CD36 mediates the phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by rodent macrophages. *J Infect Dis.* 2004 Jan 15;189(2):204–13.
211. Gowda DC. TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. *Trends Parasitol.* 2007 Dec;23(12):596–604.
212. Nebl T, De Veer MJ, Schofield L. Stimulation of innate immune responses by malarial glycosylphosphatidylinositol via pattern recognition receptors. *Parasitology.* 2005 Jan;130 Suppl:S45–62.

213. Couper KN, Barnes T, Hafalla JCR, Combes V, Ryffel B, Secher T, et al. Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. *PLoS Pathog.* 2010 Jan;6(1):e1000744.
214. Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, Visintin A, et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Feb 6;104(6):1919–24.
215. Dostert C, Guarda G, Romero JF, Menu P, Gross O, Tardivel A, et al. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. Unutmaz D, editor. *PLoS One. Public Library of Science*; 2009 Jan;4(8):e6510.
216. Chua CLL, Brown G, Hamilton JA, Rogerson S, Boeuf P. Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology? *Trends Parasitol. Elsevier*; 2013 Jan 1;29(1):26–34.
217. Kollet O, Dar A, Lapidot T. The multiple roles of osteoclasts in host defense: bone remodeling and hematopoietic stem cell mobilization. *Annu Rev Immunol.* 2007 Jan;25(October 2006):51–69.
218. Silvestri L, Nai A, Pagani A, Camaschella C. The extrahepatic role of TFR2 in iron homeostasis. *Front Pharmacol.* 2014 Jan;5:93.
219. Ramos P, Casu C, Gardenghi S, Breda L, Crielaard BJ, Guy E, et al. Macrophages support pathological erythropoiesis in polycythemia vera and β -thalassemia. *Nat Med. Nature Publishing Group*; 2013 Apr 17;19(4):437–45.

220. Al-Huniti NH, Widness JA, Schmidt RL, Veng-Pedersen P. Erythropoietin production rate in phlebotomy-induced acute anemia. *Biopharm Drug Dispos.* 2004 Dec;25(9):389–97.
221. Cadman ET, Abdallah AY, Voisine C, Sponaas A-M, Corran P, Lamb T, et al. Alterations of splenic architecture in malaria are induced independently of Toll-like receptors 2, 4, and 9 or MyD88 and may affect antibody affinity. *Infect Immun.* 2008 Sep 1;76(9):3924–31.
222. Lacey DC, Achuthan A, Fleetwood AJ, Dinh H, Roiniotis J, Scholz GM, et al. Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J Immunol.* 2012 Jul 1;188(11):5752–65.
223. Auffray C, Fogg DK, Narni-Mancinelli E, Senechal B, Trouillet C, Saederup N, et al. CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med.* 2009 Mar 16;206(3):595–606.
224. Suzu S, Hiyoshi M, Yoshidomi Y, Harada H, Takeya M, Kimura F, et al. M-CSF-mediated macrophage differentiation but not proliferation is correlated with increased and prolonged ERK activation. *J Cell Physiol.* 2007 Aug;212(2):519–25.
225. Grasset M-F, Gobert-Gosse S, Mouchiroud G, Bourette RP. Macrophage differentiation of myeloid progenitor cells in response to M-CSF is regulated by the dual-specificity phosphatase DUSP5. *J Leukoc Biol.* 2010 Jan 1;87(1):127–35.
226. Granholm S, Henning P, Lerner UH. Comparisons between the effects of calcitonin receptor-stimulating peptide and intermedin and other peptides in

the calcitonin family on bone resorption and osteoclastogenesis. *J Cell Biochem.* 2011 Nov;112(11):3300–12.

227. Karsdal M a, Sondergaard BC, Arnold M, Christiansen C. Calcitonin affects both bone and cartilage: a dual action treatment for osteoarthritis? *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Nov;1117:181–95.
228. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol.* Nature Publishing Group; 2011 Nov 19;12(11):1035–44.
229. Joos C, Marrama L, Polson HEJ, Corre S, Diatta A-M, Diouf B, et al. Clinical protection from falciparum malaria correlates with neutrophil respiratory bursts induced by merozoites opsonized with human serum antibodies. *PLoS One.* Public Library of Science; 2010 Jan 25;5(3):e9871.
230. Belyaev NN, Biró J, Langhorne J, Potocnik AJ. Extramedullary myelopoiesis in malaria depends on mobilization of myeloid-restricted progenitors by IFN- γ induced chemokines. Stevenson MM, editor. *PLoS Pathog.* Public Library of Science; 2013 Jan;9(6):e1003406.
231. Sponaas A-M, Freitas do Rosario AP, Voisine C, Mastelic B, Thompson J, Koernig S, et al. Migrating monocytes recruited to the spleen play an important role in control of blood stage malaria. *Blood.* 2009 Dec 24;114(27):5522–31.
232. Grun JL, Long CA, Weidanz WP. Effects of splenectomy on antibody-independent immunity to *Plasmodium chabaudi adami* malaria. *Infect Immun.* 1985 Jun;48(3):853–8.

