



**HAL**  
open science

# Modulation physiologique et physiopathologique de l'élimination érythrocytaire : nouveaux acteurs et implications transfusionnelles

Martin Colard

► **To cite this version:**

Martin Colard. Modulation physiologique et physiopathologique de l'élimination érythrocytaire : nouveaux acteurs et implications transfusionnelles. Hématologie. Université Paris Cité; Université libre de Bruxelles (1970-..). Faculté de médecine, 2019. Français. NNT : 2019UNIP5197 . tel-04338453

**HAL Id: tel-04338453**

**<https://theses.hal.science/tel-04338453>**

Submitted on 12 Dec 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Paris

Ecole doctorale : 561 : Hématologie, oncogénèse et biothérapies

Et

Université libre de Bruxelles

Faculté de Médecine

# **Modulation physiologique et physiopathologique de l'élimination érythrocytaire**

Nouveaux acteurs et implications transfusionnelles

Par Martin Colard

Thèse de doctorat d'Hématologie

Dirigée par Olivier Hermine et Samantha Benghiat

Présentée et soutenue publiquement le 9 octobre 2019

Devant un jury composé de :

Aguilar-Martinez, Patricia	PU-PH	Rapporteur
Garçon, Loïc	PU-PH	Rapporteur
Arlet, Jean-Benoît	PU-PH	Examineur
El Nemer, Wassim	CR	Examineur
Goriely, Stanislas	MR	Examineur
Amireault, Pascal	CR	Examineur





*Rechercher la Lumière, un jour peut-être trouver la clarté*

- Gaël Faye, *Tôt le matin*

*La pensée ne doit jamais se soumettre, ni à un dogme, ni à un parti, ni à une passion, ni à un intérêt, ni à une idée préconçue, ni à quoi que ce soit, si ce n'est aux faits eux-mêmes, parce que, pour elle, se soumettre, ce serait cesser d'être*

- Henri Poincaré (Fêtes du LXXVe anniversaire de l'ULB, 21 novembre 1909)



# Remerciements



## Table des matières

Remerciements .....	5
Index des figures .....	11
Index des tableaux.....	12
Liste des abréviations .....	13
Introduction.....	15
1. Anatomie et physiologie érythrocytaire.....	15
1.1 Membrane : structure, composition et interactions.....	15
1.1.1 Lipides.....	15
1.1.2 Protéines membranaires .....	17
1.1.2.1 Protéines transmembranaires.....	17
1.1.2.2 Protéines cytosquelettiques.....	20
1.1.3 Déterminants de la déformabilité érythrocytaire .....	21
1.2 Hémoglobine .....	22
1.3 Enzymes et métabolisme érythrocytaire.....	24
2. Production érythrocytaire et ses mécanismes de régulation .....	26
2.1 Érythropoïèse .....	26
2.2 Érythropoïétine .....	29
2.2.1 Sites de production.....	29
2.2.2 Régulation de la synthèse.....	29
2.2.3 Récepteurs et voies de signalisation .....	31
3. Métabolisme du fer .....	33
3.1 Absorption digestive.....	34
3.2 Fer et régulations du métabolisme .....	34
3.2.1 Régulation locale .....	34
3.2.2 Régulation systémique .....	35
3.3 Fer et érythropoïèse .....	36
3.4 Fer et macrophage .....	37
3.5 Surcharge en fer et toxicité .....	38
4. Élimination érythrocytaire.....	39
4.1 Sites et acteurs de l'élimination .....	39
4.1.1 Rate.....	39
4.1.2 Foie .....	41
4.1.3 Moelle osseuse .....	41
4.1.4 Participation relative des différents organes .....	41



4.1.5 Acteurs cellulaires .....	44
4.2 Déterminants corpusculaires de l'élimination .....	46
4.2.1 Implication de la phosphatidylsérine .....	46
4.2.2 Implications de la protéine bande 3 .....	46
4.2.3 Implications du couple CD47-SIRP $\alpha$ .....	47
4.2.4 Implication de la morphologie et de la déformabilité érythrocytaire.....	48
5. Transfusion sanguine en globules rouges .....	48
5.1 Lésion de stockage .....	49
5.1.1 Mécanismes.....	49
5.1.1.1 Stress oxydatif .....	49
5.1.1.2 Défaillance métabolique .....	49
5.1.2 Conséquences.....	51
5.1.2.1 Conséquences érythrocytaires .....	51
5.1.2.2 Conséquences sur la sécurité transfusionnelle .....	51
5.1.2.3 Conséquences sur l'efficacité transfusionnelle .....	52
5.2 Effet du receveur sur l'efficacité transfusionnelle .....	54
Justification et objectifs du travail .....	57
Matériels et méthodes .....	59
1. Modèles animaux .....	59
2. Modèles murins transgéniques .....	60
3. Biotinylation <i>in vivo</i> .....	61
4. Réalisation des banques de sang murin et transfusion.....	61
5. Mesure de l'EPO plasmatique .....	62
6. Hémogrammes, mesure de l'hémoglobine et analyses biochimiques.....	62
7. Quantification du fer dans les différents organes.....	62
8. Erythrophagocytose <i>in vivo</i> .....	63
8. Analyse de rétention des globules rouges dans les organes ou « Slice blood » .....	63
7. Analyses statistiques .....	64
Résultats .....	65
Partie A : Modulation physiologique de l'élimination érythrocytaire en réponse à l'anémie : Preuve de concept et résultats principaux .....	65
1. Modulation de l'élimination des globules rouges sénescents endogènes par l'EPO .....	65
1.1 Méthode de suivi des globules rouges endogènes .....	65
1.2 Résultats .....	67
2. Principaux éléments de mécanistique de la modulation de l'élimination érythrocytaire dans un modèle murin de transfusion sanguine .....	70

2.1 Méthode .....	70
2.2 Résultats .....	71
2.2.1 Effet de l'anémie .....	72
2.2.2 Effet de l'hypoxie.....	74
2.2.3 Effet isolé de l'érythropoïétine.....	76
2.2.4 Effet de la neutralisation de l'EPO endogène.....	78
2.2.5 Rôle de l'érythropoïèse de stress .....	81
2.2.6 Rôle de la rate dans la réduction de l'élimination érythrocytaire .....	83
Partie B : Effet du statut en fer sur l'élimination érythrocytaire .....	85
1. Effet de la surcharge en fer .....	85
2. Effet de la carence en fer .....	88
Partie C : Éléments complémentaires d'exploration de la mécanistique de désactivation de l'élimination érythrocytaire et de sa modulation pathologique .....	91
1. Effet additif complémentaire de l'hypoxie.....	91
2. Cible cellulaire et moléculaire de l'EPO.....	94
2.1 Rôle de l'expression du récepteur à l'EPO sur les macrophages .....	94
2.2 Modulation de l'activité érythrophagocytaire in vivo .....	95
3. Mécanismes effecteurs non-érythrophagocytaires de la modulation de l'élimination induite par l'EPO .....	98
Discussion .....	99
1. Apport de l'étude et cohésion globale.....	99
2. Cohérence interne et externe du travail .....	99
2.2 L'EPO comme médiateur de la modulation de l'élimination érythrocytaire .....	99
2.1 Cohérence des résultats de l'élimination d'érythrocytes sénescents ou stockés.....	105
2.3 Rôle du statut en fer sur l'élimination érythrocytaire.....	107
3. Zones d'ombres, fragilités du travail de thèse et leurs perspectives de résolution .....	109
4. Transposabilité des résultats murins à la physiologie humaine, proposition de modélisation et implications cliniques .....	112
Conclusion .....	117
Références.....	119
<b>Annexe 1</b> .....	135
<b>Annexe 2</b> .....	159
Résumé.....	192



## Index des figures

N°	Titre	Page
1	Distribution des phospholipides aux feuillet membranaires	16
2	Représentation schématique et composition d'un radeau lipidique	17
3	Principaux canaux, transporteurs et perméabilités membranaires érythrocytaires	18
4	Représentation schématique des protéines membranaires et leur positions/associations relatives	19
5	Modèle de l'organisation du cytosquelette	20
6	Evolution quantitative et qualitative de la synthèse des chaînes de globines	22
7	Courbe de dissociation de l'hémoglobine et les principaux modificateurs de son affinité	23
8	Schémas des principales voies métaboliques du GR	25
9	Sites de l'hématopoïèse au cours du développement	26
10	Schéma de l'érythropoïèse	27
11	Représentation schématique d'un îlot érythroblastique	28
12	Régulation de HIF par PHD selon l'état d'oxygénation	30
13	Répartition du fer dans l'organisme	33
14	Régulation positive de la synthèse hépatique d'hepcidine	36
15	Franchissement d'une fente inter-endothéliale par un GR	40
16	Veinules pulpaire d'une rate murine	40
17	Comparaison des sites d'élimination de GR, à différents niveaux d'altération, et chez des rats normaux ou splénectomisés	43
18	Reconnaissance des signaux membranaires érythrocytaires par le macrophage	46
19	Principaux paramètres de la lésion de stockage et leur dynamique aux cours du temps	50
20	Evolution des valeurs médianes de fer non lié à la transferrine au cours du temps, après la transfusion, et en fonction de la durée de stockage	52
21	Rendement transfusionnel à 20h mesuré par marquage au Chrome-51 du sang transfusé en fonction de la durée de stockage	53
22	Effet de la durée de stockage sur l'augmentation de l'hémoglobine à 3 jours post-transfusion	53
23	Durée de vie moyenne individuelle des GR jeunes transfusés	54
24	Rendement transfusionnel à 24h selon la durée de stockage	55
25	Schéma de la technique de biotinylation en deux étapes et image représentative	66
26	Evolution relative représentative des différentes populations érythrocytaires	67
27	Effet du traitement par ASE sur les taux de production et d'élimination érythrocytaire	68
28	Evolution de la fluorescence en CMF des différentes populations	68
29	Nombre absolu de GR de la sous-population la plus âgée en fin de période de traitement	69
30	Schéma général de la procédure de transfusion	70
31	Hémoglobine et réticulocytose pré-transfusionnelles des différents modèles	71
32	Effet de l'anémie aiguë sur le taux d'élimination érythrocytaire	72

33	Corrélation entre hémoglobine pré-transfusionnelle et élimination érythrocytaire	73
34	Effet du volume transfusé sur l'élimination érythrocytaire	73
35	Effet de l'hypoxie sur le taux d'élimination érythrocytaire	74
36	Effet de la durée d'exposition à l'hypoxie sur l'élimination érythrocytaire	75
37	Effet de l'importance de l'hypoxie sur l'élimination érythrocytaire	75
38	Effet du traitement par ASE sur l'élimination érythrocytaire	76
39	Effet de la dose d'ASE sur l'élimination érythrocytaire	77
40	Effet du temps d'administration de l'ASE sur l'élimination érythrocytaire	77
41	Dosage de l'EPO plasmatique	78
42	Schéma d'administration du sérum anti-EPO	79
43	Effet de la neutralisation de l'EPO circulant sur l'élimination érythrocytaire	80
44	Réticulocytose pré-transfusionnelle	81
45	Effet de l'inhibition de l'érythropoïèse de stress sur l'élimination érythrocytaire	82
46	Effet de la splénectomie et de sa combinaison avec l'anémie, le traitement par ASE et l'hypoxie sur l'élimination érythrocytaire	83
47	Dosage du fer et de la ferritine plasmatique dans les différents modèles de surcharge	86
48	Dosage du fer total	86
49	Effet de la surcharge en fer selon la dose et la modalité d'induction sur l'élimination érythrocytaire	87
50	Valeurs d'hémoglobine, volume globulaire moyen et ferritine plasmatique chez les souris carencées	88
51	Effet de l'anémie par carence en fer sur l'élimination érythrocytaire	88
52	Représentation du système cre-lox	92
53	Quantification en qPCR de l'expression de l'ARNm de HIF1 $\alpha$ et HIF2 $\alpha$ dans les macrophages spléniques	92
54	Élimination érythrocytaire des souris lox/lox pour HIF1 $\alpha$ et HIF2 $\alpha$ selon leur statut LysMcre à l'état basal et en réponse à l'hypoxie	93
55	Élimination érythrocytaire des souris lox/lox pour EpoR selon leur statut LysMcre à l'état basal et en réponse à l'hypoxie	94
56	Évaluation de l'érythrophagocytose post transfusionnelle dans la rate et le foie de différents modèles de receveurs	96
57	Évaluation de l'érythrophagocytose tissulaire par organe et type cellulaire	97
58	Rétention érythrocytaire par organe	98
59	Survie érythrocytaire au cours d'un vol spatial	104
60	Modèle de seuil dynamique de l'élimination érythrocytaire et effets de l'EPO	114

## Index des tableaux

N°	Titre	Page
1	Séquences des amorces utilisées en PCR pour le génotypage des souris	60
2	Populations cellulaires étudiées et marqueurs de surface analysés pour l'érythrophagocytose in vivo	95

## Liste des abréviations

2,3-DPG	2,3-diphosphoglycerate
ASE	Agent stimulant l'érythropoïèse
CPDA	Citrate-phosphate-dextrose-adénine
Dcytb	Ferriréductase du cytochrome B duodéal
DMT1	<i>Divalent metal transporter 1</i>
EPO	Erythropoïétine
EPOR	Récepteur à l'érythropoïétine
ERFE	Erythroferrone
HIF	<i>Hypoxia inducible factor</i>
GR	Globule rouge
HbA/F	Hémoglobine A/F
HJV	Hémojuvénile
IRE	<i>Iron Responsive Element</i>
IRP	<i>Iron Responsive Protein</i>
KC	Cellules de Kupffer
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PHD	<i>Prolyl-4 hydroxylase domain protein</i>
PS	Phosphatidylsérine
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPM	Macrophages de la pulpe rouge
S/V	Surface / volume
SCF	<i>Stem cell factor</i>
TfR1/2	Récepteur de type 1/2 à la transferrine
UTR	<i>Untranslated Transcribed Region</i>



## Introduction

Les informations reprises dans cette introduction se basent essentiellement sur une littérature humaine. Les études comparatives entre les physiologies humaine et murine sont souvent manquantes. Les particularités d'espèce ont été, dans la mesure du possible, systématiquement recherchées et mentionnées et seront discutées.

### 1. Anatomie et physiologie érythrocytaire

L'érythrocyte ou globule rouge (GR) est une cellule anucléée (chez les mammifères) dont la morphologie normale est celle d'un disque biconcave. Il est issu de l'érythropoïèse qui se déroule, à l'âge adulte et chez l'humain, dans la moelle osseuse. Elle permet la différenciation et la prolifération de progéniteurs pour aboutir à une forme mature dépourvue d'organelle et essentiellement constitué de sa membrane et d'un contenu quasi exclusivement composé d'hémoglobine (environ 95% du poids sec du GR). Sa fonctionnalité principale est de transporter l'hémoglobine et de lui fournir l'environnement cellulaire le plus propice à la réalisation de ses fonctions de captation, transport et délivrance de l'oxygène.

#### 1.1 Membrane : structure, composition et interactions

La membrane érythrocytaire est composée d'une bicouche lipidique comportant une quantité équivalente de phospholipides et de cholestérol ainsi que plusieurs centaines de types de protéines membranaires.

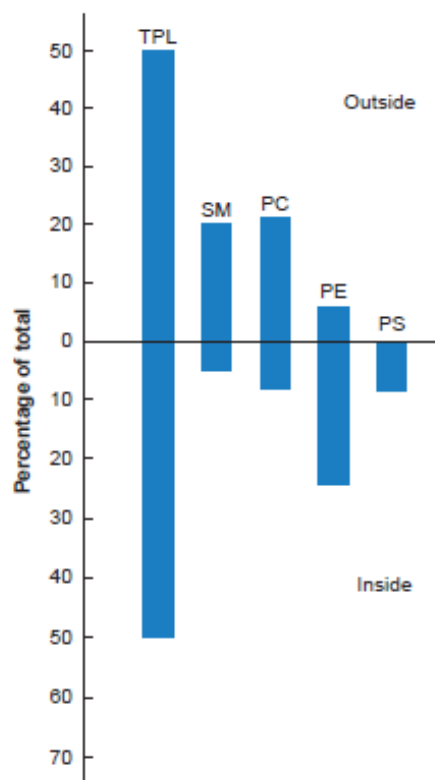
##### 1.1.1 Lipides

Les différents phospholipides sont répartis de manière asymétrique entre les feuillet interne et externe de la bicouche membranaire : la phosphatidylcholine et la sphingomyéline sont au feuillet externe tandis que la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylsérine (PS) sont au feuillet interne<sup>1</sup> (Figure 1). Cette asymétrie est entretenue par l'action de protéines : les *flippases* et *floppases* transportant les phospholipides respectivement vers le feuillet interne et externe de manière ATP-dépendante et les *scramblases* facilitant un mouvement bidirectionnel ATP-indépendant des lipides<sup>2</sup>.

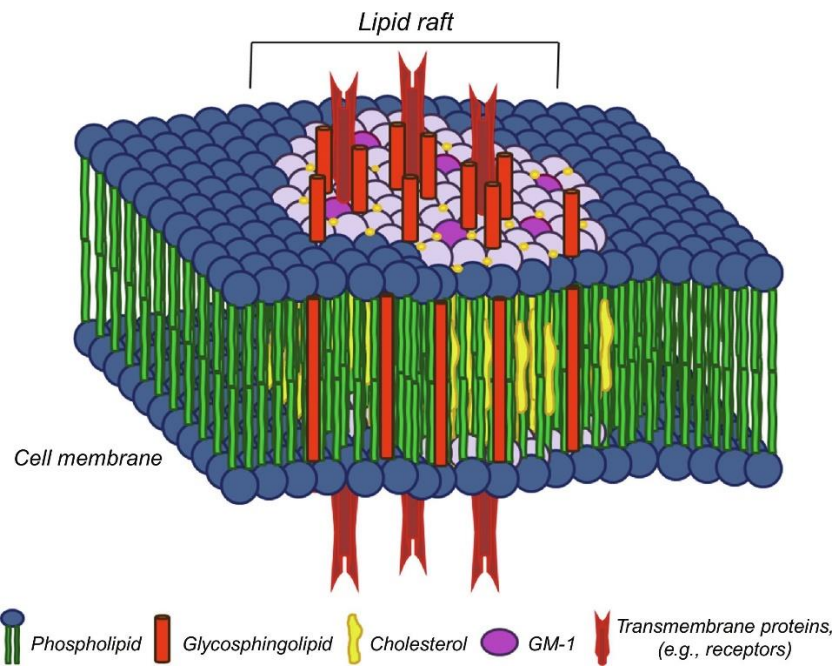
Cette distribution asymétrique est essentielle. D'une part, certains lipides participent au maintien de la stabilité membranaire en liant directement des protéines du cytosquelette ou en modulant les interactions entre protéines membranaires et cyto-squelettiques<sup>3</sup>. Et d'autre



part, l'exposition anormale de la PS au feuillet externe est classiquement évoqué comme signal de reconnaissance et d'élimination des GR par les macrophages<sup>4</sup>. La répartition horizontale des lipides et des protéines n'est pas homogène. Elle définit des micro-domaines membranaires, les *radeaux lipidiques*, enrichis en cholestérol et sphingolipides et contenant certaines protéines leur attribuant un rôle spécifique (Figure 2). Ils participent à la signalisation intracellulaire, aux interactions cellules-cellules et ont un rôle dans certaines infections parasitaires<sup>5,6</sup>.



**Figure 1 Distribution des phospholipides aux feuillet membranaires.** TPL, phospholipides totaux ; SM, sphingomyéline ; PC, phosphatidylcholine ; PE, phosphatidylethanolamine ; PS, phosphatidylsérine. (Wintrobe's clinical hematology. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins Health, 2014)



**Figure 2 Représentation schématique et composition d'un radeau lipidique.** GM-1, monosialotetrahexosylganglioside (McGraw, K. & List, A. Chapter Five - Erythropoietin Receptor Signaling and Lipid Rafts. in Vitamins and Hormones (ed. Litwack, G.) 105, 79–100 (Academic Press, 2017))

### 1.1.2 Protéines membranaires

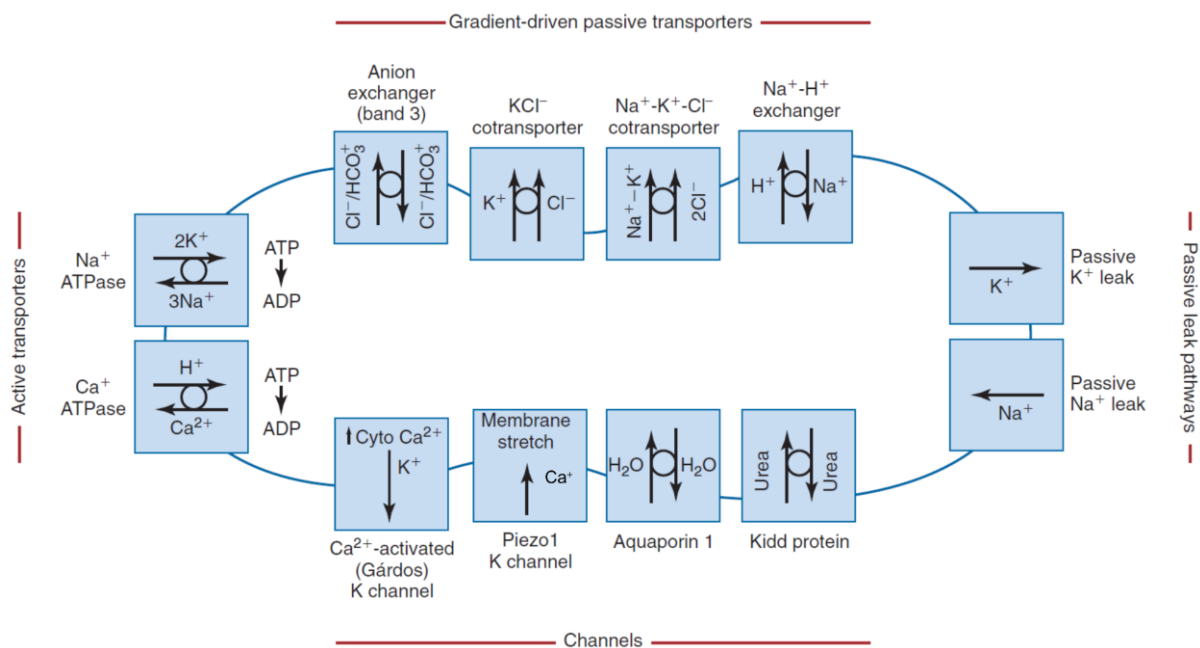
Une vingtaine de protéines « majeures » et plus de 300 mineures ont été identifiées bien que leur fonction ne soit pas totalement élucidée. Elles sont classiquement séparées en protéines transmembranaires ou intégrales et périphériques ou cytosquelettiques.<sup>3,7-13</sup>

#### 1.1.2.1 Protéines transmembranaires

Ces protéines possèdent au moins un domaine transmembranaire, une abondance très variable d'une protéine à l'autre et une grande diversité fonctionnelle. Parmi leurs différentes fonctions, on retrouve un rôle de transporteur d'ions, d'eau (aquaporine 1), de glucose (Glut1), d'urée (Kidd), d'adhésion (Lu/BCAM ligand de l'intégrine  $\alpha 4\beta 2$  et LW/ICAM4 liant la laminine) et d'interactions avec d'autres cellules (comme le CD47 inhibant la phagocytose), d'interaction avec le complément (CD55 et CD59), structurel (glycophorines) ou encore de récepteur avec une capacité de signalisation. Plusieurs d'entre-elles définissent également certains groupes sanguins (Rhésus, Kell, Duffy, Kidd, Diego et MNS pour les plus importants).