233. Gross A, Geva S, Frankenburg S. *Plasmodium berghei*: lymphocyte and macrophage dynamics in the spleen of Balb/c mice in the course of infection and after rechallenge of cured mice. *Exp Parasitol*. 1988 Feb;65(1):50–60.
234. Stevenson MM, Ghadirian E, Phillips NC, Rae D, Podoba JE. Role of mononuclear phagocytes in elimination of *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Parasite Immunol*. 1989 Sep;11(5):529–44.
235. Cambos M, Scorza T. Robust erythrophagocytosis leads to macrophage apoptosis via a hemin-mediated redox imbalance: role in hemolytic disorders. *J Leukoc Biol*. 2011 Jan;89(1):159–71.
236. Bonig H, Priestley G V, Oehler V, Papayannopoulou T. Hematopoietic progenitor cells (HPC) from mobilized peripheral blood display enhanced migration and marrow homing compared to steady-state bone marrow HPC. *Exp Hematol*. 2007 Feb;35(2):326–34.
237. Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, Manarini S, Oldani E, Giovanelli S, et al. Neutrophil activation and hemostatic changes in healthy donors receiving granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 1999 Apr 15;93(8):2506–14.
238. Baldé AT, Sarthou JL, Roussilhon C. Acute *Plasmodium falciparum* infection is associated with increased percentages of apoptotic cells. *Immunol Lett*. 1995 May;46(1-2):59–62.
239. Helmbj H, Jönsson G, Troye-Blomberg M. Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. *Infect Immun*. 2000 Mar;68(3):1485–90.

240. Toure-Balde A, Sarthou JL, Aribot G, Michel P, Trape JF, Rogier C, et al. Plasmodium falciparum induces apoptosis in human mononuclear cells. *Infect Immun*. 1996 Mar;64(3):744–50.
241. Chow A, Lucas D, Hidalgo A, Méndez-Ferrer S, Hashimoto D, Scheiermann C, et al. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med*. 2011 Feb 14;208(2):261–71.
242. Winkler IG, Sims NA, Pettit AR, Barbier V, Nowlan B, Helwani F, et al. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood*. 2010 Dec 2;116(23):4815–28.
243. Artavanis-Tsakonas K, Riley EM. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Immunol*. 2002 Sep 15;169(6):2956–63.
244. Gao Y, Grassi F, Ryan MR, Terauchi M, Page K, Yang X, et al. IFN-gamma stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. *J Clin Invest*. 2007 Jan;117(1):122–32.
245. Varma TK, Lin CY, Toliver-Kinsky TE, Sherwood ER. Endotoxin-induced gamma interferon production: contributing cell types and key regulatory factors. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 May;9(3):530–43.
246. Stevenson MM, Tam MF, Belosevic M, van der Meide PH, Podoba JE. Role of endogenous gamma interferon in host response to infection with blood-stage Plasmodium chabaudi AS. *Infect Immun*. 1990 Oct;58(10):3225–32.

247. Riopel J, Tam M, Mohan K, Marino MW, Stevenson MM. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice have impaired resistance to blood-stage malaria. *Infect Immun*. 2001 Jan 1;69(1):129–36.
248. Elias RM, Sardinha LR, Bastos KRB, Zago CA, da Silva APF, Alvarez JM, et al. Role of CD28 in Polyclonal and Specific T and B Cell Responses Required for Protection against Blood Stage Malaria. *J Immunol*. American Association of Immunologists; 2005 Jan 5;174(2):790–9.
249. Asami M, Owhashi M, Abe T, Nawa Y. A comparative study of the kinetic changes of hemopoietic stem cells in mice infected with lethal and non-lethal malaria. *Int J Parasitol*. 1992 Feb;22(1):43–7.
250. Hermida FPD, Vieira DP, Fernandes ER, de Andrade HF. Wave expansion of CD34+ progenitor cells in the spleen in rodent malaria. *Exp Parasitol*. Elsevier Inc.; 2009 Mar;121(3):230–7.
251. Ramos P, Casu C, Gardenghi S, Breda L, Crielaard BJ, Guy E, et al. Macrophages support pathological erythropoiesis in polycythemia vera and β -thalassemia. *Nat Med*. Nature Publishing Group; 2013 Apr;19(4):437–45.
252. Grover A, Mancini E, Moore S, Mead AJ, Atkinson D, Rasmussen KD, et al. Erythropoietin guides multipotent hematopoietic progenitor cells toward an erythroid fate. *J Exp Med*. 2014 Feb 10;211(2):181–8.
253. Tsubata S, Ebe K, Kawamura T, Ishimoto Y, Tomiyama-Miyaji C, Watanabe H, et al. Protection against malaria by anti-erythropoietin antibody due to suppression of erythropoiesis in the liver and at other sites. *Immunol Cell Biol*. Nature Publishing Group; 2005 Dec 21;83(6):638–42.