La perméabilité membranaire à l'eau et aux anions ( $\text{Cl}^-$  et  $\text{HCO}_3^-$ ) est passive et assurée par des transporteurs tandis que les cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ ) nécessitent un transport actif ATP-

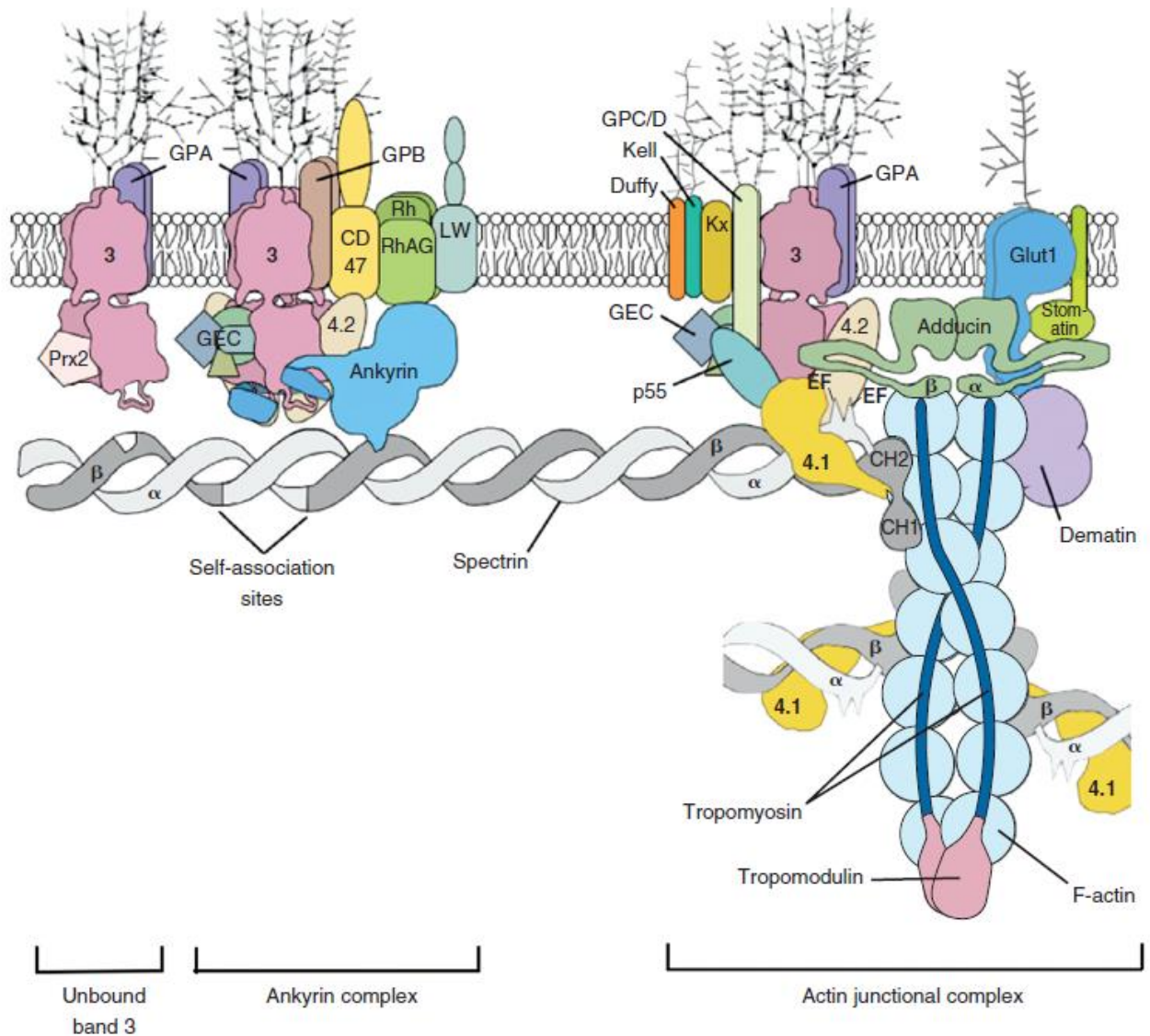
dépendant. On notera en particulier le rôle de la protéine Bande3 (SLC4A1 ou AE1 pour *Anion Exchange protein 1*), protéine la plus abondante de la membrane qui permet le transport anionique et du CO<sub>2</sub>. Son importance réside également dans sa portion intra-cytoplasmique qui joue un rôle central dans l'ancrage au cytosquelette mais également dans la liaison et/ou le regroupement de plusieurs enzymes glycolytiques ainsi que de l'hémoglobine désoxygénée intervenant dans un grand nombre des propriétés érythrocytaires<sup>14</sup>. Les autres transporteurs ioniques sont la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, les co-transporteurs Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> et K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>, le canal Gardos (canal potassique calcium-dépendant) et Piezo-1 (canal cationique non sélectif mécano-sensible) (Figure 3).



**Figure 3 Principaux canaux, transporteurs et perméabilités membranaires érythrocytaires.** (Adapté de Lux, S. Red Cell Membrane. in Nathan and Oski's hematology and oncology of infancy and childhood 455–514 (Elsevier, Saunders, 2015))

La régulation du volume érythrocytaire est un processus dynamique et complexe indispensable au maintien de l'intégrité cellulaire. Il est principalement déterminé par la concentration intracellulaire en hémoglobine et en cations. Au stade mature, le volume est principalement préservé par le maintien d'un contenu intracellulaire pauvre en Na<sup>+</sup> et riche en K<sup>+</sup>. Ce déséquilibre est maintenu par l'action des canaux cationiques dont toute altération conduira à la modification du volume cellulaire.

Certaines de ces protéines transmembranaires sont associées en complexes dont la liaison avec les protéines cytosquelettiques assure l'intégrité structurelle du GR. Ces complexes sont définis selon la protéine cytoplasmique qu'ils lient : le complexe ankyrine et le complexe jonctionnel de l'actine ou complexe 4.1 (Figure 4)

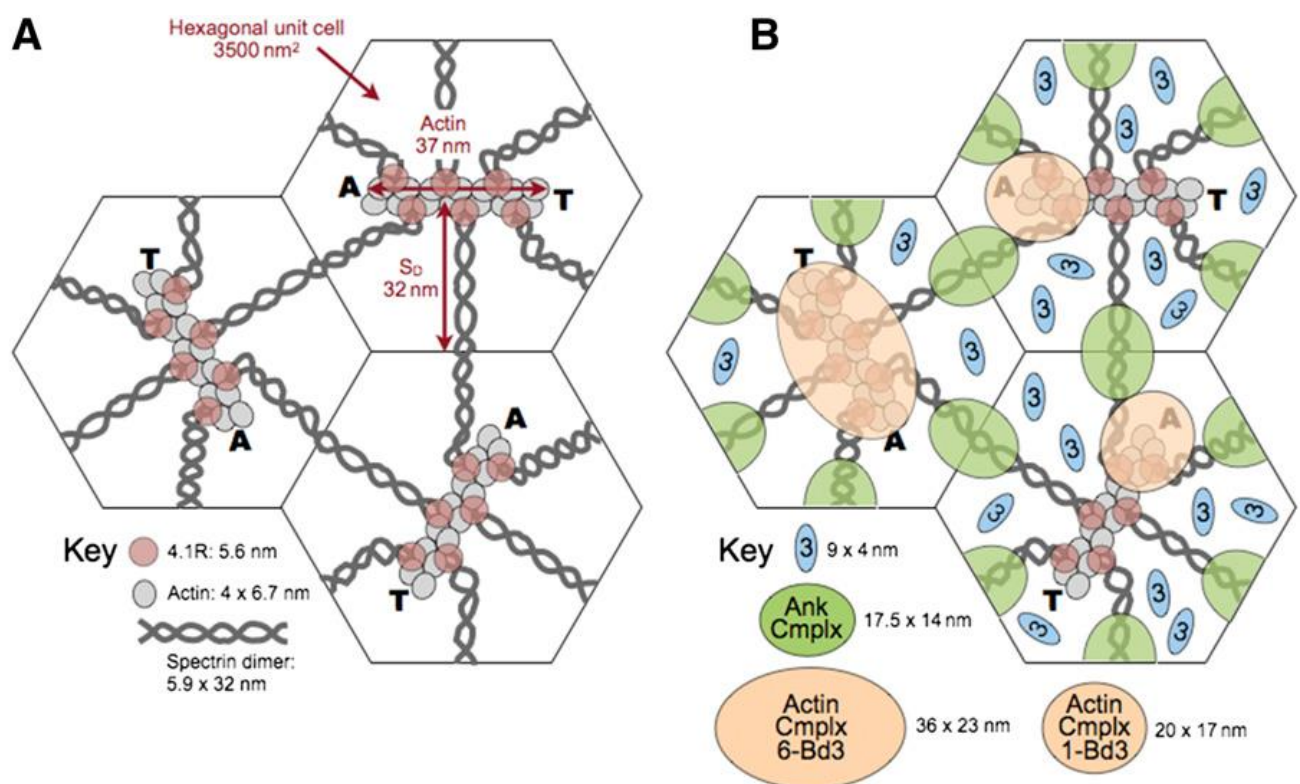


**Figure 4 Représentation schématique des protéines membranaires et leurs positions/associations relatives.** (Lux, S. Red Cell Membrane. in Nathan and Oski's hematology and oncology of infancy and childhood 455–514 (Elsevier, Saunders, 2015))

### 1.1.2.2 Protéines cytosquelettiques

Elles sont essentiellement représentées par la spectrine (50-75% des protéines du cytosquelette) qui est composée de dimères de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  s'associant en tétramères, l'actine et ses protéines associées (tropomyosine, tropomoduline, adducine et dematine), la protéine 4.1R et l'ankyrine.

La spectrine s'associe à l'ankyrine (qui fait le lien avec la bande 3 dans le complexe ankyrine) et la protéine 4.1R qui promeut le lien entre la spectrine et l'actine. En moyenne, 6 spectrines se lient à une actine en formant une structure en maillage pseudo-hexagonal recouvrant la face interne de la membrane et assurant sa stabilité structurelle (Figure 5).



**Figure 5** Modèle de l'organisation du cytosquelette. Structure en maille pseudo-hexagonale centrée sur l'actine et ses liens avec les complexes transmembranaires. AnkCmplx, complexe ankyrine; ActinCmplx, complexe jonctionnel de l'actine. (Lux, S. E. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. Blood 127, 187–199 (2016))

La stabilité mécanique et la cohésion de la membrane érythrocytaire est donc dépendante de la présence et des interactions entre ces différentes protéines. Les mutations conduisant à une modification de la quantité ou la qualité d'une protéine de membrane sont donc susceptibles d'altérer la membrane et entraîner l'élimination précoce et augmentée du GR.

Ainsi, les déficits primaires quantitatifs en bande 3, protéine 4.2, ankyrine ou spectrine entraînent une atteinte des interactions « verticales » (entre le cytosquelette et la bicouche lipidiques via les protéines transmembranaires) causant les sphérocytoses héréditaires. Tandis que les atteintes des interactions « horizontales » (liant les protéines du cytosquelette entre elles et dues à un déficit de liaison des spectrines entre elles ou déficit en protéine 4.1R) causent les elliptocytoses. Les anomalies du transport cationique conduiront aux phénotypes de stomatocytoses hyperhydratées ainsi qu'aux xérocytoses.

### *1.1.3 Déterminants de la déformabilité érythrocytaire*

Le GR mature humain est un disque de 2 $\mu$ m d'épaisseur et de 7 $\mu$ m de diamètre (4 $\mu$ m de diamètre chez la souris<sup>15</sup>) capable de traverser un lit vasculaire particulièrement étroit (jusqu'à 1 à 2-3 $\mu$ m pour son passage splénique). Sa déformabilité est donc une caractéristique essentielle (déjà postulée en 1657 par Anton van Leeuwenhoek et toujours activement étudiée 350 ans plus tard<sup>16</sup>) indispensable à sa fonction et à son maintien en circulation. Les principaux déterminants de la capacité à se déformer d'un GR sont : le rapport surface / volume (S/V ; donc leur degré de sphéricité), la viscosité intracellulaire et la viscoélasticité membranaire<sup>17-19</sup> ; ces trois paramètres étant interdépendants. Un rapport S/V favorable, c'est-à-dire largement supérieur à 1 (environ 1.55 pour le GR humain normal), nécessite l'absence de perte de surface et le maintien d'un volume favorable. La régulation du volume par les canaux cationiques (cf. 1.1.2.1) influence également la viscosité interne qui est principalement déterminée par la concentration intracellulaire en hémoglobine (normale allant de 31 à 36g/dL chez l'humain et de 29.3 à 35.9g/dL chez la souris<sup>20</sup>) mais également l'état fonctionnel de cette hémoglobine. De même, la prévention de la perte de surface nécessite le maintien d'une intégrité structurelle des protéines membranaires permettant une stabilité membranaire tout en favorisant une structure dynamique garantissant une viscoélasticité normale.

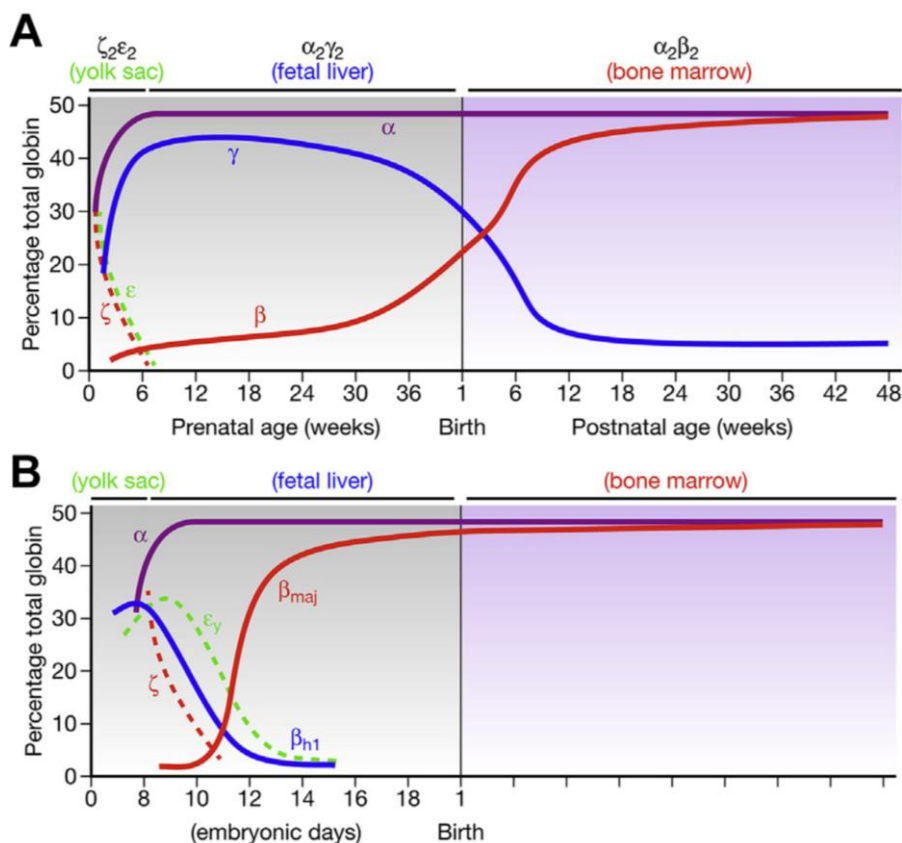


## 1.2 Hémoglobine

La fonction essentielle du GR est de transporter l'hémoglobine et de lui permettre d'assurer ses fonctions. L'hémoglobine en est le principal composant représentant 90-95% du poids sec du GR mature. Elle est composée d'un tétramère consistant en deux paires de globines similaires. Chez l'humain, une paire de globine  $\alpha$ -like ( $\zeta$  ou  $\alpha$ ) et une paire de globine de type  $\beta$ -like ( $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\beta$ ) formant les hémoglobines embryonnaires (Gower1  $\zeta_2\epsilon_2$ , Gower 2  $\alpha_2\epsilon_2$ , Portland I  $\zeta_2\gamma_2$  et Portland II  $\zeta_2\beta_2$ ), foétale (HbF  $\alpha_2\gamma_2$ ) et adultes (HbA  $\alpha_2\beta_2$ , HbA<sub>2</sub>  $\alpha_2\delta_2$ ).

Chez l'humain, deux transitions des types d'hémoglobine (embryonnaire vers foétal et foétale vers adulte) ont lieu contre une seule chez la souris. Figure 6

Chez l'humaine adulte, l'HbA représente environ 95% de l'hémoglobine circulante, l'HbA<sub>2</sub> 2,1 à 3,1% et l'HbF moins de 1% de l'hémoglobine circulante.

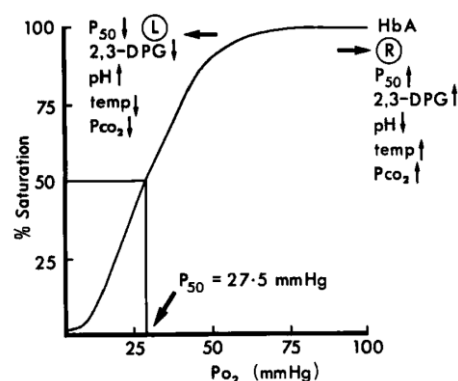


**Figure 6 Evolution quantitative et qualitative de la synthèse des chaînes de globines** chez l'humain (A) et la souris (B). Les couleurs des courbes représentent les équivalents inter-espèces. ((Blobel, G. A. et al. An international effort to cure a global health problem: A report on the 19th Hemoglobin Switching Conference. Exp Hematol 43, 821–837 (2015)).

Chaque globine possède un groupement prosthétique, l'hème, capable de fixer l'oxygène via son atome de  $Fe^{2+}$ .

La fixation de l'oxygène à l'hémoglobine (passant de la forme désoxy- à oxy-hémoglobine) dépend de la pression partielle en oxygène et de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. L'affinité est définie par la  $P_{50}$  ou pression partielle en oxygène pour laquelle l'hémoglobine est saturée à 50%. La relation entre la saturation en oxygène pour une pression partielle en oxygène donnée définit la courbe de dissociation de l'hémoglobine (Figure 7). Celle-ci est influencée par différents paramètres dont les principaux sont le pH et la concentration en 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG).

La forme sigmoïdale de cette courbe est due à la coopérativité entre les chaînes de globines : la fixation de l'oxygène sur une chaîne favorisant la fixation sur la suivante. En dehors de son activité oxyphorique, l'hémoglobine est capable de fixer, transporter et délivrer le  $CO_2$  (formant alors la carbaminohémoglobine) ainsi que le NO (sous forme de S-nitrosohémoglobine) de manière variable selon l'environnement tissulaire dans lequel se trouve le GR : un environnement pauvre en oxygène (les tissus périphériques) favorisera le relargage de l' $O_2$  et du NO et la captation du  $CO_2$  tandis qu'un environnement riche en  $O_2$  aura l'effet inverse. Ces relations complexes entre  $O_2$ ,  $CO_2$  et NO (et son effet régulateur du flux sanguin) soulignent l'importance et la complexité du rôle du GR et de l'hémoglobine dans la physiologie tissulaire.



**Figure 7** Courbe de dissociation de l'hémoglobine et les principaux modificateurs de son affinité. (Macdonald, R. Red cell 2,3-diphosphoglycerate and oxygen affinity. *Anaesthesia* 32, 544–553 (1977))



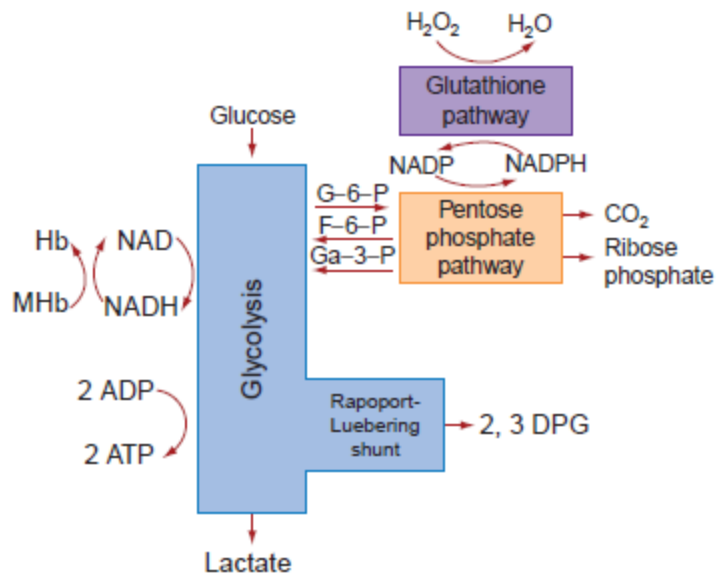
### 1.3 Enzymes et métabolisme érythrocytaire

Le GR mature est dépourvu d'organelle et donc incapable de synthèse protéique. Son métabolisme dépend, dès le stade réticulocytaire, donc uniquement d'activités enzymatiques et en particulier de la glycolyse.

L'essentiel de l'activité métabolique érythrocytaire consiste en des mécanismes visant le maintien de l'hémoglobine dans un état fonctionnel et l'intégrité structurale du GR. En effet, l'exposition permanente du GR aux dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) induit un stress oxydatif qui altère les composants cellulaires dont la membrane, et oxyde le  $Fe^{2+}$  de l'hémoglobine en  $Fe^{3+}$  formant de la méthémoglobine non fonctionnelle. Des mécanismes de prévention et de réversion de stress oxydatif sont donc indispensables.

Ainsi le système NAD-NADH permet le fonctionnement d'enzymes NADH-dépendantes dont la méthémoglobine réductase qui réduit le  $Fe^{3+}$  de l'hémoglobine en  $Fe^{2+}$  rétablissant la fonctionnalité de l'hémoglobine. Les principaux ROS sont le superoxyde et le peroxyde. L'enzyme superoxyde dismutase 1 catalyse la transformation du superoxyde en oxygène et peroxyde. Ce dernier est ensuite neutralisé par la catalase et la glutathion peroxydase 1. La glutathion peroxydase nécessite, elle, la présence de glutathion réduit dont la production est dépendante du NADPH. NADH et NADPH sont donc deux acteurs indispensables à la protection contre le stress oxydatif et leur production dépend du métabolisme glucidique. En effet, la voie des pentoses phosphates produit le NADPH tandis que le NADH est un produit de la glycolyse anaérobie. (Figure 8)

La glycolyse anaérobie produit également l'ATP nécessaire au fonctionnement des nombreuses enzymes ATP-dépendantes dont certains canaux ioniques membranaires (cf. 1.1.2.1) et son shunt de Rapaport-Luebering produit le 2,3-DPG régulant l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène.



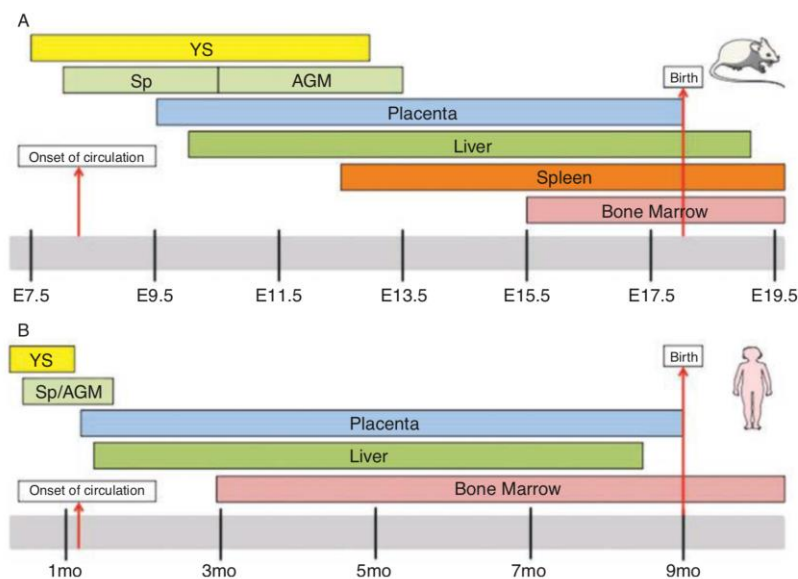
**Figure 8 Schémas des principales voies métaboliques du GR.** Représentation des principales voies métaboliques et leurs principaux produits. G-6-P, glucose 6-phosphate; F-6-P, fructose 6-phosphate ; Ga-3P, glycéraldéhyde 3-phosphate ; 2,3 DPG, 2,3-diphosphoglycerate. (Wintrobe's clinical hematology. (Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins Health, 2014))

## 2. Production érythrocytaire et ses mécanismes de régulation

### 2.1 Érythropoïèse

L'hématopoïèse est le processus de formation de l'ensemble des cellules sanguines à partir de cellules souches multipotentes. L'érythropoïèse est le processus hématopoïétique spécifique à la production de GR et comporte les étapes de différenciation des cellules souches vers les progéniteurs érythroïdes puis leur prolifération et différenciation en réticulocytes qui deviendront des GR matures.

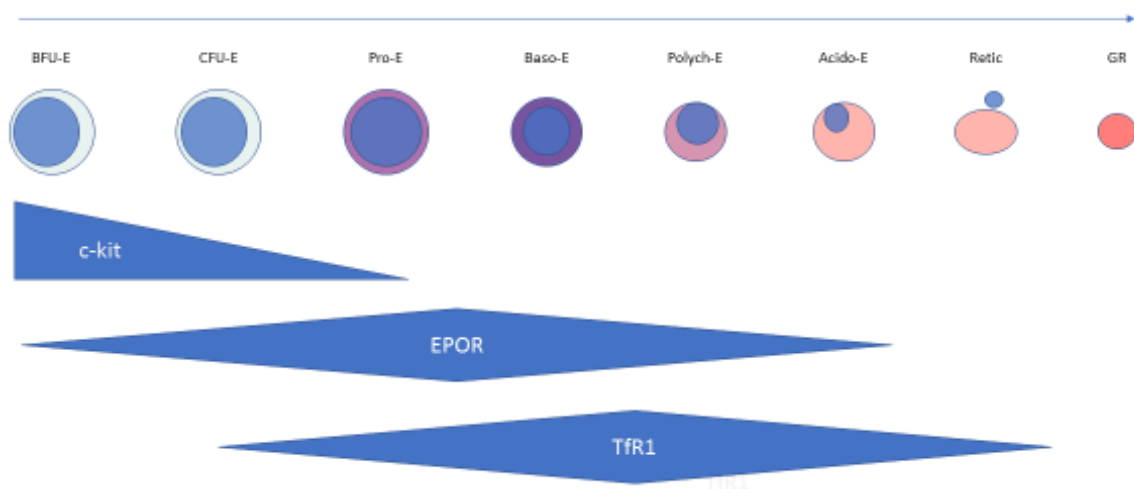
Ces processus se déroulent dans différents organes lors du développement embryonnaire et fœtal. A l'âge adulte et chez l'individu normal, ils persistent exclusivement dans la moelle osseuse chez l'humain tandis qu'elle persiste également dans la rate chez la souris (Figure 9).



**Figure 9 Sites de l'hématopoïèse au cours du développement.** Comparaison des sites de l'hématopoïèse chez la souris et l'humain. YS, *yolk sac* ; Sp, *Splanchnopleura* ; AGM, *aorta-gonad-mesonephros*. (Wintrobe's clinical hematology. (Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins Health, 2014))

Sous le contrôle de différentes cytokines et interactions avec d'autres cellules de leur microenvironnement, les cellules souches subissent une série d'étapes les restreignant progressivement à la production d'un type cellulaire spécifique. Les progéniteurs spécifiques de lignées vont proliférer et évoluer pour aboutir à la production de cellules différenciées matures.

La séquence de différenciation depuis le BFU-E jusqu'au GR mature est décrite en figure 10. La maturation du proérythroblaste au GR mature met 4 à 6 jours chez l'humain<sup>21</sup> contre deux fois moins chez la souris.



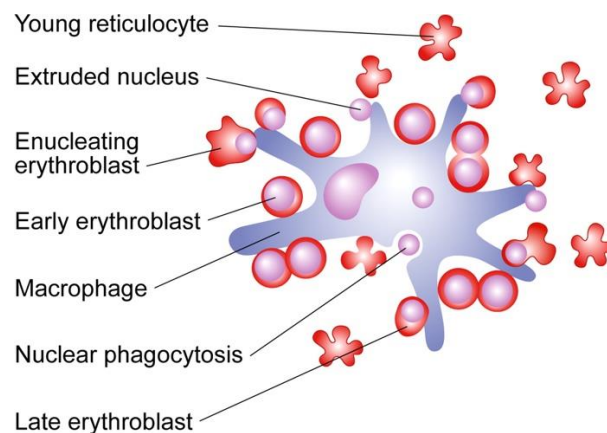
**Figure 10 Schéma de l'érythropoïèse.** Représentation schématique des différents stades de l'érythropoïèse et de l'expression des principaux récepteurs discutés dans le texte. C-kit, récepteur au *Stem cell factor* ; EPOR, récepteur à l'érythropoïétine ; Tfr1, récepteur de type 1 à la transferrine.

L'érythropoïèse est régulée par une balance entre signaux de régulation positifs et négatifs qui comprennent à la fois des cytokines/facteurs de croissance et des interactions cellules-cellules. Cet équilibre permet grâce à la production phénoménale de 2 millions de GR chaque seconde de maintenir constante la masse érythrocytaire circulante de 25 000 milliards de GR.

En situation de besoin accru en oxygène, l'érythropoïèse dite « de stress » permet l'augmentation de la production jusqu'à 6 à 10 fois la production normale<sup>22,23</sup>. La régulation de cette augmentation est essentiellement sous le contrôle de la production oxygène-dépendante de l'érythropoïétine (EPO).

Les signaux de régulation positive sont nombreux mais nous en retiendrons deux principaux : le *stem cell factor* (SCF) et l'EPO. Le SCF régule l'érythropoïèse précoce (jusqu'au stade BFU-E tardif) et promeut la prolifération des progéniteurs les plus immatures tout en retardant leur différenciation<sup>24-26</sup> tandis que l'EPO agit à partir du stade CFU-E (à partir duquel les progéniteurs entrent en apoptose en absence d'EPO<sup>26,27</sup>) jusqu'au réticulocytes qui n'expriment plus le récepteur à l'EPO(EPOR)<sup>28</sup>. L'EPO assure donc la survie et induit la prolifération des progéniteurs érythrocytaires. Ses caractéristiques de production, régulation et signalisation feront l'objet d'un chapitre distinct (cf. 2.2). Le relais entre les fonctions du SCF et de l'EPO s'opère au niveau CFU-E dont la survie dépend probablement d'une coopération de ces deux signaux<sup>29</sup>. Les principaux signaux inhibiteurs régulant négativement la prolifération et induisant la mort des érythroblastes sont le TGF- $\beta$ , l'IL-6, le TNF- $\alpha$  ainsi que l'IFN- $\gamma$ <sup>30</sup>.

Enfin, l'érythropoïèse est organisée spatialement en une structure particulière, l'îlot érythroblastique, constituant une niche où les différents stades de l'érythropoïèse se déroulent autour d'un macrophage central (Figure 11). Le macrophage central et ses interactions joue un rôle dans le métabolisme local du fer, l'élimination du noyau expulsé et la régulation du microenvironnement médullaire. Ses interactions avec les érythroblastes favorisent leur prolifération et leur différenciation et sont essentielles à la maturation intramédullaire des réticulocytes.<sup>31,32</sup>



**Figure 11 Représentation schématique d'un îlot érythroblastique.** (Chasis, J. A. & Mohandas, N. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. Blood 112, 470-478 (2008))

## 2.2 Érythropoïétine

### 2.2.1 Sites de production

Chez l'individu adulte humain et murin, la synthèse de l'hormone EPO est essentiellement rénale<sup>33,34</sup>. Vestige de sa prédominance embryonnaire, le foie représente 10-15% de la production totale. En cas d'hypoxie importante, cette production hépatique peut être augmentée mais dans une moindre amplitude que la production rénale qui peut être multipliée par mille<sup>35-37</sup>. Les cellules responsables de la synthèse rénale d'EPO sont les fibroblastes interstitiaux péri-tubulaires tandis que la synthèse hépatique a lieu dans les hépatocytes situés autour de la veine centrolobulaire et les cellules stellaires de Ito<sup>38</sup>. L'expression d'ARN messager de l'EPO a également été détectée dans plusieurs autres tissus et types cellulaires : le système nerveux central (à la fois dans les neurones, la rétine et les cellules gliales), la moelle osseuse, le poumon, le cœur, le tractus reproductif, les ostéoblastes et enfin les macrophages. Cette synthèse étant probablement de type paracrine/autocrine dans ces tissus contrairement à la synthèse rénale et hépatique qui a une fonction hormonale<sup>39-41</sup>. L'EPO synthétisée par les tissus extra-rénaux diffère notamment par un contenu moindre en acide sialique et une activité *in vitro* différente<sup>42</sup>. La demi-vie de la molécule étant proportionnelle à son contenu en acide sialique<sup>43</sup>, ceci renforce l'hypothèse d'une synthèse au rôle paracrine/autocrine dans ces tissus<sup>42,44</sup>.

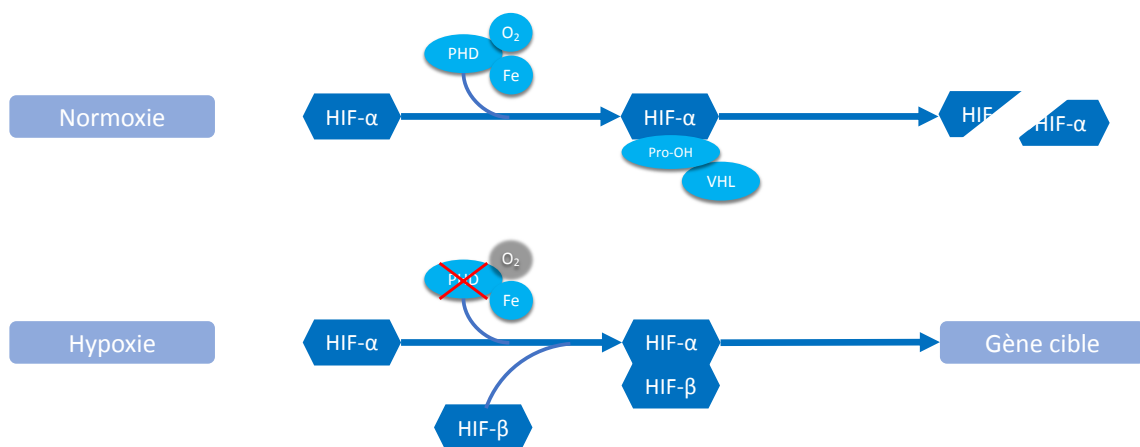
### 2.2.2 Régulation de la synthèse

La synthèse hépatorénale de l'EPO est oxygénodépendante c'est-à-dire qu'elle répond à la diminution de l'apport en oxygène aux cellules productrices. Cette baisse d'apport induit une hypoxie relative des tissus qui peut être due à une diminution de la pression artérielle en oxygène (baisse de l'apport pulmonaire en oxygène), de la capacité de transport du sang (anémie) ou à une altération de la capacité de délivrance de l'hémoglobine (anomalie d'affinité).

Cette hypoxie est ressentie par le système des facteurs inductibles par l'hypoxie (*Hypoxia inducible factor* ou HIF). Les HIF sont les régulateurs de l'adaptation tissulaire à l'hypoxie. Ce sont des facteurs de transcription composés de deux sous-unités : une  $\alpha$  sensible à l'hypoxie et une  $\beta$  constitutivement active. En normoxie, deux prolines de la sous-unité  $\alpha$  sont hydroxylées de manière oxygénodépendante par une prolyl hydroxylase (*prolyl-4 hydroxylase domain protein* ou PHD). Cette hydroxylation va induire une polyubiquitination de la sous-

unité  $\alpha$  par le complexe protéique *von Hippel-Lindau (VHL)-E3 ubiquitin ligase* et sa dégradation très rapide (moins de 5 minutes) par le protéasome. On notera que la PHD possède 3 isoformes PHD-1, 2 et 3 dont les sites cellulaires, tissulaires et conditions d'expression diffèrent. Son activité nécessite, en plus de l'oxygène, la présence de fer et d'un cycle de Krebs fonctionnel<sup>45-47</sup>. En plus de la régulation par PHD, HIF est également modifiée de manière oxygénodépendante par le facteur inhibant HIF (*Factor inhibiting HIF* ou FIH) empêchant la liaison à ses cofacteurs.

En hypoxie, PHD et FIH sont inhibés ce qui permet la stabilisation de la sous-unité  $\alpha$  et sa translocation nucléaire. Dans le noyau, elle forme un dimère avec la sous-unité  $\beta$  et se lie à ses co-activateurs ce qui lui permet d'exercer ses effets transcriptionnels sur un grand nombre de gènes possédant tous un élément de réponse à l'hypoxie (*Hypoxia-response element* ou HRE) (Figure 12). Ces gènes participent à des processus très divers comprenant l'angiogenèse, le métabolisme cellulaire et d'oxydoréduction, l'inflammation, le métabolisme du fer, la croissance tissulaire et l'apoptose, la migration cellulaire et la glycolyse<sup>41,47,48</sup>.



**Figure 12** Régulation de HIF par PHD selon l'état d'oxygénation.

Les différentes isoformes de la sous-unité  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$ ) partagent un grand nombre de gènes cibles mais certains gènes sont spécifiquement régulés par une isoforme et ce, de manière tissu-dépendante. En particulier, la synthèse de l'EPO est spécifiquement dépendante de HIF-2 $\alpha$ . En effet, sa délétion constitutionnelle est létale *in utero* mais son inactivation à l'âge adulte cause une anémie par manque d'EPO tandis que la délétion d'HIF-1 $\alpha$  est asymptomatique sur le plan érythrocytaire.<sup>49</sup>

La production de l'EPO est donc stimulée par la baisse de l'oxygène délivré aux cellules productrices. Suite à une chute de cet apport, l'EPO augmente dès 60 à 90 min pour atteindre son maximum autour de 48h chez l'humain et entre 12 et 24h chez la souris<sup>50</sup>. Elle diminue ensuite pour atteindre un plateau. Le pic et le plateau ont un niveau proportionnel à la profondeur de l'hypoxie<sup>34</sup>. Le retour à la normale du taux d'EPO précède largement l'augmentation de la masse de GR ce qui indique un mécanisme de diminution de la sensibilité à l'hypoxie suite à une exposition prolongée<sup>51</sup>.

Dans les tissus extra-rénaux et hépatiques, la synthèse est aussi oxygénodépendante mais répond également à d'autres signaux de stress cellulaire et tissulaire<sup>34</sup>.

### 2.2.3 Récepteurs et voies de signalisation

Le récepteur canonique à l'EPO, exprimé sur les progéniteurs érythropoïétiques, est composé d'un homodimère de la protéine du récepteur à l'EPOR). La fixation de l'EPO à l'EPOR induit un changement de conformation de la portion intracytoplasmique du récepteur qui va permettre l'activation d'une tyrosine kinase, la Janus kinase 2 (JAK2). JAK2 va s'auto-phosphoryler et phosphoryler plusieurs sites de l'EPOR permettant ainsi l'ancrage de plusieurs autres protéines intracellulaires possédant un domaine SH2 (pour *src homology 2*). L'ancrage de ces protéines va permettre leur phosphorylation subséquente et leur activation permettant la transmission du signal de l'EPOR.<sup>52,53</sup> Les voies de signalisation et effecteurs classiquement activés par cette activation EPOR-JAK2 sont la voie STAT (principalement STAT5 mais également STAT1 et 3), MAPK/Erk (pour *mitogen-activated protein kinases*) et PI3K/Akt (pour *phosphatidylinositol 3-kinase*)<sup>54-56</sup>. Ces voies et leurs effecteurs jouent un rôle clé dans la prolifération, la croissance, la régulation de l'apoptose et le métabolisme de plusieurs types cellulaires dont les progéniteurs hématopoïétiques<sup>57-59</sup>.

L'EPOR a été décrit dans plusieurs autres tissus comme le cerveau<sup>60</sup>, le cœur<sup>61</sup>, le pancréas<sup>62</sup>, le tube digestif<sup>63</sup> et le rein<sup>64</sup> sur lesquels il exerce principalement un rôle tissu-protecteur<sup>55,65</sup>. Dans ces tissus, le type de récepteur proposé est formé d'un hétéro-dimère EPOR / CD131<sup>59,66-70</sup> bien que son interaction directe avec l'EPO soit controversée<sup>71</sup>. Le CD131 ou  $\beta$  *common chain receptor* ( $\beta$ CR) est la sous-unité commune aux récepteurs hétérodimériques à l'interleukine-3, interleukine-5 et au GM-CSF (ou *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*). La signalisation de ce récepteur est également JAK2-dépendante et active les mêmes voies de signalisation que l'homodimère EPOR mais il est exprimé sur les cellules non-

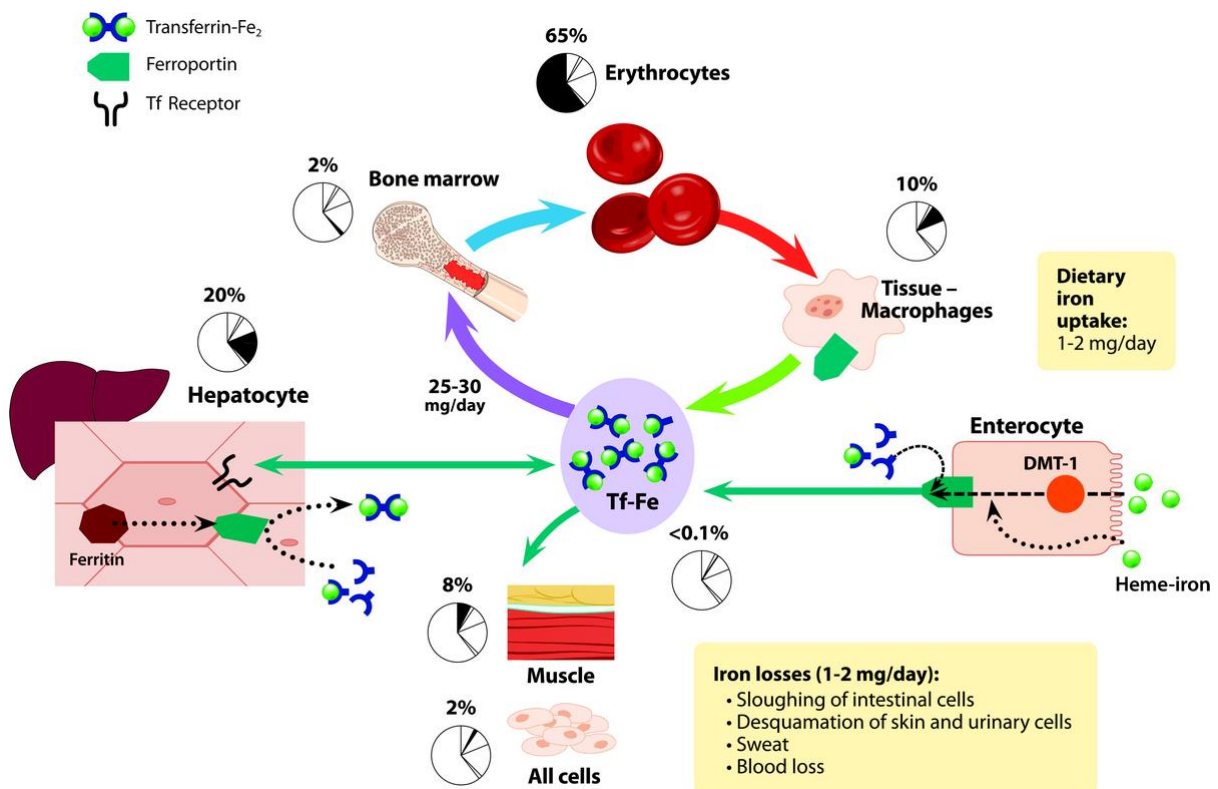


érythropoïétiques. Il a notamment été détecté à la surface des cellules endothéliales<sup>72,73</sup>, des cardiomyocytes<sup>69</sup>, des neurones<sup>69,74</sup> et des macrophages<sup>75</sup>. Enfin, un autre récepteur à activité tyrosine kinase, *Ephrin B4* (EphB4), normalement impliqué dans la signalisation cellule-cellule, a récemment été décrit comme pouvant transmettre un signal suite à la liaison de l'EPO<sup>76</sup>.

### 3. Métabolisme du fer

Le fer représente un excellent exemple de l'importance des mécanismes homéostatiques : D'une part il est essentiel à la réalisation et la régulation de nombreux mécanismes biologiques (production d'hème, des clusters fer-soufre au sein de métalloprotéines dont certaines impliquées dans la respiration mitochondriale, ...) et d'autre part sa présence en excès est toxique par la production de radicaux libres. Son absorption, son stockage, sa libération et son utilisation sont donc finement régulés.

En effet, 25 à 30mg de fer sont requis quotidiennement pour la synthèse protéique et le remplacement cellulaire. 90% de ces besoins sont assurés par le recyclage des GR sénescent (et 90% du fer quotidiennement utilisé est destiné à l'érythropoïèse) tandis que les 10% restant sont issus de l'absorption digestive. 65 à 85% du fer total transite en circuit fermé entre érythropoïèse et recyclage érythrocytaire tandis que la portion restante est stockée au niveau hépatocytaire et macrophagique<sup>77-79</sup>. Figure 13



**Figure 13 Répartition du fer dans l'organisme.** (Lasocki, S., Longrois, D., Montravers, P. & Beaumont, C. Hepcidin and Anemia of the Critically Ill Patient: Bench to Bedside. *Anesthes* 114, 688–694 (2011)).

Puisqu'il n'existe pas de régulation de l'excrétion du fer chez l'humain, la quantité de fer dans l'organisme est essentiellement déterminée, en situation normale, par son absorption digestive. En revanche, chez la souris, certaines données récentes indiquent l'existence d'un système d'excrétion digestive du fer en excès dont le mécanisme n'est pas encore élucidé<sup>80,81</sup>.

La distribution tissulaire du fer est similaire entre l'humain et la souris mais la proportion de fer perdu et absorbé chaque jour diffère fortement. En effet, si chez l'humain la perte et l'absorption digestive représentent 5 à 10% de la quantité de fer recyclé quotidiennement à partir des GR, elle en représente la totalité chez la souris<sup>82</sup>.

### 3.1 Absorption digestive

Le maintien d'un stock global de fer d'environ 4g chez l'humain<sup>83</sup> et environ 52µg/g chez la souris<sup>84</sup> est donc essentiellement basé sur la régulation de l'absorption digestive. Le fer peut être absorbé sous forme inorganique ou hémique. Le fer inorganique est capté au pôle apical des entérocytes duodénaux par son transporteur DMT1 (pour *divalent metal transporter 1*) après avoir été réduit de sa forme ferrique ( $Fe^{3+}$ ) à ferreuse ( $Fe^{2+}$ ) par la ferriréductase du cytochrome B duodéal (Dcytb). L'hème est absorbé par son transporteur spécifique HCP1 (pour *heme carrier protein 1*) avant d'être dégradé pour libérer son fer. Le fer ainsi absorbé sera soit stocké sous forme de ferritine cytoplasmique soit exportée au pôle basal par la ferroportine, seul exportateur cellulaire du fer connu chez les mammifères. Au pôle basal, le  $Fe^{2+}$  est oxydé en  $Fe^{3+}$  par l'héphaestine afin de permettre son transport par la transferrine<sup>85</sup>. Cette absorption digestive est régulée au niveau local et systémique *cf. infra*

### 3.2 Fer et régulations du métabolisme

Le fer exerce un contrôle métabolique local et systémique.

#### 3.2.1 Régulation locale

Localement, le fer exerce un contrôle post-transcriptionnel par l'intermédiaire du système *Iron Responsive Protein / Iron Responsive Element* (IRP/IRE). Il existe deux isoformes d'IRP (IRP1 et 2) dont la régulation diffère. En conditions normales, IRP1 est stable au niveau cytoplasmique et possède une activité aconitase tandis que IRP2 est constitutivement dégradée par le protéasome. En cas de concentration cellulaire en fer faible, IRP1 perd son activité aconitase et IRP2 est stabilisée, les deux protéines acquérant alors une capacité de fixation aux IRE. Ces derniers sont des motifs en épingle situés dans au niveau des régions transcrites non traduites (UTR pour *Untranslated Transcribed Region*) des ARN messagers.

Lorsque ce motif se situe dans l'UTR située en 3' (3'-UTR) de l'ARNm, la fixation de l'IRP induit la stabilisation de l'ARNm et favorise sa traduction tandis qu'une fixation sur un IRE situé en 5'-UTR bloque la traduction<sup>78,79,86</sup>.

Sur le plan de la régulation de l'absorption intestinale du fer, une baisse du fer cytoplasmique au niveau de l'entérocyte va entraîner une augmentation de la synthèse de DMT1 et diminue celle de la ferritine favorisant ainsi l'absorption. On notera que l'effet théorique de diminution de la ferroportine (dû à un IRE en 5'-UTR) induisant un effet paradoxal de diminution de l'absorption n'a pas lieu dans l'entérocyte duodénal qui exprime une forme alternative de son ARNm ne possédant pas d'IRE illustrant la complexité de l'effet métabolique du fer<sup>79,87</sup>.

Ces effets du fer intracellulaire et des IRP concernent un grand nombre de cellules, gènes cibles et fonctions directement liés au GR (érythropoïèse, métabolisme macrophagique, synthèse rénale d'EPO) ou non (métabolisme neuronal, fonction endothéliale et activité cardiovasculaire ainsi que pulmonaire)<sup>78</sup>.

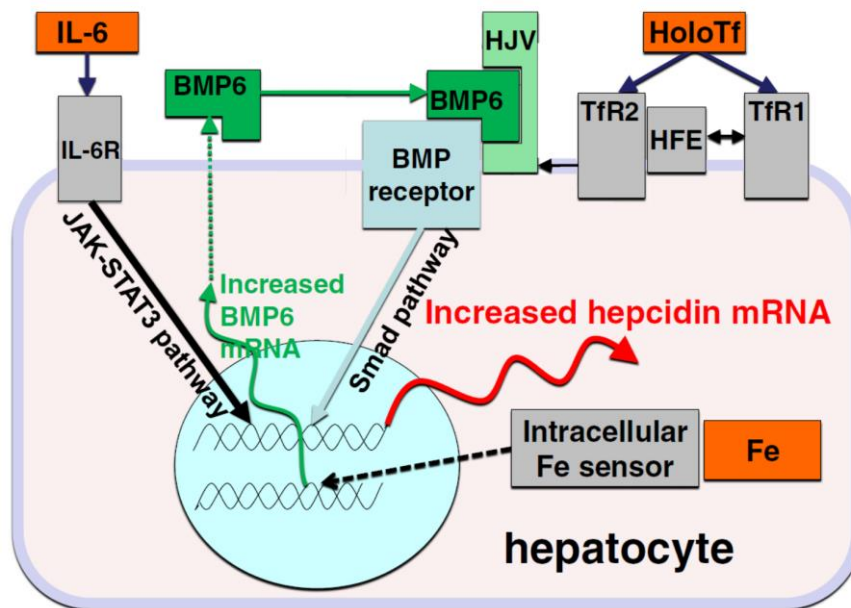
### 3.2.2 Régulation systémique

L'élément principal de l'homéostasie du fer est systémique et s'exerce par l'intermédiaire de l'hormone régulatrice du fer : l'hepcidine. Celle-ci possède un seul isoforme chez l'humain codé par le gène *Hamp* et 2 isoformes murins (*Hepc1* et *2*)<sup>88</sup>. Sa production est essentiellement hépatique mais existe aussi au niveau des adipocytes et des macrophages<sup>82</sup>.

La fixation de l'hepcidine à la ferroportine induit son endocytose et sa dégradation empêchant l'export cellulaire du fer. Cette inhibition entraîne donc une limitation de l'absorption intestinale ainsi que de la mobilisation du fer cellulaire stocké dans les hépatocytes et les macrophages causant une hypoferrémie.

La synthèse hépatique de l'hepcidine est positivement régulée par l'augmentation du fer global. Cette augmentation cause l'accroissement de la production de BMP6 (pour *bone morphogenetic protein 6*) entraînant la synthèse d'hepcidine par l'activation d'un complexe comprenant un récepteur au BMP (BMPR) et un co-récepteur, l'hémojuvéline (HJV). L'augmentation de l'holotransferrine (la forme liée au fer de la transferrine) modifie la liaison de la protéine HFE du récepteur de type 1 à la transferrine (TfR1), dont elle facilite l'activité d'import du fer, vers le type 2 (TfR2) potentialisant probablement l'effet de la voie du BMP6.

La synthèse d'hepcidine est également positivement régulée par l'inflammation, l'hypoferrémie subséquente limitant la croissance microbienne<sup>82,89</sup>. (Figure 14)



**Figure 14 Régulation positive de la synthèse hépatique d'hepcidine.** (Adapté de Ganz, T. & Nemeth, E. Heparin and iron homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1823, 1434–1443 (2012)).