254. Vogel J, Kiessling I, Heinicke K, Stallmach T, Ossent P, Vogel O, et al. Transgenic mice overexpressing erythropoietin adapt to excessive erythrocytosis by regulating blood viscosity. *Blood*. 2003 Sep 15;102(6):2278–84.
255. Lenox LE, Shi L, Hegde S, Paulson RF. Extramedullary erythropoiesis in the adult liver requires BMP-4/Smad5-dependent signaling. *Exp Hematol*. 2009 May;37(5):549–58.
256. Hernandez-Valladares M, Naessens J, Musoke AJ, Sekikawa K, Rihet P, Ole-Moiyoi OK, et al. Pathology of Tnf-deficient mice infected with *Plasmodium chabaudi adami* 408XZ. *Exp Parasitol*. 2006 Dec;114(4):271–8.
257. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 2013 Apr 18;38(4):792–804.
258. Malu DT, Bélanger B, Desautels F, Kelendji K, Dalko E, Sanchez-Dardon J, et al. Macrophage migration inhibitory factor: a downregulator of early T cell-dependent IFN-gamma responses in *Plasmodium chabaudi adami* (556 KA)-infected mice. *J Immunol*. 2011 Jun 1;186(11):6271–9.
259. Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science*. 2011 Jun 10;332(6035):1284–8.
260. De Back DZ, Kostova EB, van Kraaij M, van den Berg TK, van Bruggen R. Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Front Physiol*. 2014 Jan;5:9.

261. Beaumont K, Moore CX, Pittner RA, Prickett KS, Gaeta LS, Rink TJ, et al. Differential antagonism of amylin's metabolic and vascular actions with amylin receptor antagonists. *Can J Physiol Pharmacol*. 1995 Jul;73(7):1025–9.
262. Westermark P, Wernstedt C, Wilander E, Hayden DW, O'Brien TD, Johnson KH. Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Jun;84(11):3881–5.
263. Fu W, Ruangkittisakul A, MacTavish D, Shi JY, Ballanyi K, Jhamandas JH. Amyloid β (A β) peptide directly activates amylin-3 receptor subtype by triggering multiple intracellular signaling pathways. *J Biol Chem*. 2012 May 25;287(22):18820–30.
264. Potes CS, Boyle CN, Wookey PJ, Riediger T, Lutz TA. Involvement of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway in amylin's eating inhibitory effect. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012 Feb 1;302(3):R340–51.
265. Xaus J, Valledor a F, Cardó M, Marquès L, Beleta J, Palacios JM, et al. Adenosine inhibits macrophage colony-stimulating factor-dependent proliferation of macrophages through the induction of p27kip-1 expression. *J Immunol*. 1999 Oct 15;163(8):4140–9.
266. Muguruma Y, Lee MY. Isolation and characterization of murine clonogenic osteoclast progenitors by cell surface phenotype analysis. *Blood*. 1998 Feb 15;91(4):1272–9.
267. Miyamoto K, Yoshida S, Kawasumi M, Hashimoto K, Kimura T, Sato Y, et al. Osteoclasts are dispensable for hematopoietic stem cell maintenance and mobilization. *J Exp Med*. 2011 Oct 24;208(11):2175–81.

268. Mansour A, Abou-Ezzi G, Sitnicka E, Jacobsen SEW, Wakkach A, Blin-Wakkach C. Osteoclasts promote the formation of hematopoietic stem cell niches in the bone marrow. *J Exp Med*. 2012 Mar 12;209(3):537–49.
269. Shvitiel S, Kollet O, Lapid K, Schajnovitz A, Goichberg P, Kalinkovich A, et al. CD45 regulates retention, motility, and numbers of hematopoietic progenitors, and affects osteoclast remodeling of metaphyseal trabecules. *J Exp Med*. 2008 Sep 29;205(10):2381–95.