*A contrario*, l'hepcidine est négativement régulée par la baisse du fer (via l'action négative de la *transmembrane protease serine 6* ou TMPRSS6 ou matriptase-2 sur l'HJV) et en réponse à l'augmentation de l'activité érythropoïétique. En effet, la prolifération des progéniteurs érythroïdes entraîne l'augmentation de la synthèse de l'hormone erythroferrone (ou ERF) qui cause la suppression de la synthèse d'hepcidine par un mécanisme encore mal compris<sup>89,90</sup>.

### 3.3 Fer et érythropoïèse

Il existe un lien particulier et complexe entre le métabolisme du fer et celui des GR.

En effet, l'anémie entraîne la stabilisation de HIF2 $\alpha$  au niveau de l'entérocyte et certaines protéines favorisant l'absorption du fer (DMT1, Dcytb et ferroportine) sont des gènes cibles positivement régulés par HIF2 $\alpha$ <sup>79</sup>. Par ailleurs, HIF2 $\alpha$  possède lui-même un IRE répresseur tandis que sa dégradation par PHD est dépendante du fer. Enfin, l'augmentation de l'EPO (sous le contrôle de HIF2 $\alpha$ ) entraîne la suppression de l'hepcidine favorisant également l'absorption entérique du fer et sa libération depuis les macrophages. La balance en cas d'anémie est donc

en faveur d'une augmentation de la concentration en fer circulant afin d'assurer les besoins de l'érythropoïèse.

Comme décrit plus haut, l'érythropoïèse est le principal consommateur de fer dans l'organisme. L'entrée de fer dans les précurseurs érythroïdes est effectuée par l'intermédiaire du TfR1 dont l'ARNm possède un IRE facilitateur en 3'-UTR et dont l'expression est positivement régulée par HIF2 $\alpha$  dans ces cellules<sup>91</sup>.

Chez le patient insuffisant rénal, l'administration de fer intraveineux potentialise l'effet de l'EPO thérapeutique probablement en corrigeant le déficit fonctionnel en fer dû à l'inflammation et l'augmentation de l'hepcidine chez ces patients<sup>92</sup>. A l'inverse, la surcharge en fer dans un modèle murin entraîne une diminution de la synthèse rénale de l'EPO probablement par diminution de la stabilité de la protéine HIF2 $\alpha$ <sup>93</sup>. La carence en fer diminue la traduction de HIF2 et limite la production d'EPO en réponse à l'hypoxie<sup>94</sup> mais également la réponse érythropoïétique indépendamment du niveau d'EPO<sup>95</sup>.

### 3.4 Fer et macrophage

L'essentiel du fer utilisé chaque jour est issu du recyclage des GR sénescents et à l'érythropoïèse. Les macrophages sont des acteurs majeurs de ces deux processus et ont donc un rôle central dans la régulation du fer systémique.

En plus du recyclage des GR, le macrophage est capable de capter le fer libre (via DMT1) et lié à la transferrine (via TfR1) ainsi que sous forme lié à l'hème (via le CD91 ou récepteur au complexe hémopexine/hème) ou l'hémoglobine (via le CD163 ou récepteur au complexe haptoglobine/hémoglobine). Le fer est, comme pour l'entérocytes, soit stocké sous forme de ferritine soit exporté par la ferroportine après avoir été oxydé en Fe<sup>3+</sup> par la céruloplasmine.

Les modifications du phénotype du macrophage (ou sa polarisation) vont déterminer sa gestion du fer. Ainsi, l'inflammation et la transition vers un phénotype de type « M1 » favoriseront une captation du fer et sa séquestration dans le macrophage<sup>96</sup>. Cette réponse à l'inflammation a un but antimicrobien mais est impliquée dans l'anémie inflammatoire où la rétention macrophagique du fer crée un état de carence fonctionnelle en fer<sup>97</sup>. A l'opposé du spectre phénotypique, les macrophages tissulaires sont généralement de type « M2 », spécialisés dans le recyclage du fer et en favorisent l'export<sup>98,99</sup> (voir aussi 4.1.5). Enfin la

concentration intracellulaire en fer influence le phénotype macrophagique notamment en modifiant l'activité des IRP et la stabilité de HIF $\alpha$ <sup>99-101</sup>.

### 3.5 Surcharge en fer et toxicité

La surcharge en fer peut être héréditaire ou acquise. Elle est due à une augmentation de l'apport en fer combinée à l'incapacité, pour l'humain, à augmenter l'excrétion de fer.

Les principales formes génétiques de surcharges en fer sans anémie associée comportent soit une anomalie dans la régulation de l'hepcidine (mutations de *HFE*, *HJV*, *HAMP* ou *TfR2* causant une hypo-hepcidinémie et donc une entrée cellulaire et une absorption constante de fer) soit une anomalie de la ferroportine (gain ou perte de fonction)<sup>102</sup>.

Les formes acquises sont dues à un déficit acquis en hepcidine (lors de dysérythropoïèses avec synthèse augmentée d'érythroferrone) ou à un apport parentéral en fer principalement par la transfusion chronique<sup>102</sup>. La surcharge n'est pas inductible par voie orale chez l'humain normal mais l'est chez la souris.

L'accumulation du fer dans les organes mène au dépassement des capacités de stockage et à l'apparition de fer libre induisant la production de radicaux libres eux-mêmes responsables de diverses atteintes cellulaires (peroxydation lipidique, atteinte mitochondriale, apoptose, lésions de l'ADN, ...). La cinétique d'atteinte et la répartition des organes concernés sont différentes selon l'étiologie de la surcharge. Les principales conséquences cliniques relèvent des atteintes hépatiques, cardiaques, endocrines et rénales<sup>103</sup>. On notera enfin que la souche murine C57BL/6 présente une probable résistance à la toxicité cardiaque dans les modèles de surcharges<sup>80</sup>.

## 4. Élimination érythrocytaire

Les GR ont une durée de vie limitée de 120 jours en moyenne chez l'humain<sup>104,105</sup> et 40 à 50 jours chez la souris<sup>106,107</sup> selon les études et techniques utilisées. Leur élimination n'est pas aléatoire mais concerne une fraction donnée de GR chaque jour. En d'autres mots, la probabilité d'être éliminé ne concerne pas de la même manière chaque GR mais seulement une sous-population spécifique qui reprend les GR les plus âgés<sup>106,108</sup>. Cette population éliminée représente, chaque jour, 0,8 à 1% des GR chez l'humain contre 2 à 2,5% chez la souris. Suite à l'acquisition en circulation d'altérations métaboliques, antigéniques ou morphologiques, 2 à 5 millions de GR sont donc éliminés chaque seconde<sup>109</sup>. Cette élimination a lieu dans plusieurs organes (rate, foie et moelle osseuse) et ses cellules effectrices sont principalement macrophagiques. En effet, la déplétion expérimentale en macrophages diminue fortement l'élimination érythrocytaire<sup>110,111</sup>. L'érythrophagocytose est le processus de dégradation cellulaire des GR et constitue, grâce au recyclage du fer hémique, la principale source de fer pour différents processus dont la production de nouveaux GR<sup>112</sup>. Ce cycle du fer renforce encore l'importance de l'équilibre entre production et élimination érythrocytaire.

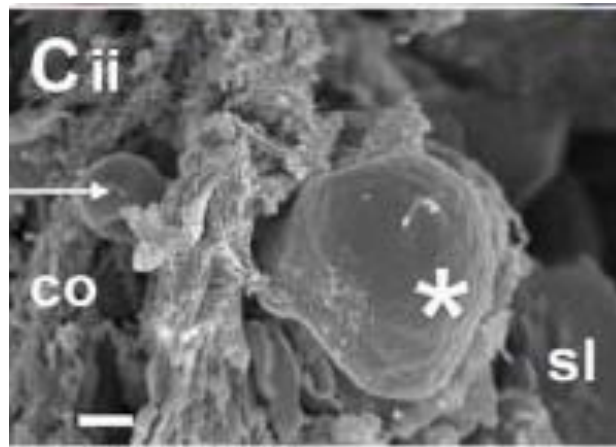
### 4.1 Sites et acteurs de l'élimination

#### 4.1.1 Rate

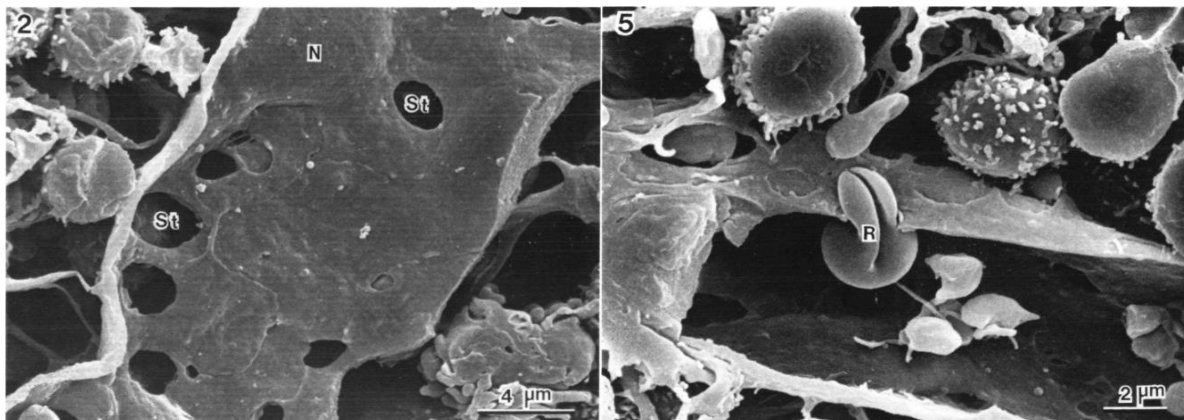
Au-delà de son rôle bien défini dans l'immunité innée et adaptative<sup>113</sup>, la rate est depuis longtemps considérée comme le principal site d'élimination érythrocytaire. Sa « spécialisation » dans l'élimination des GR vient de sa vascularisation particulière séparée en circulation dite rapide ou « fermée » et circulation dite lente ou « ouverte ». Tandis que dans la circulation fermée les GR vont traverser la rate avec peu d'interaction et rejoindre la circulation générale, la circulation ouverte (qui draine environ 10% à 20% du débit sanguin splénique<sup>17</sup>) perd son endothélium et s'ouvre dans la pulpe rouge<sup>114</sup>. Les GR traversent donc la pulpe rouge qui est composée d'un maillage réticulaire essentiellement peuplé de macrophages pour être repris par le réseau veineux. La différence essentielle entre les anatomies humaine et murine réside dans le type de système veineux. Chez l'humain, les GR rejoignent les sinus veineux qui sont délimités par un endothélium discontinu. L'espace entre ces cellules endothéliales définit la « fente inter-endothéliale » dont le diamètre fait 1 à 2µm (Figure 15)<sup>115,116</sup>. Chez la souris, la circulation veineuse n'est pas sinusoidale. Les GR rejoignent



la circulation au niveau de veinules pulpaire dont l'endothélium possède des pores arrondis d'un diamètre de 1 à 3  $\mu\text{m}$  (Figure 16)<sup>115,117</sup>.



**Figure 15 Franchissement d'une fente inter-endothéliale.** Globule rouge (\*) franchissant une fente inter-endothéliale (rectangle blanc) depuis les cordons de la pulpe rouge (co) vers la lumière sinusale (sl). (Deplaine, G. et al. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. Blood 117, e88–e95 (2011))



**Figure 16 Veinules pulpaire d'une rate murine en microscopie électronique.** A gauche, parois d'une veinule avec ses pores (St). A droite, globule rouge (R) franchissant un pore. (Hataba, Y., Kirino, Y. & Suzuki, T. Scanning Electron Microscopic Study of the Red Pulp of Mouse Spleen. J Electron Microsc (Tokyo) 30, 46–56 (1981))

Le mécanisme de rétention splénique des GR est donc double. D'une part une élimination dite « immune » où le flux lent (et le haut hématoците<sup>114</sup>) au travers de la pulpe rouge augmente le temps de contact entre les GR et les macrophages favorisant ainsi la détection d'anomalies de surface ou des anticorps (cf. 3.3) à la surface des GR. D'autre part une rétention mécanique, les GR avec une déformabilité altérée étant incapables de franchir la fente inter-endothéliale, ils sont retenus mécaniquement avant d'être éliminés. Chez la souris, les contraintes liées au

passage des pores des veinules semblent moindres que pour le franchissement de la fente inter-endothéliale (Le rapport diamètre du GR/diamètre fente-pore est de 7 pour 1 à 2 chez l'humain contre 4 pour 1 à 3 chez la souris). Néanmoins, la rétention de particules mimant le GR murin dans la rate des souris a été montrée et est fonction de leur rigidité<sup>118</sup>.

Il est par ailleurs intéressant de noter que ces propriétés spléniques de contrôle érythrocytaire jouent un rôle dans la maturation des réticulocytes<sup>119-121</sup> (la présence de corps d'Howell-Jolly, résidus nucléaires, dans les GR des patients splénectomisés en témoigne) ainsi que dans l'entretien des GR au cours de leurs passages successifs. En effet, la rate est capable d'éliminer des inclusions (dépôts de ferritine<sup>122</sup>, parasite<sup>123,124</sup>, hémoglobine précipitée<sup>125</sup>) et défauts de GR tout en laissant circuler le GR « nettoyé ».

#### 4.1.2 Foie

La capacité du foie à éliminer des GR altérés et normaux est bien démontrée chez l'humain, le rat et la souris<sup>126-129</sup>. Son élimination ne semble néanmoins pas concerner les GR présentant un déficit isolé de déformabilité. En effet, en plus d'une anatomie vasculaire ne permettant *a priori* pas la rétention mécanique, il n'y a pas d'élimination hépatique lors de la transfusion de GR sphérocytaires marqués au Chrome-51(<sup>51</sup>Cr)<sup>126</sup>.

#### 4.1.3 Moelle osseuse

La présence d'érythrophagocytose a été démontrée à l'état basal chez l'humain<sup>130,131</sup> et l'animal<sup>129,132,133</sup> bien que l'importance de sa contribution soit rendu difficilement évaluable par sa dispersion au sein des différents os. Néanmoins, certaines études (chez le rat<sup>129</sup> et le lapin<sup>134</sup> dont l'ensemble des os a été étudié) font état d'une élimination médullaire concernant 10 à 90% de l'élimination physiologique de GR normaux. Cette observation bien qu'impressionnante en quantité soulève la question d'un rôle sous-estimé de la moelle dans l'élimination érythrocytaire physiologique. Cette localisation est néanmoins assez logique si l'on considère la proximité entre la principale source de fer de l'organisme (l'érythrophagocytose) et sa principale utilisation (l'érythropoïèse).

#### 4.1.4 Participation relative des différents organes

La participation relative des différents organes à l'état basal c'est-à-dire pour l'élimination normale des GR endogènes sénescents n'est pas connue. En effet, l'élimination normale de GR ayant atteint physiologiquement l'âge de leur élimination ne concerne, par définition,

qu'un pourcentage restreint de GR, qui est peu voire pas détectable par les techniques radioactives les plus utilisées. L'essentiel de la physiologie de l'élimination érythrocytaire est issue d'études ayant exploré l'élimination de GR anormalement altérés (que ce soit expérimentalement ou non). En particulier, la série d'études publiée par Jandl *et al* dans les années 50 et 60 a permis une progression des connaissances fondamentales dans ce domaine<sup>126,135-137</sup>. On conclura de ces études que les sites d'élimination suivent une certaine hiérarchie selon le type d'altérations érythrocytaires considérées. Ainsi les anomalies typiques de morphologie et déformabilité (comme la sphérocytose) ont une élimination principalement splénique tandis que l'élimination caricaturalement immunitaire d'une incompatibilité ABO est exclusivement hépatique. De manière surprenante, la transfusion de GR drépanocytaires à un sujet normal entraîne une élimination mixte. Par ailleurs, des mécanismes de redondance et d'adaptation entre les organes existent. Ainsi dans un modèle d'altération érythrocytaire par N-éthylmaleimide (causant des anomalies de transporteurs ioniques et une sphéricité) chez le rat, on observe un passage d'une élimination splénique à hépatique avec l'importance de l'atteinte, mais surtout une élimination hépatique importante après splénectomie pour une dose n'induisant pas d'élimination hépatique chez le receveur non-splénectomisé. (Figure 17)<sup>127</sup>

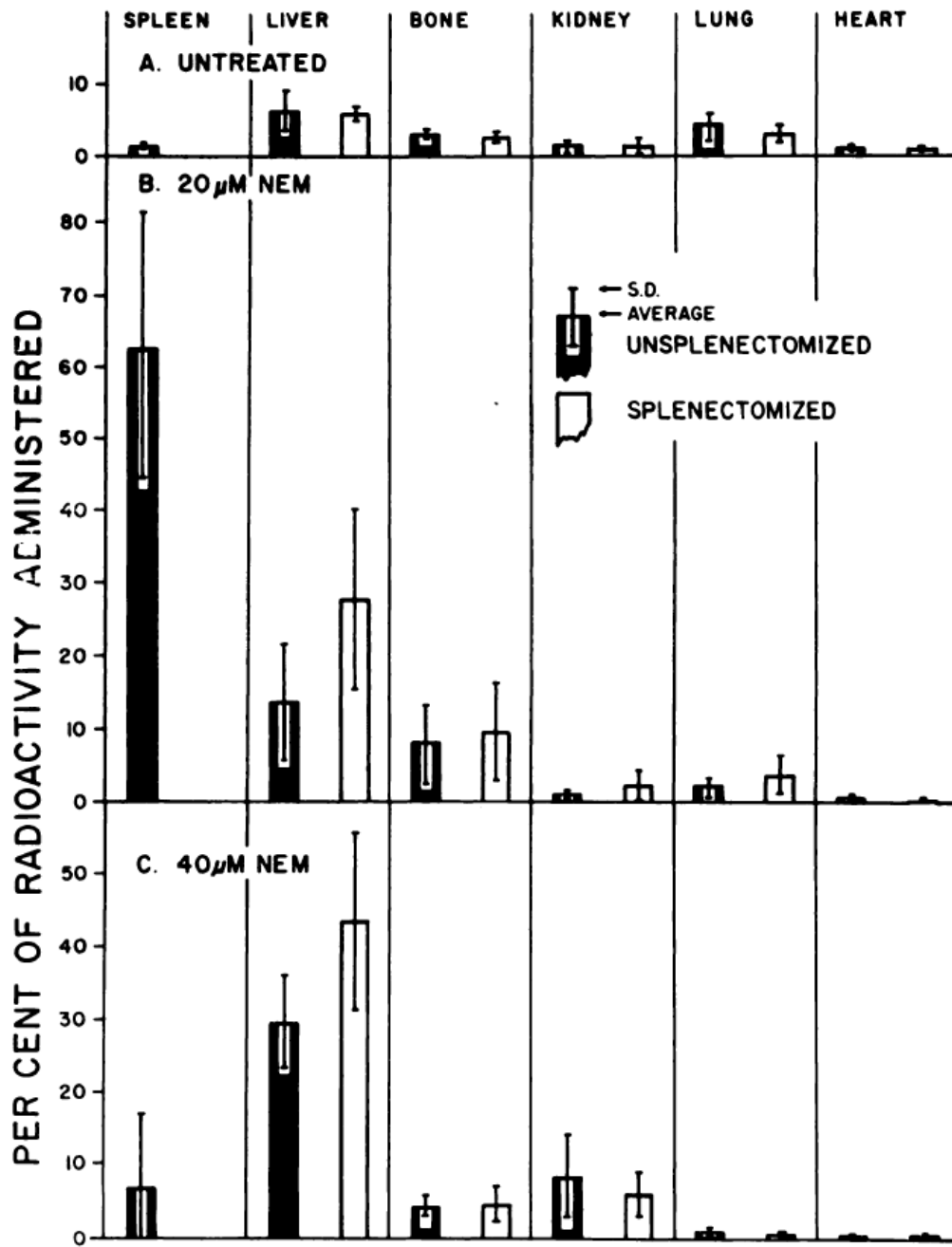


Fig. 3.—Organ distribution of Cr<sup>51</sup>-labeled erythrocytes.

Figure 17 Comparaison des sites d'élimination de GR, à différents niveaux d'altération, et chez des rats normaux ou splénectomisés. (Ultmann, J. E. & Gordon, C. S. The Removal of in Vitro Damaged Erythrocytes from the Circulation of Normal and Splenectomized Rats. Blood 26, 49-62 (1965))

#### 4.1.5 Acteurs cellulaires

Les macrophages sont des cellules du système réticulo-endothélial distribués dans l'ensemble des tissus de l'organisme dont le microenvironnement définit l'éventuelle spécificité de leur fonction. En effet, leur rôle principal (au-delà de leur rôle anti-pathogène dans l'immunité innée) est l'homéostasie tissulaire. Les différents tissus ayant des fonctions particulières, le maintien de leur homéostasie repose sur des mécanismes à la fois généraux (clairance des cellules sénescentes et la résolution de l'inflammation) et spécifiques (de la résorption osseuse au remodelage synaptique en passant par l'élimination érythrocytaire)<sup>138</sup> expliquant la grande diversité des différents types macrophagiques.

La population des macrophages tissulaires résidents est constituée lors de la période embryonnaire et foétale et est entretenue à l'âge adulte principalement par auto-renouvellement<sup>139-141</sup>. En cas d'inflammation ou de dommage tissulaire important, l'augmentation du nombre de macrophages (ou leur remplacement) est moins dû à la prolifération locale qu'au recrutement de monocytes d'origine médullaire se différenciant ensuite en macrophages.

En ce qui concerne l'homéostasie érythrocytaire, les principaux acteurs sont les macrophages de la pulpe rouge (RPM) pour la rate, les cellules de Kupffer (KC) pour le foie et les macrophages médullaires pour la moelle osseuse.

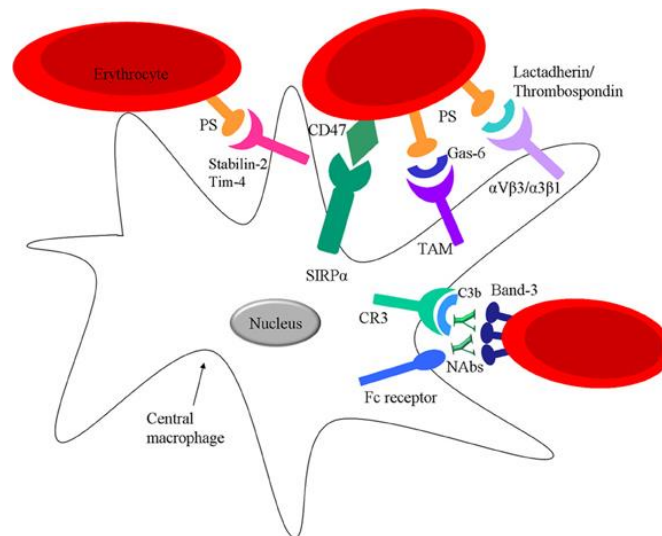
Sur le plan fonctionnel, ces cellules sont constamment exposées aux GR sénescents et au fer dérivant de la dégradation de l'hème. Elles sont donc hautement spécialisées dans le recyclage des GR et du fer. En effet, comparées à d'autres sous-types de macrophages, elles expriment fortement le récepteur au complexe haptoglobine/hémoglobine (CD163) ainsi que l'hème oxygénase 1 (HO-1), enzyme chargée de la dégradation de l'hème. Le développement des RPM est sous le contrôle spécifique du facteur de transcription Spi-C. Les souris *Spic<sup>null</sup>* expriment un déficit sélectif en RPM sans atteinte des autres populations cellulaires y compris les KC<sup>142</sup>. De manière intéressante, l'expression de Spi-C est elle-même dépendante de l'hème. Haldar *et al.* ont ainsi montré que l'expression de Spi-C dans les monocytes est constitutivement inhibée par le répresseur BACH1. Celui-ci est dégradé en présence d'hème ce qui permet l'expression de Spi-C et la différenciation de nouveaux RPM<sup>143</sup>. L'exposition des RPM à d'importantes quantités d'hème est néanmoins toxique. L'hème issue de la dégradation de l'hémoglobine (qu'elle soit libre et captée par le CD163 ou issue de la phagocytose des GR

sénescents) est normalement métabolisé par HO-1 ce qui prévient sa toxicité. Les souris déficientes pour HO-1 présentent d'ailleurs une diminution importante des RPM mais également des KC et macrophages médullaires CD163<sup>+</sup> <sup>144</sup>. De même, l'exposition de ces macrophages à des quantités importantes d'hème suite à une augmentation des GR altérés à éliminer aboutit à leur disparition suite à une forme non-apoptotique de mort cellulaire dépendant du fer libéré, la ferroptose<sup>128,143,145</sup>. Cette déplétion cellulaire induite par l'érythrophagocytose est compensée par deux mécanismes : l'augmentation de la prolifération locale des macrophages résidents et un afflux monocytaire observé dès 3 à 5h après l'augmentation de l'apport en GR altérés. Ces monocytes sont dits inflammatoires et caractérisés chez la souris par l'expression du Ly6C. Ces monocytes Ly6C<sup>Hi</sup> sont recrutés suite à l'interaction de leur récepteur CCR2 avec les chemokines CCL2 et CCL7 produites dans la rate. Une telle augmentation de l'érythrophagocytose est fréquemment rencontrée en pathologie humaine. C'est le cas des nombreuses maladies hémolytiques congénitales ou acquises mais également lors de la transfusion en GR qui représente l'apport brusque d'une quantité supplémentaire de GR dont une partie est potentiellement lésée et rapidement éliminée (cf. chapitre 4).

En dehors de leur différenciation en macrophages, les monocytes sont également capables d'érythrophagocytose<sup>145,146</sup>. Dans une moindre mesure, l'érythrophagocytose par les neutrophiles<sup>147</sup> et les cellules dendritiques<sup>145,148</sup> a également été décrite. Ces dernières jouant un rôle particulier dans le développement de l'allo-immunisation post-transfusionnelle<sup>149</sup>.

## 4.2 Déterminants corpusculaires de l'élimination

Plusieurs signaux érythrocytaires, non mutuellement exclusifs, ont été proposés comme étant le déclencheur de leur élimination bien que leur importance respective ne fasse pas consensus. Nous reprendrons ici les plus communément discutés (Figure 18).



**Figure 18** Reconnaissance des signaux membranaires érythrocytaires par le macrophage. (de Back, D. et al. Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Front. Physiol.* 5, (2014))

### 4.2.1 Implication de la phosphatidylsérine

L'exposition de la PS à la surface cellulaire est un signal connu de reconnaissance des cellules apoptotiques<sup>150</sup>. La PS peut être reconnue par plusieurs types de récepteurs à la surface des cellules phagocytaires (Tim1, Tim4, Stabilin2, intégrine  $\alpha_v\beta_3/\alpha_3\beta_5$ ) directement ou par l'intermédiaire d'autres molécules (lactadhérine, Gas6)<sup>151</sup>. Néanmoins, les données concernant l'implication de la PS dans l'élimination physiologique des GR sénescents sont contradictoires puisque l'augmentation de l'expression de la PS dans les GR sénescents n'a pas été systématiquement observée<sup>4,152-154</sup>. En revanche, son rôle dans l'élimination de GR pathologiques de différentes maladies hémolytiques semble établi<sup>155-158</sup>.

### 4.2.2 Implications de la protéine bande 3

La reconnaissance d'un néo-antigène bande 3 par des anticorps naturels a également été proposée. En effet, la fixation d'immunoglobulines de type IgG à la surface des GR sénescents

a précocement été évoquée<sup>159</sup>. Leur cible moléculaire a progressivement été identifiée comme étant la protéine bande3<sup>160-162</sup> bien que la nature exacte de l'épitope reconnu reste débattue. Certains proposent un motif créé par l'association latérale de plusieurs protéines bande3 (*clustering*) générée par la liaison d'hémichromes (la forme irréversiblement oxydée de l'hémoglobine formée suite au stress oxydatif) à la portion intracytoplasmique de la protéine<sup>163,164</sup>. La dégradation enzymatique de la protéine ou son changement de conformation ont également été proposés<sup>164</sup>. Enfin, l'érythrophagocytose médiée par ces anticorps nécessitent l'intervention de la fraction C3 du complément pour être efficace<sup>165</sup>.

#### 4.2.3 Implications du couple CD47-SIRPα

SIRPα (*signal regulatory protein α*) est un récepteur membranaire exprimé notamment sur les macrophages. Son ligand principal est la protéine CD47 (exprimée ubiquitairement) et leur interaction génère une signalisation intracellulaire régulant plusieurs fonctions. La plus importante est la régulation négative de la phagocytose des cellules viables ou du soi par les macrophages<sup>166</sup>. En particulier, cette interaction prévient l'élimination des GR par les macrophages. Sa quantité ou sa modalité de fixation à SIRPα ont donc été proposées comme marqueurs d'élimination. Chez la souris, plusieurs études ont montré une diminution de l'exposition du CD47 chez le GR circulant âgé<sup>111,167</sup> induisant leur élimination potentiellement en combinaison avec la présence d'anticorps<sup>168</sup>. La régulation de l'élimination par le CD47 pourrait également être influencée par la présence de co-signaux ou du type de récepteur macrophagique impliqué dans la reconnaissance du GR<sup>169</sup>. Sa diminution par invalidation génétique à la surface de GR (non altérés par ailleurs) entraîne leur élimination immédiate lorsqu'ils sont transfusés à une souris normale<sup>170</sup>. De manière intéressante, le CD47 est capable de moduler l'effet d'autres signaux de phagocytose. Par exemple, sa présence chez la souris limite la phagocytose induite par l'opsonisation des GR<sup>169</sup> tandis qu'elle n'a pas d'effet lors d'une altération importante de la déformabilité<sup>171</sup> suggérant l'influence d'autres signaux sur la signalisation du couple CD47/SIRPα. Une étude a montré, dans des GR expérimentalement vieillis, que le CD47 pouvait être un signal inducteur de phagocytose<sup>172</sup>. Le vieillissement induirait dans ce cas un changement de conformation permettant la fixation de la thrombospondin-1 (TSP-1) sur le CD47. La liaison du couple CD47/TSP-1 sur le SIRPα déclenchant la phagocytose.



#### 4.2.4 Implication de la morphologie et de la déformabilité érythrocytaire

Lors de son passage dans les différents lits capillaires, le GR est soumis à des contraintes de déformation intenses et répétées en particulier lors du passage splénique. Au cours de leur vieillissement, la déformabilité des GR diminue tandis que leur densité augmente<sup>153,173,174</sup>. La baisse progressive de déformabilité avec la durée en circulation coïncide avec une perte à la fois du volume et de la surface cellulaire<sup>174</sup>. Cette diminution de surface est notamment due à une perte progressive de membrane par vésiculation causant des altérations morphologiques menant à des GR petits, denses et sphériques<sup>174,175</sup>. L'altération du rapport S/V est due à une perte de surface plus importante que celle de volume aboutissant à la forme sphérique qui possède le rapport S/V le plus bas. L'altération du rapport S/V causant une baisse importante de déformabilité<sup>176</sup>, ces éléments ont été établis comme facteurs déterminants de l'élimination érythrocytaire. En effet, plusieurs études utilisant des modèles humains (*ex vivo et in vitro*) et animaux ont montré que la perte membranaire (et donc les anomalies morphologiques et altérations du rapport S/V qu'elle entraîne) déterminait une rétention mécanique et une élimination érythrocytaire de localisation principalement spléniques<sup>177-180</sup>.

#### 5. Transfusion sanguine en globules rouges

Le développement moderne des banques de sang a permis l'organisation d'un système performant de délivrance à la demande d'environ 85 millions d'unités de GR chaque année. La disponibilité de ces produits est rendue possible par la conservation hypothermique de GR déleucocytés, sous forme de culots globulaires. Cette conservation permet un écart maximum de 42 jours entre le don et la transfusion. Aux Etats-Unis, la FDA utilise deux critères pour évaluer la qualité de conservation des CGR : un rendement transfusionnel à 24h de plus de 75% et une hémolyse inférieure à 1% à péremption. En France et en Europe, le cadre réglementaire est semblable nécessitant une hémolyse inférieure à 0,8%. L'hémolyse, bien que critère important, ne peut se substituer aux études de survie puisqu'elle n'est pas prédictive du rendement transfusionnel. La mesure du rendement transfusionnel à 24h est donc un critère essentiel lors de l'évaluation de la qualité du stockage et de l'efficacité transfusionnelle. Cette efficacité transfusionnelle est actuellement considérée comme étant principalement liée à la qualité des GR administrés qui dépend de l'importance des lésions subies par le GR lors de son stockage.

## 5.1 Lésion de stockage

L'appellation « lésion de stockage » reprends l'ensemble des altérations métaboliques, biochimiques et morphologiques du GR qui s'accumulent lors de son stockage hypothermique (Figure 19).

En effet, l'exclusion des GR de la circulation lors du stockage les prive d'un apport constant en nutriments (à l'exception du glucose apporté en excès par les solutions de stockage), ainsi que des mécanismes de renouvellement et de préservation de leur environnement, leur offrant les conditions et ressources optimales au maintien de leur intégrité et de leur activité. Avec le temps, les ressources s'appauvrissent et le milieu se détériore altérant les composants érythrocytaires et inhibant les mécanismes de lutte contre le stress oxydatif.

### 5.1.1 Mécanismes

Deux grands mécanismes sont donc responsables des lésions observées : le stress oxydatif et la défaillance métabolique<sup>181</sup>.

#### 5.1.1.1 Stress oxydatif

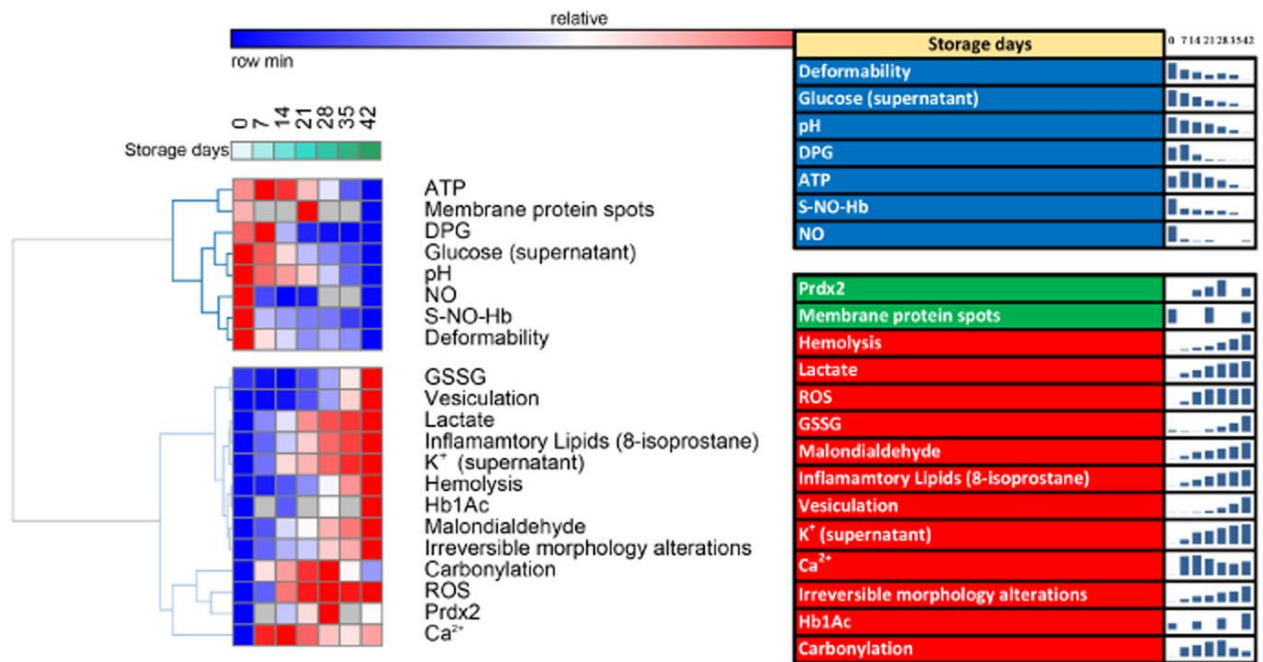
*In vivo*, des mécanismes très efficaces luttent contre l'oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine et la génération de réactifs dérivés de l'oxygène (ROS) (cf. 1.3). Lors du stockage, ces enzymes sont inhibées par la baisse de température et la fréquence de formation de ces réactifs est augmentée du fait de l'exposition des GR à l'oxygène ambiant diffusant dans les poches.

L'instabilité de la méthémoglobine libère de l'hème oxydée et du fer qui, en conjonction avec les ROS, vont causer une oxydation des lipides et protéines membranaires et sous-membranaires<sup>182,183</sup>.

#### 5.1.1.2 Défaillance métabolique

Les GR sont conservés dans une solution acide (pH 5,7 pour la solution utilisée en Europe, le SAGM ou *Saline Adenine Glucose Mannitol*<sup>184</sup>) non renouvelée. L'activité métabolique du GR est réduite à 4°C, mais pas inhibée, ce qui mène à l'accumulation de déchets métaboliques dans le milieu dont les produits de la glycolyse anaérobie causant une acidification du milieu. Cette baisse du pH altère encore les différentes enzymes du GR (qui sont également la cible de dégât oxydatifs) causant *in fine* une déplétion en 2,3-DPG et ATP. L'ATP est nécessaire à l'ensemble des activités métaboliques ainsi qu'au fonctionnement de certains canaux ioniques

et des enzymes maintenant l'intégrité de la membrane cytoplasmique. Ces altérations apparaissent dès la deuxième semaine de stockage et augmentent de manière exponentielle en fin de stockage<sup>181</sup>. Une partie de ces altérations métaboliques est néanmoins réversible lors de la recirculation des GR, dans un délai de 7 à 72 heures après transfusion au receveur, notamment la baisse de la concentration en 2,3-DPG et en ATP.



**Figure 19** Principaux paramètres de la lésion de stockage et leur dynamique aux cours du temps.  
 (D'Alessandro, A. et al. An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies: An omics update on RBC storage. *Transfusion* 55, 205–219 (2015))

## 5.1.2 Conséquences

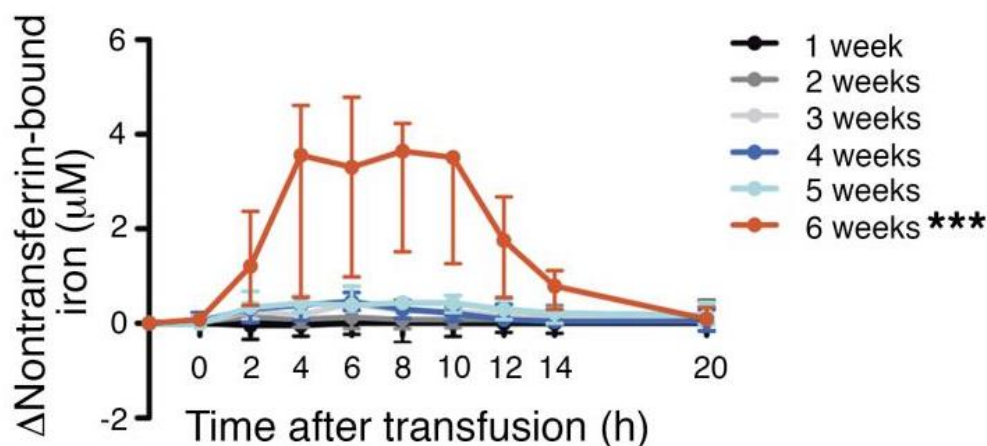
### 5.1.2.1 Conséquences érythrocytaires

Ces mécanismes vont entraîner une série d'altérations érythrocytaires impactant ses fonctions essentielles et sa capacité à circuler. Ainsi la peroxydation de protéines membranaires va déstabiliser les interactions des protéines de membranes entre-elles et avec les protéines du cytosquelette. Ces phénomènes en association avec le dysfonctionnement des canaux ioniques et la désorganisation de la bicouche lipidique vont entraîner la formation de microvésicules. La formation de microvésicules entraîne une perte de membrane causant l'apparition de morphologies anormales présentant une diminution du rapport surface/volume et donc également de la déformabilité. Par ailleurs, les altérations des protéines membranaires mènent également à la formation de néo-antigènes (dégradation et oligomérisation de la bande 3) et à la modification des signaux régulant la phagocytose (exposition de la PS et modification de la conformation du CD47)<sup>185,186</sup>.

### 5.1.2.2 Conséquences sur la sécurité transfusionnelle

L'impact de la lésion de stockage sur la sécurité transfusionnelle a soulevé de nombreuses questions et inquiétudes. Les données de nombreuses études observationnelles indiquaient en effet une augmentation de la mortalité des patients avec la durée de stockage des concentrés globulaires administrés (risque relatif de décès de 1,16 (IC95% 1,07-1,24))<sup>187</sup>. Depuis, de grandes études randomisées ont étudié l'impact de l'âge des concentrés transfusés sur la mortalité, la durée d'hospitalisation et les complications aiguës de la transfusion dans plusieurs types de populations (patients de réanimation, adultes hospitalisés, néonataux et de chirurgie cardiaque). Ces études ont récemment été compilées et ces analyses ne démontrent pas de diminution du risque de mortalité avec la transfusion de sang stocké moins longtemps<sup>188</sup>.

Malgré l'absence d'association entre le taux de complications aiguës et de mortalité et la durée de stockage, des études chez le volontaire sain ont montré que la transfusion de concentrés globulaires stockés plus longtemps augmentait le taux d'hémolyse extravasculaire et de fer non lié à la transferrine (Figure 20)<sup>189,190</sup>.



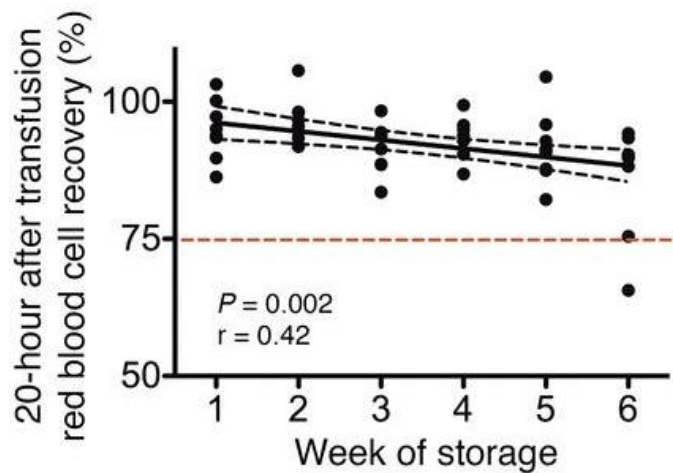
**Figure 20** Evolution des valeurs médianes de fer non lié à la transferrine au cours du temps, après la transfusion, et en fonction de la durée de stockage. (Rapido, F. et al. Prolonged red cell storage before transfusion increases extravascular hemolysis. J Clin Invest 127, 375–382 (2017)).

Cette augmentation pourrait avoir une importance majeure lors d'expositions répétées et l'on peut regretter qu'aucune étude de sécurité n'ait abordé la question des patients chroniquement transfusés.

#### 5.1.2.3 Conséquences sur l'efficacité transfusionnelle

Le but de la transfusion sanguine est d'apporter une quantité significative de GR fonctionnels capables d'augmenter la capacité de transport en oxygène du sang du patient. L'efficacité fonctionnelle de la transfusion est théoriquement évaluée par l'amélioration de l'oxygénation tissulaire mais les techniques utilisées et les études concernées sont fragiles sur le plan technique et méthodologique et difficiles à interpréter<sup>191</sup>. L'efficacité transfusionnelle est donc classiquement appréciée par le rendement transfusionnel qui est le reflet de la persistance en circulation des GR administrés. Cette efficacité peut être exprimée en augmentation de l'hémoglobine circulante suite à la transfusion, en proportion de GR administrés persistant en circulation après un temps donné et donc également en proportion de GR administrés ayant été éliminés.

L'administration de GR stockés 42 jours à un volontaire sain résulte, 24h après la transfusion, en l'élimination moyenne de 17,9% des GR administrés<sup>192</sup>. Cette proportion de GR éliminés augmente graduellement avec la durée de stockage comme démontré chez le volontaire sain (Figure 21)<sup>190</sup>.



**Figure 21 Rendement transfusionnel à 20h mesuré par marquage au Chrome-51 du sang transfusé en fonction de la durée de stockage.** (Rapido, F. et al. Prolonged red cell storage before transfusion increases extravascular hemolysis. *J Clin Invest* 127, 375–382 (2017)).

En situation clinique réelle, un effet de la durée de stockage a également été observé dans diverses populations (patients hématologiques<sup>193,194</sup>, chirurgicaux<sup>195</sup> et de réanimation<sup>196</sup>) (Figure 22).

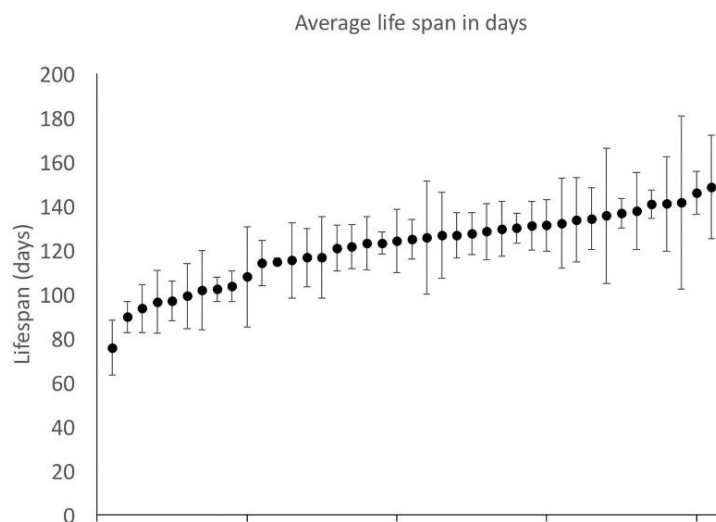
Average storage time (days)	Estimated mean hemoglobin increase per unit (95% CI)	Estimated difference, Model 1 (95% CI)*	Estimated difference, Model 2 (95% CI)†
<5	8.05 (7.39–8.71)	0 (ref)	0 (ref)
5–9	7.22 (6.71–7.74)	–0.83 (–1.41, –0.24)	–0.79 (–1.37, –0.20)
10–19	7.13 (6.62–7.63)	–0.92 (–1.51, –0.34)	–0.85 (–1.44, –0.27)
20–29	6.72 (6.12–7.32)	–1.33 (–2.02, –0.65)	–1.17 (–1.85, –0.49)
≥30	6.54 (5.67–7.42)	–1.51 (–2.43, –0.58)	–1.27 (–2.20, –0.35)

Table shows estimated mean hemoglobin increase (g/L) per unit of RBCs with 95% confidence interval and estimated difference of mean hemoglobin increase (g/L) per RBC unit.  
 \* Model 1 included the full cohort.  
 † Model 2 adjusted for age and sex.

**Figure 22 Effet de la durée de stockage sur l’augmentation de l’hémoglobine à 3 jours post-transfusion** dans une population de patients atteints de syndromes myélodysplasiques. (Rydén, J., Clements, M., Hellström-Lindberg, E., Höglund, P. & Edgren, G. A longer duration of red blood cell storage is associated with a lower hemoglobin increase after blood transfusion: a cohort study. *Transfusion* 59, 1945–1952 (2019)).

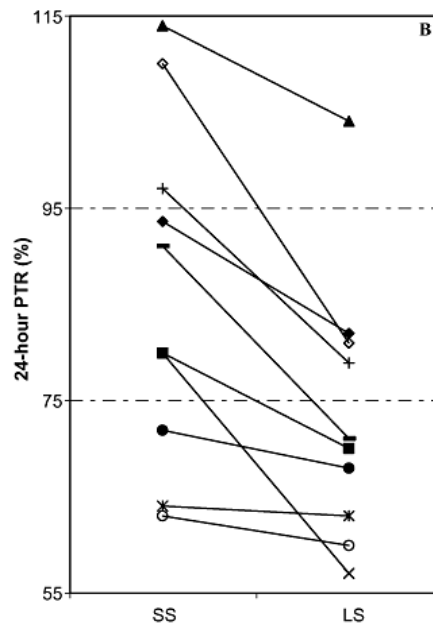
## 5.2 Effet du receveur sur l'efficacité transfusionnelle

La majorité des efforts de recherche ont été orientés sur l'impact du stockage pré-transfusionnel sur l'efficacité de la transfusion. Néanmoins, même lorsqu'on considère une durée précoce de stockage supposée fournir des concentrés globulaires performants et de qualité homogène, il existe une grande variabilité de la durée de vie des GR administrés. Ainsi l'estimation de la durée de vie moyenne des GR (ayant subi moins de 7 jours de stockage) transfusés chez des patients drépanocytaires stables lors d'échanges transfusionnels donne des valeurs allant de  $75,6 \pm 12,5$  jours à  $148,5 \pm 23,4$  jours<sup>197</sup>. Figure 23



**Figure 23** Durée de vie moyenne individuelle des GR jeunes transfusés par échange transfusionnel chez des patients atteints de drépanocytose. (Kim, J., Usmani, A., Simone, N. D. & Sarode, R. Mathematical calculation of lifespan of transfused RBCs in sickle cell disease patients. *Transfus Apher Sci* 57, 46–49 (2018)).

De même, dans une population de patients atteints de pathologies onco-hématologiques, le rendement transfusionnel, 24h après l'administration d'une unité de concentré globulaire stocké moins de 9 jours, était de  $86,4 \pm 17,8\%$  représentant une grande variabilité interindividuelle<sup>193</sup>. (Figure 24)



**Figure 21 Rendement transfusionnel à 24h selon la durée de stockage** dans une population onco-hématologique. Les transfusions réalisées chez les mêmes patients sont connectées. SS, stockage pré-transfusionnel court (2-9 jours) ; LS, stockage pré-transfusionnel long (21-33 jours). (Adapté de Luten Marleen et al. Survival of red blood cells after transfusion: a comparison between red cells concentrates of different storage periods. *Transfusion* 48, 1478–1485 (2008)).

La variabilité interindividuelle dans l'élimination érythrocytaire pour des durées courtes de stockage (donc pour des GR non ou très peu altérés par le stockage) observée dans ces études concernant des situations réelles de transfusion est importante. Ainsi, elle semble ne pouvoir raisonnablement pas être expliquée par la seule différence de qualité des GR administrés.





## Justification et objectifs du travail

L'érythropoïèse est un processus extrêmement prolifératif et finement régulé. Ses acteurs ainsi que ses nombreuses interactions (avec les mécanismes liés à l'inflammation, le fer, l'hypoxie, ...) sont relativement bien définis bien que faisant encore l'objet de nombreux travaux.

A l'autre extrémité du cycle de la vie du GR, les éléments supportant l'existence de mécanismes de régulation fine de son élimination sont moins bien établis. Les principaux acteurs de l'élimination (les macrophages résidants de la rate, du foie et de la moelle osseuse) sont connus mais leur participation relative à l'état normal et pathologique reste débattue. De même, le signal établissant le GR sénescence comme devant être éliminé n'a pas été déterminé de manière consensuelle bien que plusieurs candidats aient été proposés comme acteurs uniques ou en combinaison (exposition de la PS, anomalies de la protéine bande 3, CD47 et déformabilité érythrocytaire). Ce champ d'étude concerne potentiellement l'ensemble des pathologies comportant une réduction de la durée de vie érythrocytaire, mais aussi l'homéostasie de la masse érythrocytaire circulante. En particulier, une application clinique thérapeutique particulièrement concernée par l'importance de l'élimination érythrocytaire est la transfusion sanguine dont elle détermine partiellement l'efficacité (le deuxième élément étant la fonctionnalité propre des GR administrés).

La durée de vie d'un GR en circulation serait donc régulée par deux éléments principaux : sa qualité propre et l'activité du système réticulo-endothélial.

Si l'érythropoïèse est régulée positivement en cas d'anémie ou d'hypoxie afin d'augmenter le nombre de GR circulants, la régulation de l'élimination érythrocytaire n'a que très peu été expérimentalement étudiée.

Ces considérations et les données de la littérature nous ont mené à formuler le postulat suivant : l'élimination érythrocytaire est négativement régulée en réponse à l'anémie périphérique afin de participer au maintien d'un nombre adéquat de GR circulants.

L'objectif de ce travail a été de démontrer la présence d'un mécanisme de régulation de l'élimination érythrocytaire en réponse à l'anémie et d'en caractériser les principaux déterminants. Dans un deuxième temps, il s'est agi d'évaluer l'effet des variations du statut en fer sur ce mécanisme et enfin d'en déterminer les principaux acteurs cellulaires et moléculaires.

Pour le réaliser nous avons utilisé et développé différents modèles murins d'étude de l'élimination érythrocytaire endogène ainsi que dans un contexte transfusionnel.

Ce travail a bénéficié de l'encadrement du Dr Pascal Amireault. Le Dr Michaël Dussiot a participé de manière indispensable à la réalisation de l'ensemble des expériences.

## Matériels et méthodes

### 1. Modèles animaux

Pour les expériences concernant l'effet de la splénectomie, les souris C57BL/6JRj ainsi que leurs contrôles ont été achetées chez Janvier Labs (Saint Berthevin, France). L'ensemble des autres souris (C57BL/6JOLaHsd) a été acheté chez Envigo (Gannat, France). Ces expériences ont été menées sur des souris femelles âgées de 7 à 10 semaines.

L'anémie aiguë a été induite par phlébotomie. Pour cette procédure, les souris ont été soumises à une anesthésie générale par isoflurane et locale par tétracaïne 1%. Elles ont ensuite été phlébotomisées par le plexus rétro-orbitaire lors de deux séances, réparties sur deux jours consécutifs, et débutant trois jours avant la transfusion. Trois cents microlitres de sang ont été prélevés le premier jour et 200µL le deuxième, à chaque fois compensés par le même volume de solution saline chauffée.

Les expériences d'hypoxie ont été menées en exposant les souris à un environnement hypoxique normobare à la concentration d'oxygène indiquée dans les résultats, de 24h avant la transfusion jusqu'à 24h après la transfusion.

Le traitement par agent stimulant l'érythropoïèse a consisté en l'administration de darbépoïétine (10 µg/kg sauf indication contraire) par voie intrapéritonéale 24h avant la transfusion.

La neutralisation de l'EPO endogène a été effectuée à l'aide de sérum de lapin immunisé contre l'EPO développé et fourni par le Dr Patrick Mayeux (Institut Cochin, Paris) administré par voie intraveineuse sous anesthésie générale. La capacité de neutralisation de ce sérum a été évaluée précédemment<sup>198</sup> et 100µL de sérum neutralisent 50ng d'érythropoïétine recombinante (équivalent à 5 UI d'EPO).

L'inhibition de l'érythropoïèse a été réalisée grâce à un traitement par doxorubicine (12,5mg/kg) injectée par voie intrapéritonéale deux jours avant l'induction de l'anémie par phlébotomie.

Les modèles de surcharge en fer par injection ont été réalisés par l'administration intrapéritonéale de fer dextran (Sigma Aldrich) dilué en PBS pour un volume fixe de 10µL/g de

souris aux doses de 75 et 300mg/kg et à la fréquence de 3 injections par semaine pendant 4 semaines soit une dose totale de 900 et 3600mg/kg respectivement.

Le modèle de surcharge transfusionnelle consiste en l'administration d'une transfusion de 200µL de sang (cf. point 3 ci-dessous) deux fois par semaine pendant 4 semaines.

L'anémie par carence en fer a été obtenue par la mise sous régime sans fer (<2mg de fer/kg) (Référence TD.90262 – ssniff GmbH) de souriceaux dès leur sevrage et pour une durée de 4 semaines.

## 2. Modèles murins transgéniques

Les modèles murins inactivés pour *Hif1a* et *Hif2a* ont été obtenus par croisements successifs des individus (de fond C57BL/6) de génotype HIF1α<sup>lox/lox</sup> et HIF2α<sup>lox/lox</sup> avec des souris possédant une recombinaison cre sous le contrôle du promoteur du Lysozyme M (ou LysMcre). Les souris initiales ont été gracieusement fournies par le Dr Carole Peyssonnaud (Institut Cochin U1016 INSERM, CNRS UMR8104, Paris).

Le modèle inactivé pour *Epor* a été obtenu par croisements successifs des souris LysMcre décrites ci-dessus avec des souris *Epor*<sup>lox/lox</sup> gracieusement fournie par le Pr Christian Grimm (Lab for Retinal Cell Biology – LRCB, Department of Ophthalmology, Université de Zurich, Suisse). Celles-ci étant originellement sur fond 129S6 et nos souris LysMcre sur fond C57BL/6, les croisements ont produits un fond mixte C57BL/6;129S6.

Le génotype des différentes souris a été obtenu par PCR classique à partir d'ADN extrait d'une biopsie de queue des souriceaux. Les amorces utilisées pour les génotypages sont décrites dans le tableau ci-dessous :

Gène	Séquence <i>forward</i>	Séquence <i>reverse</i>
<i>Hif1a</i>	GCAGTTAAGAGCACTAGTTG	GGAGCTATCTCTCTAGACC
<i>Hif2a</i>	CAGGCAGTATGCCTGGCTAATTCCAGTT	CTTCTTCCATCATCTGGGATCTGGGACT
<i>Epor</i>	CTCCAGCCCAGTCCACCAACTGGG	GGCGGGTAGTGGTACAGCACTTGCC
<i>LysMcre</i>	CAG GGT GTT ATA AGC AAT CCC	CCT GGA AAA TGC TTC TGT CCG

**Tableau 1 Séquences des amorces utilisées en PCR pour le génotypage des souris**

### 3. Biotinylation *in vivo*

Le suivi et l'évaluation de la durée de vie des GR endogènes a été effectué grâce à une méthode de biotinylation *in vivo* en deux étapes comme l'ont décrite Saxena *et al*<sup>199</sup>.

L'injection intraveineuse (via le plexus rétro-orbital) de N-hydroxysuccinimide-biotine (Sigma Aldrich) a été réalisée sous anesthésie générale par isoflurane et locale par tétracaïne 1% après avoir été initialement re-suspendu en DMSO et dilué en solution saline.

La première étape consistait en trois injections quotidiennes consécutives de 1 mg de biotine, suivies sept jours plus tard d'une injection de 0,6 mg de biotine.

Deux microlitres de sang ont été prélevés dans la veine caudale à différents moments après la deuxième étape de biotinylation et la proportion des différentes sous-populations érythrocytaires ainsi marquées a été analysée par cytométrie de flux (Gallios, Beckman Coulter) après réaction de la biotine avec la streptavidine liée à l'allophycocyanine (APC) (Invitrogen).

### 4. Réalisation des banques de sang murin et transfusion

Pour la réalisation de banques de sang, les souris ont été anesthésiées par kétamine (100mg/kg) et xylazine (10mg/kg). Le sang est ensuite prélevé de manière aseptique par ponction cardiaque avec une seringue contenant 50µl de solution de citrate-phosphate-dextrose-adénine (CPDA) (Sigma Aldrich). Un volume de CPDA est ajouté à 9 volumes de sang. Par après, le sang total recueilli est leuco-réduit à l'aide d'un filtre spécifique (PALL Corporation). Enfin, le sang est centrifugé à 600 g pendant 15 minutes et l'hématocrite ajustée à 75 % avec du plasma contenant le CPDA avant d'être stocké dans l'obscurité et à 4°C pour différentes périodes.

Avant la transfusion, les GR ont été marqués par une solution à 20 µM de 5(6)-CarboxyFluorescein diacetate N-Succinimidyl Ester (CFDA-SE ou CFSE) (Sigma Aldrich). Après deux lavages en PBS, ils sont repris en milieu RPMI (pour Roswell Park Memorial Institute) à 75% de l'hématocrite final afin d'être transfusés.

Les suspensions de GR ont été transfusées par le plexus rétro-orbitaire et le suivi effectué par le prélèvement de 2µl de sang à la veine caudale à 5min, 2h et 24h après la transfusion. Les réticulocytes de ces échantillons ont ensuite été marqués par incubation dans 50µL d'une solution de thioflavine T (Sigma Aldrich) à la concentration de 0.03% poids/volume pendant

7min, à température ambiante et à l'obscurité (méthode adaptée de celle publiée par Sage et al.<sup>200</sup>).

La proportion de réticulocytes et de GR circulants positifs pour le CFSE a été mesurée par cytométrie de flux (Gallios, Beckman Coulter) à 5min, 2h et 24h après la transfusion. La proportion de GR éliminés de la circulation est définie par la formule :

$$100 - \left( \frac{\% \text{ de GR CFSE}^+ \text{ de l'échantillon à un temps donné}}{\% \text{ de GR CFSE}^+ \text{ à 5min après la transfusion}} \times 100 \right).$$

### 5. Mesure de l'EPO plasmatique

Le taux d'érythropoïétine plasmatique a été déterminé par ELISA à l'aide du kit « *Quantikine® mouse erythropoietin immunoassay kit* » ((R&D Systems). Le sang prélevé sur héparine a été centrifugé pendant 20min à 2000g dans les 30min suivant le prélèvement afin de prélever le plasma.

### 6. Hémogrammes, mesure de l'hémoglobine et analyses biochimiques

Les hémogrammes ont été réalisés sur un automate ProCyte Dx® (Laboratoires IDEXX) à partir de 55µL de sang total prélevé à la veine mandibulaire.

En pré-transfusionnel, la concentration d'hémoglobine dans le sang total a été déterminée par dosage colorimétrique à 540 nm (Infinite® 200 PRO, Tecan) en utilisant le réactif de Drabkin (Sigma Aldrich). Des solutions étalons ont été préparées à partir de la dilution de sang de souris témoin dont la concentration en hémoglobine a été mesurée sur l'automate ProCyte Dx®.

Les dosages de fer et ferritine ont été réalisés sur plasma (prélevé comme décrit au point 5. ci-dessus) à l'aide d'un automate Olympus AU400 (Centre de Recherche sur l'Inflammation de l'Institut Claude Bernard-UMR 1149 INSERM à Paris).

### 7. Quantification du fer dans les différents organes

La quantification du fer total des organes a été réalisée grâce à l'adaptation d'une méthode précédemment décrite<sup>201</sup>. Après sacrifice des souris, les différents organes ont été prélevés et lysés par une solution de NaOH. La moelle est obtenue par lavage de la cavité médullaire d'un fémur par 1mL de PBS.

Après extraction à chaud du fer par une solution de KMnO<sub>4</sub> à 4,5%, le fer libre est oxydé en Fe<sup>3+</sup> par l'acide ascorbique et chélaté par une solution de ferrozine (Sigma Aldrich). Cette dernière réaction permet le dosage colorimétrique à 560 nm (Infinite® 200 PRO, Tecan) du fer

total après réalisation d'une gamme d'étalonnage. Les concentrations en fer ont été normalisées pour la quantité de protéine mesurée par la méthode de Bradford.

#### 8. Erythrophagocytose *in vivo*

A un temps donné après transfusion de GR marqués au CFSE, les souris ont été sacrifiées et les différents organes ont été prélevés. La rate a été dissociée sur gentleMACS Octo dissociator (Miltenyi Biotec) en présence de 1mg de Collagenase D à 37°C et pendant 15minutes. Le foie a été dissocié sur le même appareil en utilisant une lyse enzymatique par *Liver Dissociation Kit* (Miltenyi Biotec). La moelle est obtenue par lavage de la cavité médullaire d'un fémur par 1mL de PBS-SVF2%-EDTA2mM.

Après lyse des GR (*RBC Lysis Buffer*, Invitrogen), 1 million de cellules a été incubé avec un anti-CD16/CD32 (clone 2.4G2) pour bloquer les récepteurs aux IgG. Elles ont ensuite été marquées à 4°C avec le panel d'anticorps suivant : F4/80 (eF450) (clone BM8, Ebioscience), CD11b (AF700) (cloneM1/70, BD Biosciences), CD11c (BV510) (clone N418, SONY), Ly-6G (PerCep) (clone 1A8, SONY), Ly-6C (PeCy7) (clone HK1.4, SONY). Une sélection négative des lignées T, B et NK a été effectuée grâce aux marquages de ces populations par les anticorps suivants : CD3ε (APC) (clone 145-2C11, SONY), CD19 (APC) (clone 6D5, SONY) and NK1.1 (APC) (clone PK136, SONY). Les isotypes contrôles utilisés étaient : anti-rat IgG2aK (eF450) (clone eBR2a, BD Biosciences), anti-rat IgG2b (AF700) (clone eB149/10H5, Ebioscience), anti-armenian hamster IgG (BV510) (clone HTK 888, SONY), anti-rat IgG2a (PerCep) (clone RTK2758, SONY), anti-rat IgG2c (PeCy7) (clone RTK4174, SONY), anti-armenian hamster IgG (APC) (clone HTK 888, SONY), anti-rat IgG2a (APC) (clone RTK2758, SONY) et anti-mouse IgG2a (APC) (clone MOPC-173, SONY). Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie en flux (CMF) (Gallios, Beckman Coulter).

#### 8. Analyse de rétention des globules rouges dans les organes ou « Slice blood »

A un temps donné après transfusion de GR marqués au CFSE, les souris ont été sacrifiées et les différents organes ont été prélevés et finement découpés avant d'être dissociés dans 1mL de PBS-SVF2%-EDTA2mM. La moelle est obtenue par lavage de la cavité médullaire d'un fémur par 1mL de PBS-SVF2%-EDTA2mM. Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, les surnageants (contenant les GR) ont été collectés, filtrés (40µm) et 1 million de cellules a été marqué par une solution de Draq5 (dilution au 1000<sup>e</sup>) afin d'exclure les cellules phagocytaires. Un prélèvement de sang veineux a été prélevé 5minutes après la transfusion



et au moment du sacrifice. Les différents échantillons ont été analysés en CMF (Gallios, Beckman Coulter).

Un facteur d'enrichissement a été déterminé selon la formule suivante :

$$\left( \frac{\% \text{ de cellules CFSE}^+ \text{ Draq5}^- \text{ dans l'organe à un temps donné}}{\% \text{ de GR CFSE}^+ \text{ circulant au même temps}} \times 100 \right)$$

## 7. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Prism (version 5.01 ; GraphPad Software Inc.). La distribution gaussienne a été évaluée à l'aide du test de normalité de D'Agostino-Pearson. Les moyennes de deux groupes ont été comparées à l'aide du test t de Student pour données non-appariées. Lorsque la comparaison de moyennes concernait plus de deux groupes expérimentaux, un test d'analyse de variance (ANOVA) a été utilisé, suivi du test post-hoc indiqué. Une valeur p inférieure à 0,05 a été jugée statistiquement significative. La signification statistique est indiquée par les symboles \* (\*p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\*p<0,001).

## Résultats

### Partie A : Modulation physiologique de l'élimination érythrocytaire en réponse à l'anémie : Preuve de concept et résultats principaux

L'hypothèse centrale de ce travail est l'existence d'une régulation physiologique de l'élimination érythrocytaire en réponse à l'anémie. Dans cette section, nous présentons les données qui supportent cette hypothèse et qui permettent d'identifier les principaux éléments mécanistiques dans un modèle murin *in vivo*.

Ces résultats ont fait l'objet de la rédaction d'un manuscrit (repris en **Annexe 1**) qui sera prochainement soumis pour publication.

#### 1. Modulation de l'élimination des globules rouges sénescents endogènes par l'EPO

Cette hypothèse a été d'abord explorée dans le contexte de l'élimination des GR endogènes sénescents en évaluant les modifications de leur durée de vie en circulation.

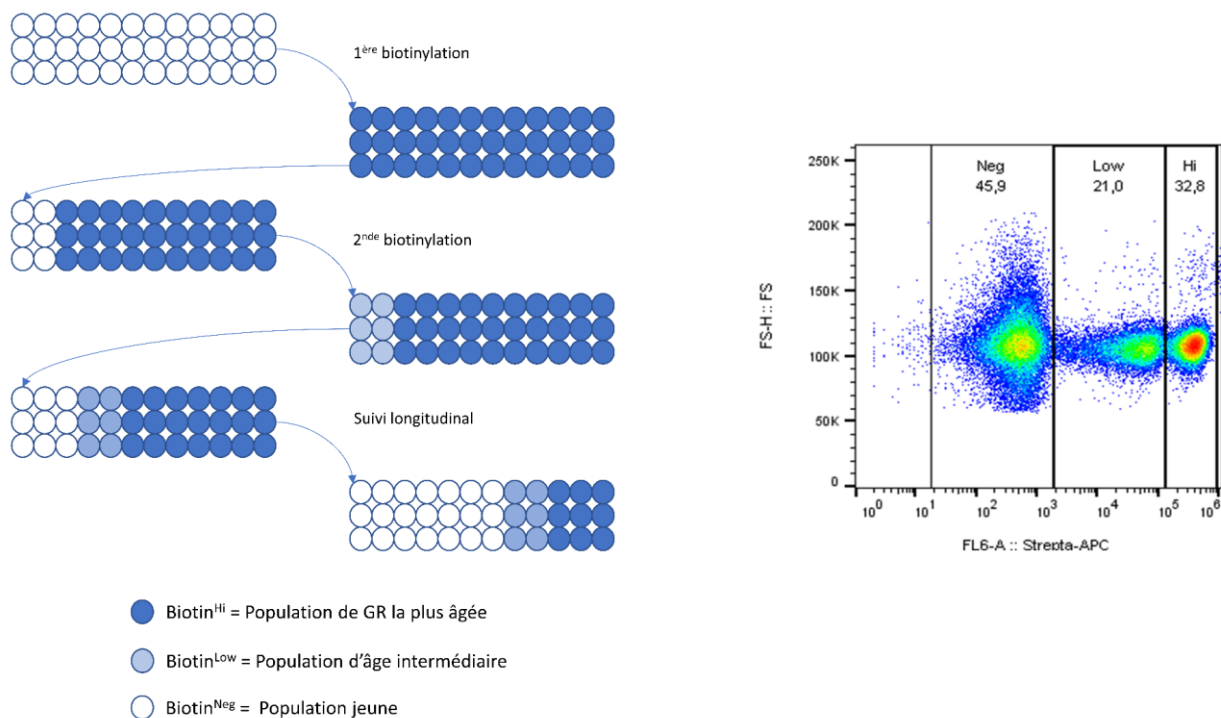
##### 1.1 Méthode de suivi des globules rouges endogènes

Afin d'éviter l'utilisation difficile de réactifs radioactifs tout en utilisant une méthode de marquage stable dans le temps, nous avons adapté une méthode publiée<sup>199</sup> de biotinylation *in vivo* pour le suivi des GR. La N-hydroxysuccinimide-biotine (mentionnée ci-après comme biotine) se lie aux groupements amines primaires des protéines et permet un marquage global non-spécifique des protéines de surface des cellules circulantes dont les GR sont les plus nombreux.

La méthode utilisée consiste en un marquage en deux étapes des GR circulants. Cette méthode consiste en une première étape d'administration d'une forte dose de biotine permettant la saturation de l'ensemble des GR circulants. Après quelques jours, une partie de ces GR marqués va physiologiquement être remplacée. Une deuxième étape de biotinylation à une dose moindre va se fixer de manière homogène à cette nouvelle population sans marquer la première population déjà saturée. Nous pouvons donc définir et suivre trois populations érythrocytaires : une fortement marquée en biotine (Biotin<sup>Hi</sup>) comprenant les GR les plus âgés progressivement éliminés, une faiblement marquée (Biotin<sup>Low</sup>) comprenant des GR d'âge intermédiaire n'étant donc ni produits ni éliminés et une population non marquée (Biotin<sup>Neg</sup>) comprenant les GR nouvellement produits et donc les plus jeunes. Figure 25

L'évaluation de la durée de vie par la décroissance d'une population marquée est par essence relative. En effet, le pourcentage de cellules suivies est déterminé par rapport à l'ensemble des cellules analysées. La comparaison entre plusieurs groupes suppose donc la stabilité de la (des) population(s) non suivie(s). La définition d'une population stable (Biotin<sup>Low</sup>), ni produite, ni éliminée, permet donc de normaliser l'évaluation de la dynamique des autres populations. Nous avons donc suivi le taux de production défini comme le rapport des GR produits sur le normalisateur  $\left(\frac{Biotin^{Neg}}{Biotin^{Low}}\right)$  ainsi que le taux d'élimination de la population la plus âgée défini comme le rapport  $\frac{Biotin^{Hi}}{Biotin^{Low}}$ .

Enfin, pour reproduire l'augmentation du taux d'EPO observé en cas d'anémie, nous avons traité les souris par analogue de l'EPO (darbepoïétine 10µg/kg tous les 3 jours, mentionné ci-après comme ASE pour agent stimulant l'érythropoïèse) et suivi l'évolution des différentes populations.

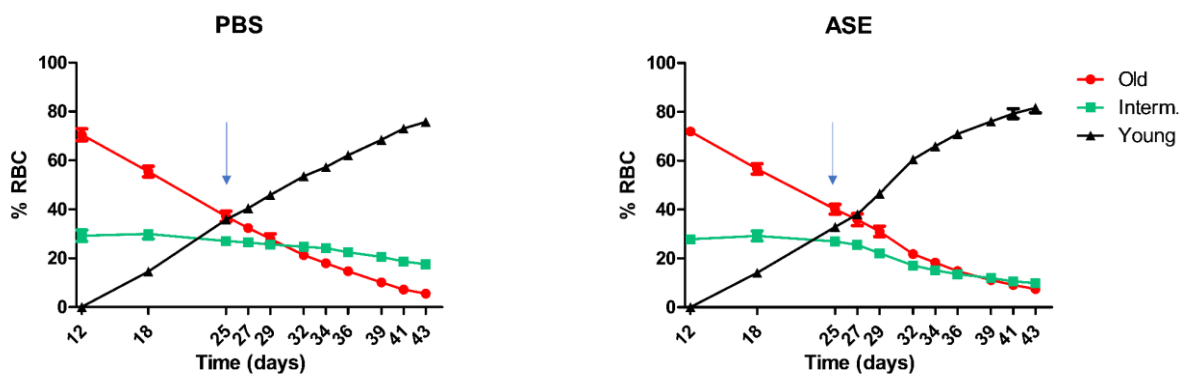


**Figure 25** Schéma de la technique de biotinylation en deux étapes et image représentative de l'aspect en cytométrie en flux après révélation par la streptavidine

## 1.2 Résultats

Dans le groupe contrôle (traité par solution saline ou PBS pour *Phosphate-Buffered Saline*), on retrouve l'évolution physiologique décrite dans la littérature avec un équilibre entre production et élimination se manifestant par une décroissance linéaire ( $r^2 = 0,94$ ) de la population la plus âgée et un accroissement en miroir de la population jeune non marquée. (Figure 26). Ceci correspond au remplacement de 2% ( $2,2 \pm 0,06\%$ ) de la population érythrocytaire chaque jour, menant dans notre modèle à une durée de vie de 43,5 jours (41,9-45,1 jours IC 95%).

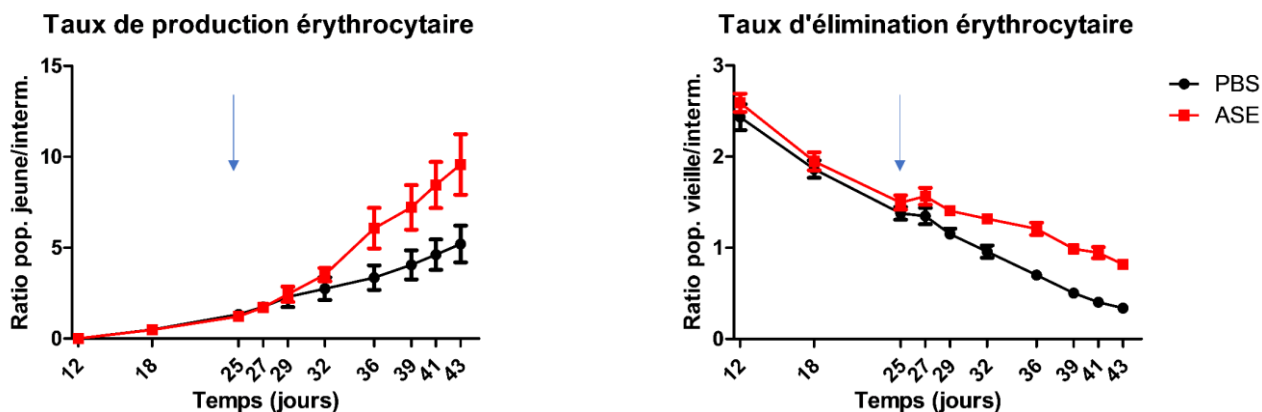
Comme attendu, le traitement par ASE entraîne une augmentation de la production érythrocytaire détectable dès 4 jours après l'initiation du traitement, se traduisant par une augmentation du rythme d'accroissement de la population jeune. (Figure 26) De même, l'hématocrite en fin de traitement est significativement plus élevé dans le groupe traité par ASE que dans le groupe contrôle ( $80,71 \pm 0,89\%$  et  $47,63 \pm 0,59\%$  respectivement  $p < 0,0001$ ).



**Figure 26** Evolution relative représentative des différentes populations érythrocytaires. La flèche bleue marque le début du traitement par PBS ou ASE.  $n=4$  souris par groupe.

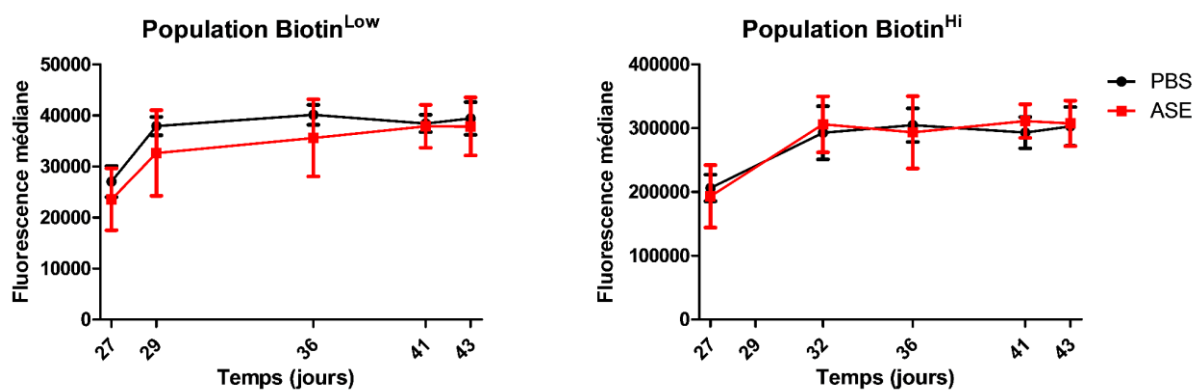
Les modifications des courbes des populations âgée et d'âge intermédiaire reflètent une dilution par cette augmentation de la population jeune et donc la nécessité d'une normalisation.

Après normalisation, on observe effectivement une différence de taux de production à 4 jours après l'initiation du traitement. La modification du taux d'élimination est quant à elle plus précoce puisqu'une différence est graphiquement visible dès le 2<sup>e</sup> jour de traitement même si la significativité ( $p < 0,001$ ) n'est atteinte qu'au 7<sup>e</sup> jour de traitement (c'est-à-dire le jour 32 contre au jour 36 pour la production). (Figure 27)



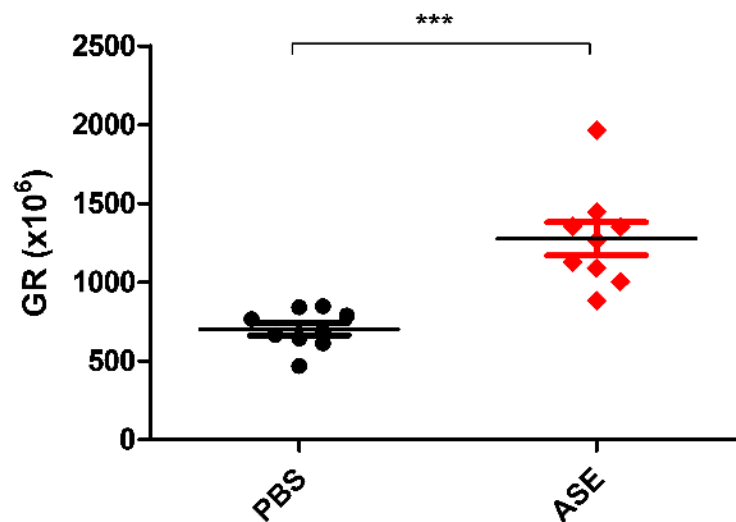
**Figure 27 Effet du traitement par ASE sur les taux de production et d'élimination érythrocytaire.** Le taux de production érythrocytaire est défini comme le rapport du % représentée par la population jeune normalisée par celui de la population d'âge intermédiaire. Le taux d'élimination comme le rapport de la population la plus âgée normalisée de la même manière. La flèche bleue marque le début du traitement par PBS ou ASE. n= 6-8 souris par groupe.

La stabilité de la fluorescence relative de chaque population permet de raisonnablement écarter la possibilité d'un résultat faussé par le transfert d'un GR d'une population à une autre par changement de sa fluorescence. (Figure 28)



**Figure 28 Evolution de la fluorescence en CMF des différentes populations après révélation à la streptavidine.** n= 6-8 souris par groupe.

Le traitement par ASE induit donc bien une différence dans le taux d'élimination de la population de GR la plus âgée. Nous avons confirmé cet effet en déterminant le nombre absolu de GR Biotin<sup>Hi</sup> circulants dans chaque souris. En combinant l'estimation du volume sanguin total de la souris basé sur le poids, la réalisation d'une numération sanguine et les fractions relatives de chaque population érythrocytaire par CMF, nous avons pu déterminer que la quantité de GR âgés en circulation était significativement plus élevée dans le groupe traité par ASE comparé au contrôle ( $12,75 \cdot 10^8 \pm 1,05 \cdot 10^8$  vs  $7,01 \cdot 10^8 \pm 0,49 \cdot 10^8$  GR respectivement  $p=0,0001$ ). (Figure 29).



**Figure 29** Nombre absolu de GR de la sous-population la plus âgée en fin de période de traitement streptavidine.  $n=6-8$  souris par groupe. \*\*\*,  $p<0,001$

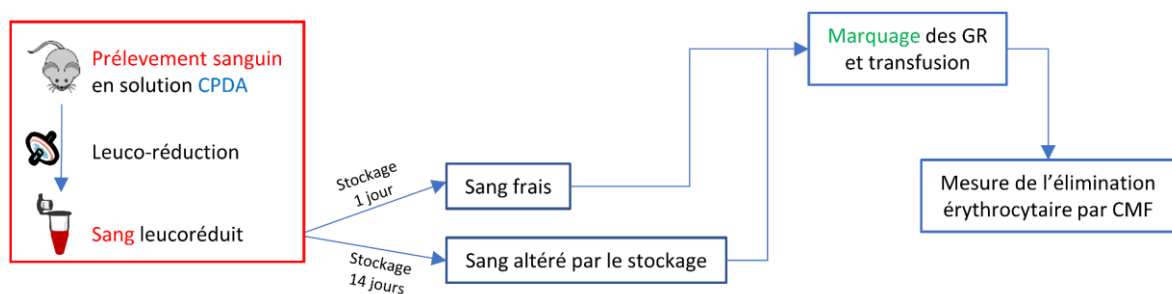
Étant donné que la population Biotin<sup>Hi</sup> n'est plus produite après la première étape de biotinylation, sa présence en plus grande quantité ne peut être que le reflet d'une diminution de son élimination sous l'effet du traitement par ASE.

## 2. Principaux éléments de mécanistique de la modulation de l'élimination érythrocytaire dans un modèle murin de transfusion sanguine

L'élimination normale des GR endogènes ne concernant que 2% de la population chaque jour. De ce fait, une diminution, voire même la suppression de l'élimination érythrocytaire, ne serait aisément détectable qu'après plusieurs jours de traitement : ce qui rend l'analyse fine des mécanismes impliqués difficile. Nous avons donc utilisé un modèle de transfusion de GR stockés. Celui-ci permet l'apport d'une quantité de GR dont une partie importante (25-35% selon des travaux précédents<sup>202,203</sup>) est supposée être éliminée et dont les modifications de l'élimination sont donc plus sensiblement détectées.

### 2.1 Méthode

Ce modèle comprend la réalisation d'une banque de sang murin prélevé, déleucocyté et stocké en solution de CPDA, une solution anticoagulante de conservation utilisée en pratique transfusionnelle humaine<sup>204,205</sup>. Le sang est stocké pendant une durée de 14 jours avant d'être marqué au CFDA-SE et transfusé. (Figure 30) Dans ces conditions, cette durée de stockage produit des GR altérés représentant l'équivalent expérimental de concentrés globulaires humains en fin de durée légale de stockage<sup>202</sup>.



**Figure 30** Schéma général de la procédure de transfusion

Le CFDA-SE pénètre par diffusion dans la cellule où son groupement acétate est clivé par les estérases intracellulaires. Le clivage libère le groupement *Succinimidyl Ester* qui se lie de manière covalente aux protéines à l'intérieur du GR. Ce marquage n'est pas membranaire et n'altère donc pas les mécanismes de reconnaissance du GR et sa stabilité intracellulaire prévient toute contamination de GR circulants non-marqués. Bien que l'élimination ait été évaluée à différents temps après la transfusion et pour des raisons de clarté et de cohérence

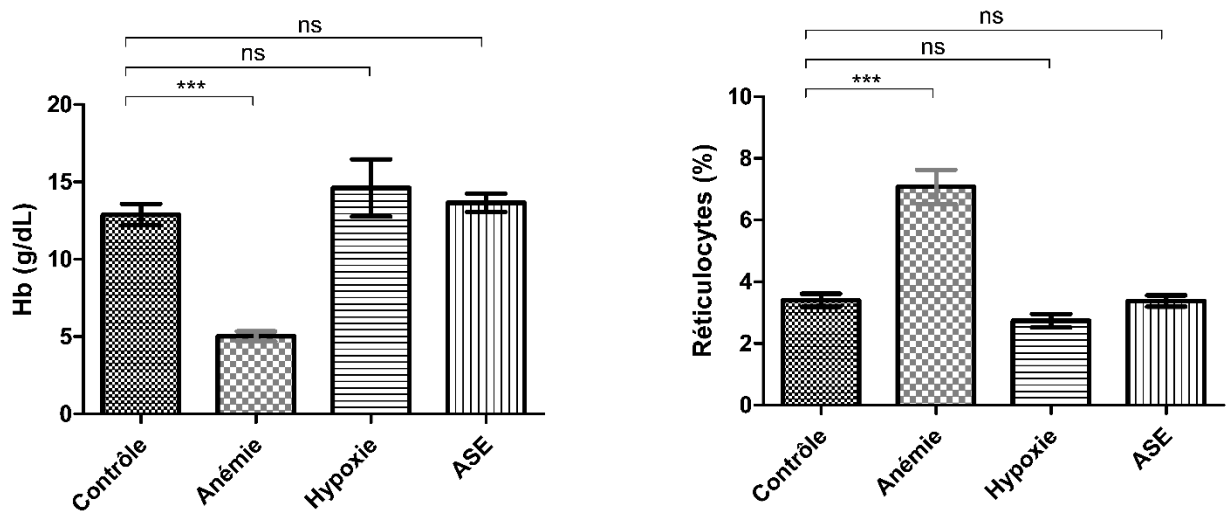
des résultats avec la littérature humaine, seule l'élimination à 24h sera exposée et discutée dans ce manuscrit.

Par ailleurs, un marquage à la Thioflavine T permet l'exclusion des réticulocytes<sup>200</sup> limitant ainsi les biais de comparaison dus à une différence de stimulation érythropoïétique entre les groupes expérimentaux.

Enfin, et sauf mention contraire, nous avons transfusé 200µL de solution à 50% d'hématocrite en GR marqués.

## 2.2 Résultats

Les taux d'hémoglobine et les réticulocytes (reflets de la stimulation érythropoïétique) de chacun des modèles décrits ci-après sont repris dans la figure 31.



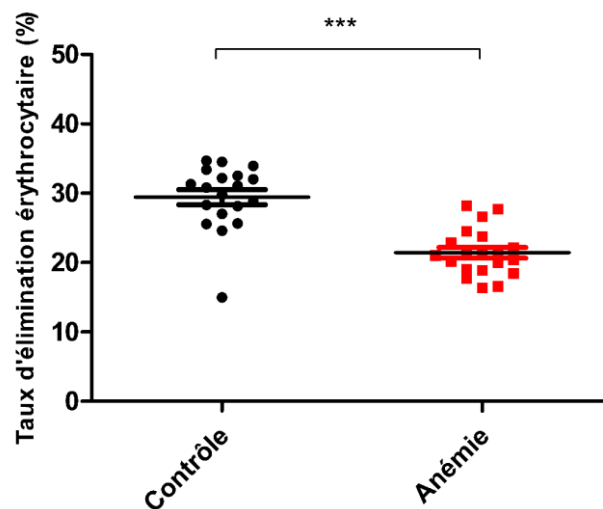
**Figure 31** Hémoglobine et réticulocytose pré-transfusionnelles des différents modèles n= 6-13 souris par groupe. Moyenne ± SEM. \*\*\*, p<0,001 ; ns, non significatif.



### 2.2.1 Effet de l'anémie

Nous avons premièrement étudié l'effet de l'anémie aiguë induite par phlébotomie sur l'élimination de GR transfusés.

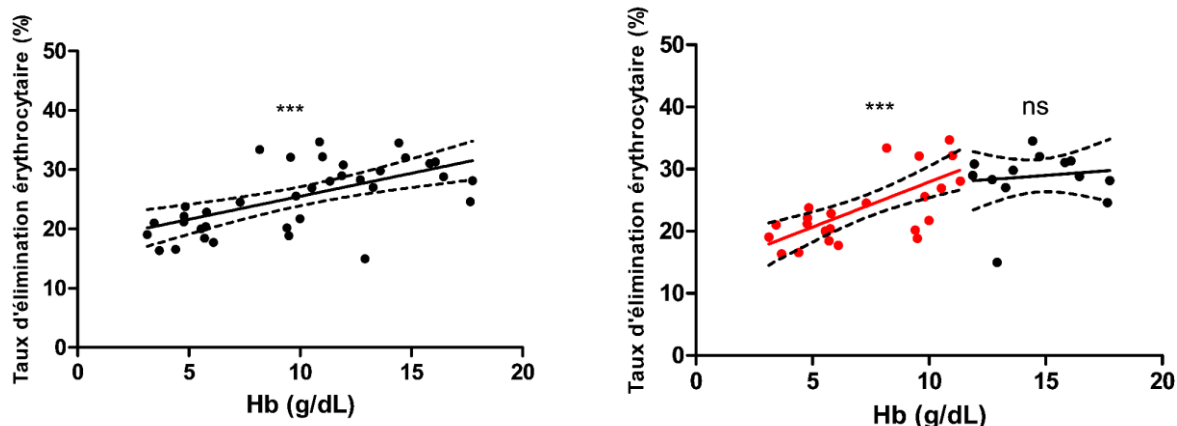
En comparaison du receveur non-anémié, la transfusion de GR stockés chez un receveur anémié en réduit l'élimination de 27%. En effet, l'élimination y représente  $21,4 \pm 3,4\%$  des GR transfusés contre  $29,4 \pm 1,1\%$  chez le receveur non-anémié ( $p < 0,0001$ ). (Figure 32)



**Figure 32 Effet de l'anémie aiguë sur le taux d'élimination érythrocytaire.** n= 20 souris par groupe. Moyenne  $\pm$  SEM. \*\*\*,  $p < 0,001$ .

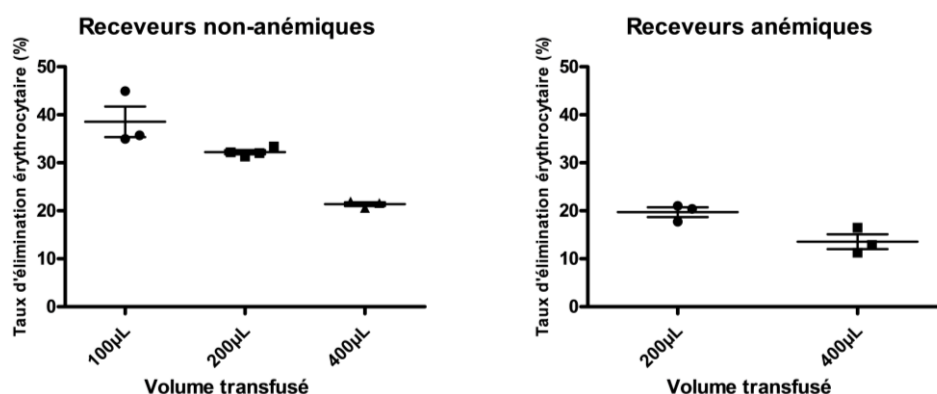
L'augmentation d'EPO étant liée au degré d'anémie, nous avons effectué différents volumes de phlébotomies afin de réaliser une gamme d'hémoglobine pré-transfusionnelle. Il existe une corrélation linéaire négative entre le taux d'hémoglobine pré-transfusionnelle et la diminution de l'élimination érythrocytaire (Spearman  $r = 0,63$ ,  $p < 0,0001$ ). (Figure 33, gauche)

De manière intéressante, cette corrélation n'est présente que chez les souris anémiques. L'anémie a été définie comme une hémoglobine plus basse que la borne inférieure de l'intervalle de référence à 95%, c'est-à-dire inférieure à 11,36g/dL dans notre modèle (basé sur les valeurs de la figure 31). En analyse en sous-groupe, on retrouve donc une corrélation linéaire négative entre l'hémoglobine pré-transfusionnelle et la diminution de l'élimination érythrocytaire chez les souris anémiques (Spearman  $r = 0,66$ ,  $p = 0,0003$ ) mais pas chez les souris non-anémiques (Spearman  $r = 0,15$ ,  $p = 0,58$ ). (Figure 33, droite)



**Figure 33** Corrélation entre hémoglobine pré-transfusionnelle et élimination érythrocytaire. A gauche, corrélation globale (n=40). A droite, corrélation selon le statut anémique (rouge, n=25) ou non (noir, n=15) des souris. Droite de régression linéaire et intervalle de confiance à 95%. Régression linéaire et corrélation : ns, non significatif ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .

Enfin, en pratique transfusionnelle courante et malgré les recommandations de ne transfuser qu'une unité de concentré globulaire à la fois<sup>206,207</sup>, la quantité transfusée est proportionnelle à la profondeur de l'anémie et le volume de GR transfusés en est donc d'autant plus important. Nous avons donc étudié l'impact du volume transfusionnel sur l'élimination érythrocytaire et observé une corrélation inverse entre le volume transfusé et l'élimination érythrocytaire tant chez le receveur non-anémié qu'anémié. (Figure 34)



**Figure 34** Effet du volume transfusé sur l'élimination érythrocytaire du receveur non-anémique (gauche) et anémique (droite). Moyenne  $\pm$  SEM. n= 3-4 souris par groupe.

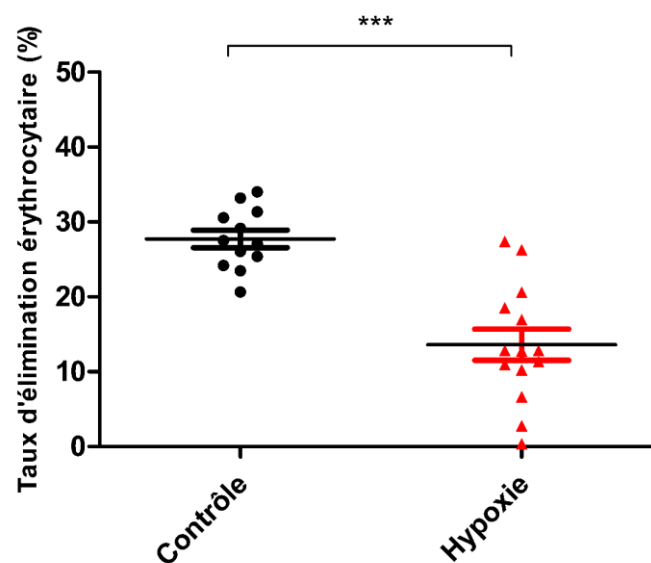
Ces résultats indiquent que l'anémie aiguë induit une diminution de l'élimination des GR transfusés proportionnelle à la baisse de l'hémoglobine et donc augmente l'efficacité transfusionnelle de notre modèle. Par ailleurs, l'efficacité transfusionnelle semble proportionnelle au volume transfusé.

### 2.2.2 Effet de l'hypoxie

Au vu du lien physiologique entre la concentration en hémoglobine et le taux d'hématocrite, nous avons étudié l'importance de l'hématocrite sur cet effet et en particulier l'implication éventuelle de sa baisse sur les capacités de filtration splénique.

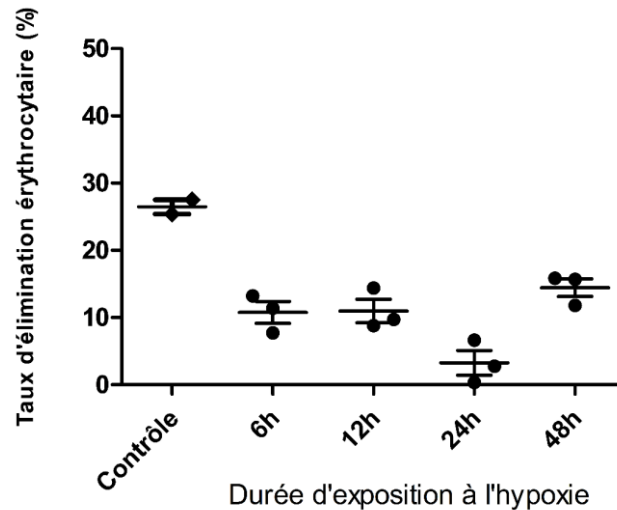
Pour supprimer l'effet anémie tout en conservant la perception d'un manque d'apport en oxygène, nous avons soumis des souris non-anémiques à une hypoxie normobare (correspondant à une diminution de la proportion d'oxygène dans l'air inspiré mais avec une pression partielle en oxygène préservée).

L'exposition de souris non-anémiques à un taux d'oxygène inspiré de 10% (simulant une diminution à 75mmHg de pression partielle en oxygène de l'air inspiré) diminue l'élimination érythrocytaire de 51%. L'élimination concerne  $13,6 \pm 2,1\%$  des GR transfusés au receveur hypoxique en comparaison de  $27,7 \pm 1,2\%$  des GR chez le receveur non-anémique non-hypoxique ( $p < 0,0001$ ). (Figure 35)



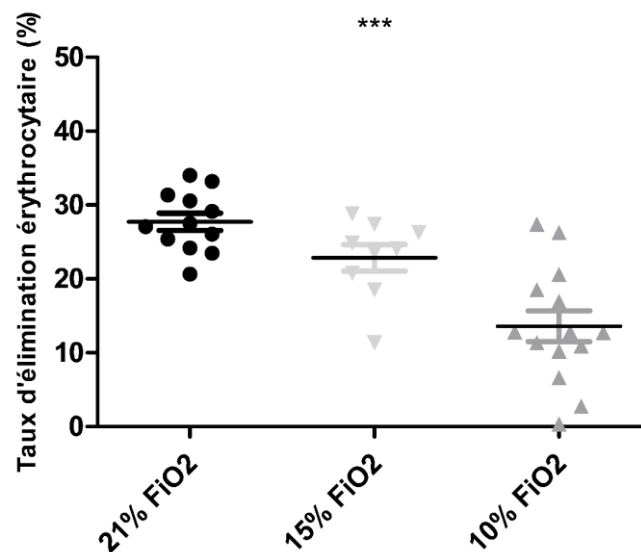
**Figure 35** Effet de l'hypoxie sur le taux d'élimination érythrocytaire. n= 12-14 souris par groupe. Moyenne  $\pm$  SEM. \*\*\*,  $p < 0,001$

Dans un deuxième temps, nous avons déterminé l'effet de la durée d'exposition pré-transfusionnelle à l'hypoxie sur l'élimination. De manière intéressante, nous avons observé un effet variable selon le temps d'exposition débutant dès 6h d'exposition pour atteindre un maximum à 24h et diminuant ensuite au temps 48h. (Figure 36)



**Figure 36** Effet de la durée d'exposition à l'hypoxie sur l'élimination érythrocytaire. n=3 souris par groupe.

Enfin, de manière similaire à l'anémie, il existe un effet dose entre l'importance de l'hypoxie et la diminution de l'élimination des GR transfusés ( $p < 0,001$ ). (Figure 37)



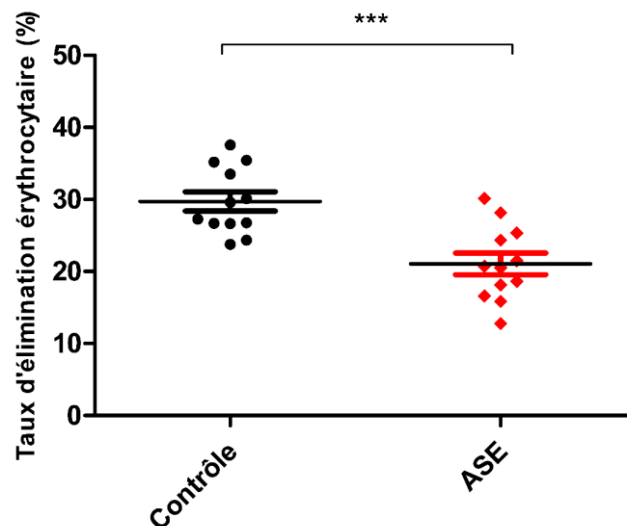
**Figure 37** Effet de l'importance de l'hypoxie sur l'élimination érythrocytaire. FiO2, fraction inspirée en oxygène. N=9-14 souris par groupe. Effet dose-réponse : \*\*\*,  $p < 0,001$ .

Ces résultats démontrent la persistance d'une diminution de l'élimination chez les souris hypoxiques non-anémiques et indiquent donc que la baisse de l'hématocrite n'est pas responsable de ce phénomène.

### 2.2.3 Effet isolé de l'érythropoïétine

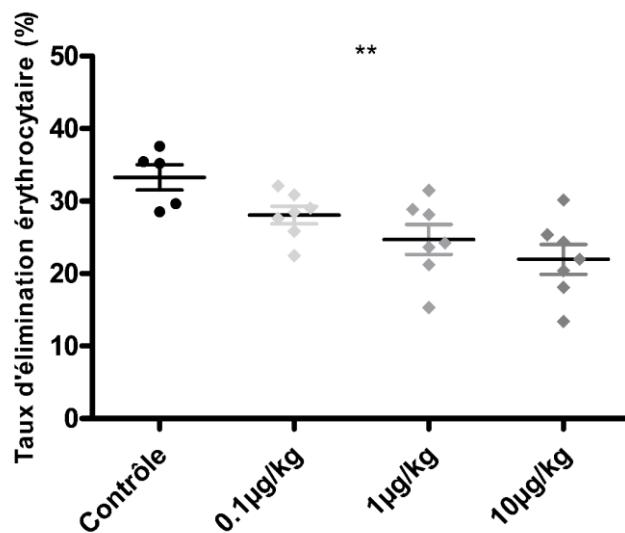
Nous avons ensuite vérifié l'hypothèse que l'augmentation de l'EPO circulante induite par l'anémie, l'hypoxie ou à une autre cible/gène cible de l'hypoxie induisait la diminution de l'élimination érythrocytaire observée. Pour ce faire nous avons étudié l'effet d'un traitement par ASE isolément de celui de l'anémie ou de l'hypoxie.

L'administration, à un receveur non-anémique et non-hypoxique, d'ASE (darbepoïétine 10µg/kg i.p.) 24h avant la transfusion induit une diminution relative de l'élimination des GR transfusés de 29% en comparaison du receveur traité par PBS. L'élimination concerne 29,7±1,3% des GR chez le receveur contrôle contre 21,1±1,5% chez le receveur traité par ASE ( $p=0,0003$ ). (Figure 38)



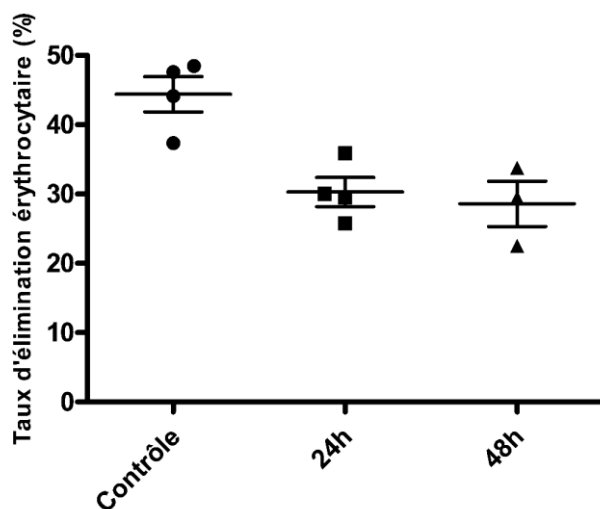
**Figure 38** Effet du traitement par ASE sur l'élimination érythrocytaire. n=12 souris par groupe. Moyenne ± SEM. \*\*\*,  $p<0,001$

Ici aussi, il existe un lien significatif entre la dose administrée et la diminution de l'élimination engendrée ( $p=0,0018$ ). (Figure 39)



**Figure 39** Effet de la dose d'ASE sur l'élimination érythrocytaire. n= 7 souris par groupe. Moyenne  $\pm$  SEM. Effet dose-réponse : \*\*, p<0,01

Alors que la temporalité de l'administration ne semble pas avoir d'effet à la dose et avec la molécule utilisée. (Figure 40)



**Figure 40** Effet de la temporalité d'administration de l'ASE sur l'élimination érythrocytaire. Dix microgrammes de darbépôïétine ont été administrés 24h ou 48h avant la transfusion. n= 4 souris par groupe. Moyenne  $\pm$  SEM.

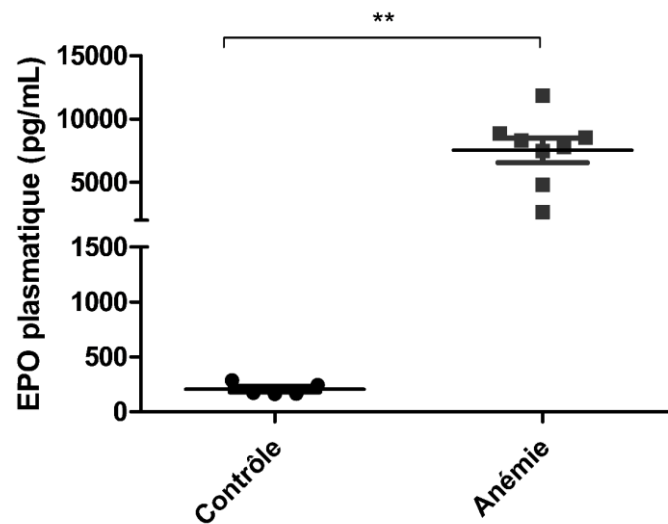
Ces résultats démontrent que la présence d'EPO seule est suffisante pour engendrer une diminution dose-dépendante de l'élimination érythrocytaire.

#### 2.2.4 Effet de la neutralisation de l'EPO endogène

Après avoir démontré que le traitement à l'EPO suffit à diminuer l'élimination érythrocytaire, nous avons étudié l'effet de sa neutralisation en condition normale et en réponse à l'anémie.

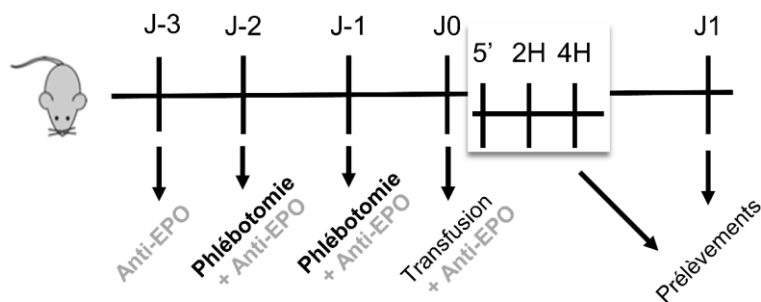
Pour neutraliser l'EPO, nous avons utilisé un sérum de lapin immunisé contre l'EPO. Afin de déterminer la quantité d'EPO à neutraliser, nous avons préalablement déterminé la concentration plasmatique d'EPO dans notre modèle de phlébotomie ( $207 \pm 25$  pg/mL chez la souris contrôle contre  $7529 \pm 975$  pg/mL chez la souris anémiée par phlébotomie.  $p=0,0001$ ).

(Figure 41)



**Figure 41** Dosage de l'EPO plasmatique chez la souris anémique ou non.  $n= 5-8$  souris par groupe. Moyenne  $\pm$  SEM. \*\*,  $p<0,01$

Une dose de sérum suffisante pour neutraliser 3 fois la quantité totale calculée d'EPO circulante a été administrée selon le schéma suivant :

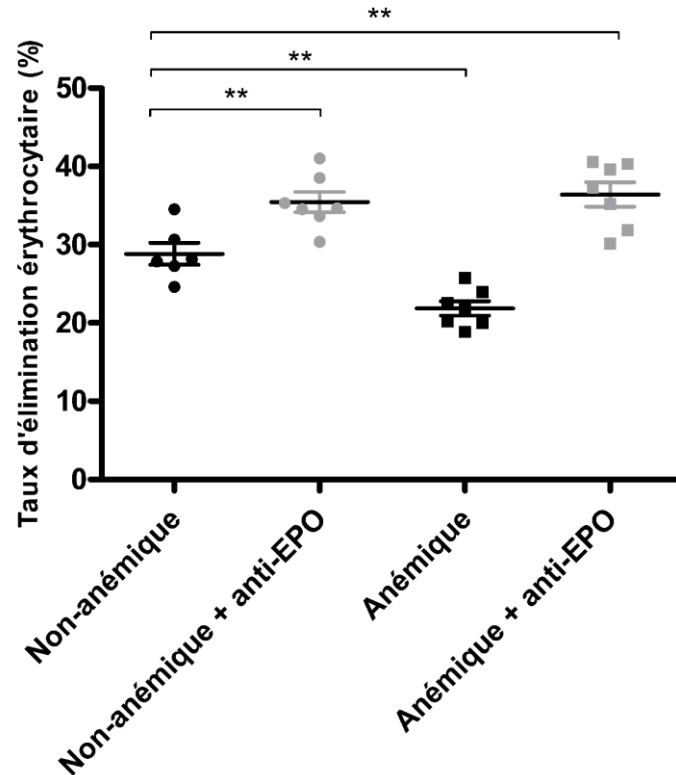


**Figure 42** Schéma d'administration du sérum anti-EPO

Afin de s'assurer que l'administration du sérum n'induit pas de variation de l'élimination des GR normaux, nous avons évalué l'effet de son administration sur l'élimination de GR non-altérés (prélevés, stockés et marqués moins de 24H avant la transfusion). Le taux d'élimination était similaire dans les groupes traités ou non (inférieur à 6% des GR transfusés).

L'effet de la neutralisation de l'EPO a ensuite été évalué sur l'élimination des GR altérés chez un receveur anémié ou non. La neutralisation de l'EPO abolit l'effet de diminution de l'élimination liée à l'anémie. De manière intéressante, on observe même une augmentation de l'élimination à la fois chez le receveur non-anémique ( $35,4 \pm 1,3\%$ ) et anémique ( $36,4 \pm 1,6\%$ ) en comparaison du receveur non-anémique contrôle ( $28,8 \pm 1,4\%$ ,  $p < 0,01$ ). (Figure 43)





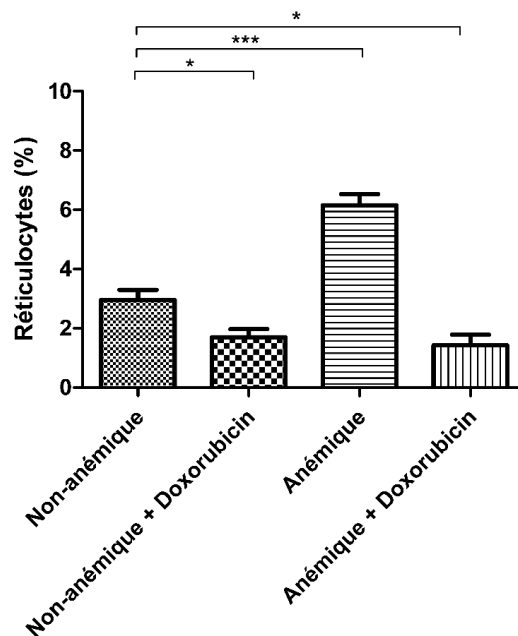
**Figure 43** Effet de la neutralisation de l'EPO circulant sur l'élimination érythrocytaire et la réponse à l'anémie. n= 6-7 souris par groupe. Moyenne  $\pm$  SEM. \*\*,  $p < 0,01$

Ces résultats indiquent que l'EPO est indispensable à la modulation de l'élimination induite par l'anémie, mais également que l'élimination basale des GR, chez le receveur non-anémique, est également modulée par le niveau d'EPO circulant.

### 2.2.5 Rôle de l'érythropoïèse de stress

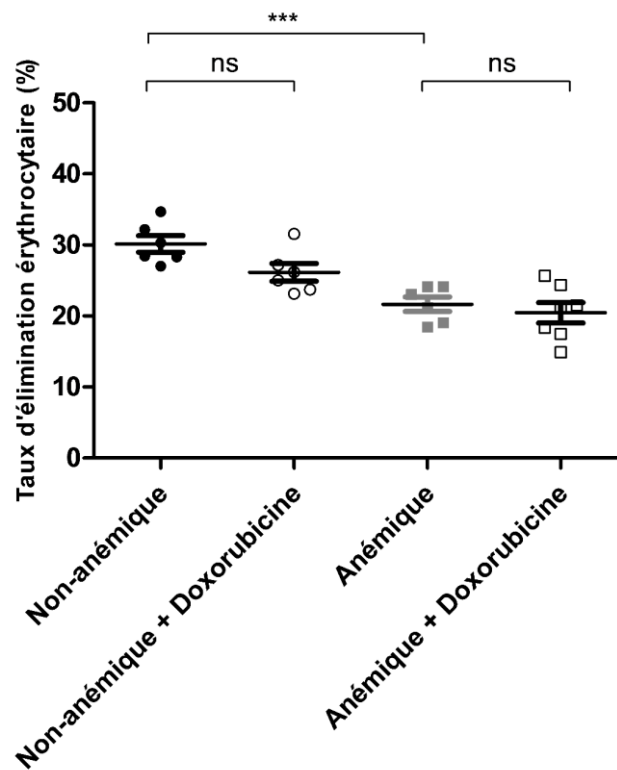
L'ensemble des trois modèles expérimentaux utilisés (anémie aiguë, hypoxie et administration d'ASE) induisant une stimulation de l'érythropoïèse de stress, nous avons ensuite évalué la possibilité que la réduction de l'élimination érythrocytaire induite par l'anémie soit dépendante de l'activité érythropoïétique.

L'érythropoïèse de stress a été inhibée grâce à un traitement par doxorubicine dont l'efficacité a été confirmée par la suppression de la production érythrocytaire en pré-transfusion, mesurée par le pourcentage de réticulocytes circulants. (Figure 44)



**Figure 44 Réticulocytose pré-transfusionnelle.** n= 6-7 souris par groupe. Moyenne  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0.05$  ;  
\*\*\*,  $p < 0,001$

Il n'y a pas de différence significative entre l'élimination érythrocytaire des souris traitées ou non par doxorubicine et ce traitement n'altère pas la réduction de l'élimination érythrocytaire induite par l'anémie (Figure 45).



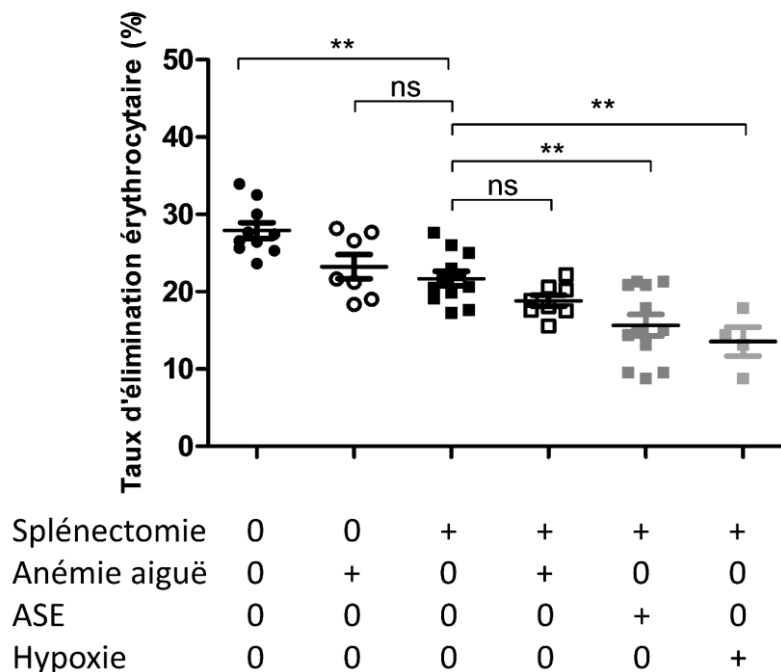
**Figure 45** Effet de l'inhibition de l'érythropoïèse de stress sur l'élimination érythrocytaire et la réponse à l'anémie. n= 6-7 souris par groupe. Moyenne  $\pm$  SEM. ns, non-significatif ; \*\*\*,  $p < 0,001$

Ceci indique que la modulation de l'élimination érythrocytaire est indépendante de l'activité de production érythropoïétique.

### 2.2.6 Rôle de la rate dans la réduction de l'élimination érythrocytaire

La rate est considérée comme étant un organe majeur de l'élimination des GR transfusés. Nous avons donc étudié l'effet de l'anémie aiguë, l'hypoxie et le traitement par ASE chez le receveur splénectomisé afin de déterminer si leur impact est spécifiquement splénique ou distribué aux différents organes de l'élimination érythrocytaire.

Comme attendu, nous avons observé une diminution de l'élimination érythrocytaire chez la souris splénectomisée. Cette élimination est diminuée de 22% et représente  $21,7 \pm 0,9\%$  des GR chez la souris splénectomisée contre  $27,9 \pm 1,0\%$  chez la souris normale ( $p < 0,001$ ). De manière intéressante, l'élimination est encore plus diminuée chez les souris splénectomisées traitées par ASE ( $15,7 \pm 1,4\%$ ) ou hypoxiques ( $13,6 \pm 1,9\%$ ) en comparaison des splénectomisées non-anémiques ( $21,7 \pm 0,9\%$  des GR,  $p < 0,01$ ). Tandis que l'anémie aiguë n'a pas montré d'effet significatif, bien qu'une réduction de l'élimination ait été observée ( $18,8 \pm 2,1\%$ ). (Figure 46)



**Figure 46** Effet de la splénectomie et de sa combinaison avec l'anémie, le traitement par agent stimulant l'érythropoïèse (ASE) et l'hypoxie sur l'élimination érythrocytaire. n= 4-12 souris par groupe. Moyenne  $\pm$  SEM. Test post-hoc de Bonferroni. ns, non-significatif ; \*\*,  $p < 0,01$

Ces résultats confirment que la rate a un rôle significatif dans l'élimination érythrocytaire mais que l'élimination persistante après splénectomie est sensible à une modulation par les signaux liés à l'anémie.

En conclusion de cette partie des résultats, nous avons démontré l'existence d'un mécanisme de réduction de l'élimination érythrocytaire en réponse à l'administration d'ASE pour les GR sénescents et en réponse à l'anémie, à l'hypoxie et à l'administration d'ASE dans notre modèle de transfusion. Cette réduction est proportionnelle à l'intensité du stimulus appliqué, indépendante de l'érythropoïèse et partiellement indépendante de l'activité splénique. L'utilisation du sérum anti-EPO a permis l'identification de l'EPO comme élément suffisant et nécessaire à la réalisation de ce mécanisme.

## Partie B : Effet du statut en fer sur l'élimination érythrocytaire

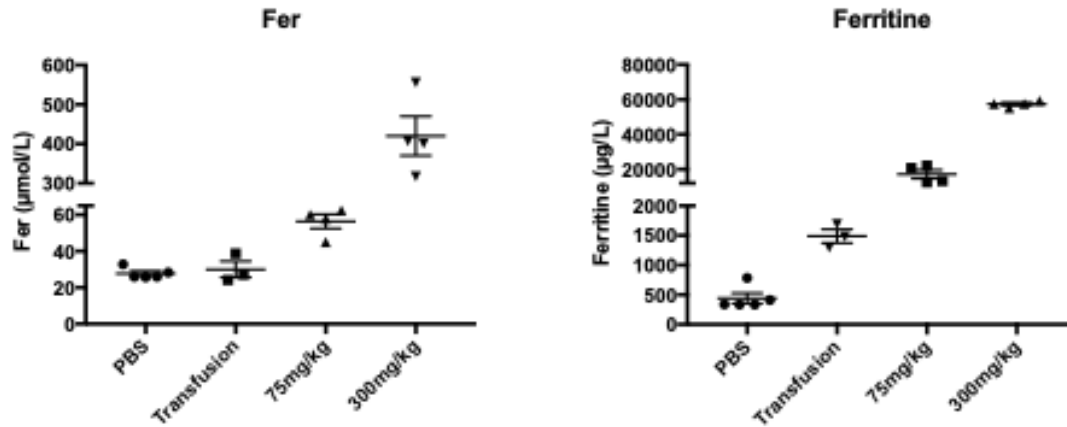
Le rôle central des macrophages dans le métabolisme du fer et les effets du fer sur l'activité macrophagique sont bien établis. D'autre part les implications du contenu en fer des GR sont nombreuses notamment dans le cadre de l'hémochromatose post-transfusionnelle. Nous avons donc étudié si le statut en fer du receveur avait un impact sur l'élimination érythrocytaire et sa réponse à l'anémie. Les résultats présentés dans ce chapitre ont été générés lors de l'encadrement de Ghiles Larbi, étudiant en Master 2, qui a réalisé les expériences.

### 1. Effet de la surcharge en fer

Nous avons utilisé deux modalités différentes d'induction de la surcharge. Premièrement, nous avons établi un modèle d'hémochromatose secondaire à la transfusion sanguine. Les souris ont ainsi reçu deux transfusions par semaines pendant 4 semaines. Deuxièmement, nous avons établi un modèle de surcharge par injection de fer à différentes doses. Les doses étudiées étaient de 75mg/kg et de 300mg/kg et basées sur la littérature pour induire des surcharges significatives sans morbi-mortalité<sup>208</sup>.

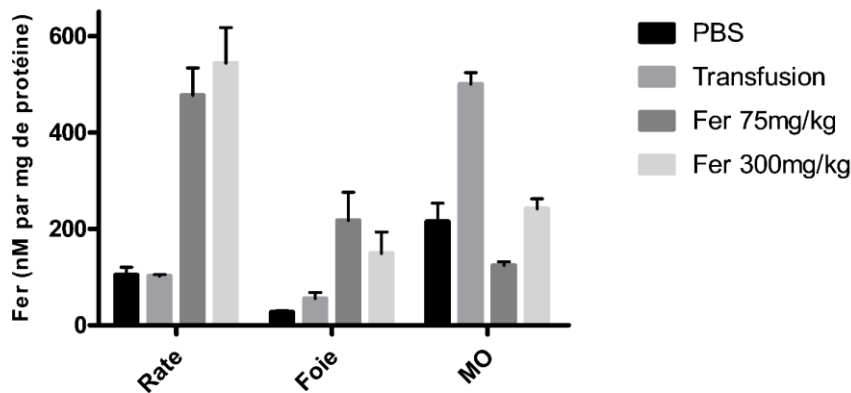
Nous avons d'abord caractérisé l'importance et la distribution de la surcharge ainsi induite.

Afin de quantifier l'impact des traitements de surcharge, des dosages biochimiques plasmatiques ont été réalisés. Un niveau élevé de fer et de ferritine plasmatique a été observé dans les différents modèles de surcharge. L'importance de la surcharge est moindre dans le modèle de transfusion (ferritine à 3,4 fois la normale) que pour l'injection de fer où elle est majeure (ferritine à 57 et 130 fois la normale de manière dose-dépendante). (Figure 47)



**Figure 47** Dosage du fer et de la ferritine plasmatique dans les différents modèles de surcharge. Moyenne  $\pm$  SEM. n=4-5 souris par groupe

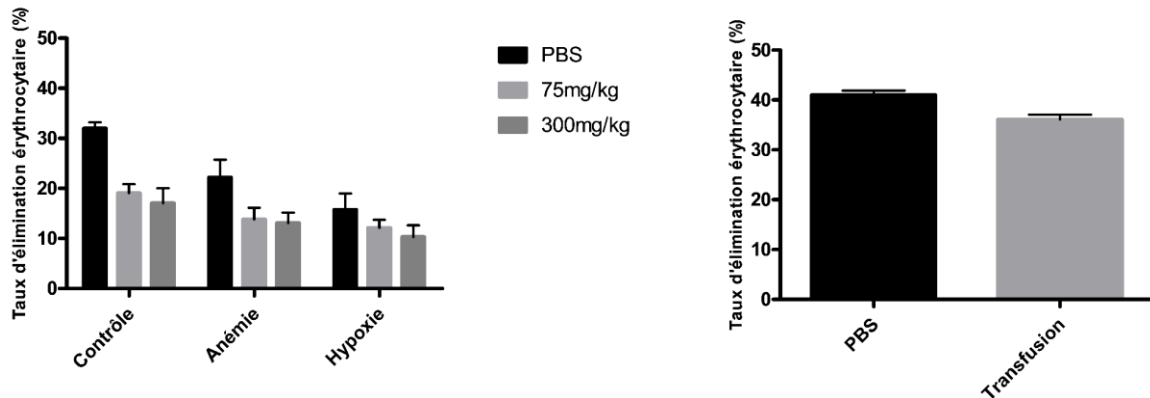
Il existe donc une surcharge majeure dans l'ensemble des modèles. Afin d'en définir la répartition, un dosage colorimétrique du fer contenu dans différents organes (normalisé pour la quantité de protéines de l'échantillon analysé afin de tenir compte des différences de poids entre les souris) a été réalisé en collaboration avec Marion Falabrègue (Institut Imagine, Paris). (Figure 48)



**Figure 48** Dosage du fer total normalisé pour la quantité de protéines dans les organes. Moyenne  $\pm$  SEM. n=4-5 souris par groupe

Cet excès de fer est réparti de manière inhomogène entre les organes et selon les conditions. De manière intéressante, on observe une augmentation majeure et attendue du fer dans la rate et le foie pour les conditions de fer parentéral mais pas dans la moelle osseuse. Tandis que, de manière inattendue, l'augmentation est médullaire dans le modèle de transfusion sans augmentation du fer splénique.

Ces souris ont ensuite été transfusées afin de déterminer l'effet des différentes conditions sur l'élimination basale et sur la réponse à l'anémie et à l'hypoxie. (Figure 49)



**Figure 49** Effet de la surcharge en fer selon la dose et la modalité d'induction (fer parentéral à gauche, transfusions multiples à droite) sur l'élimination érythrocytaire. Moyenne±SEM. n=3-6 souris par groupe

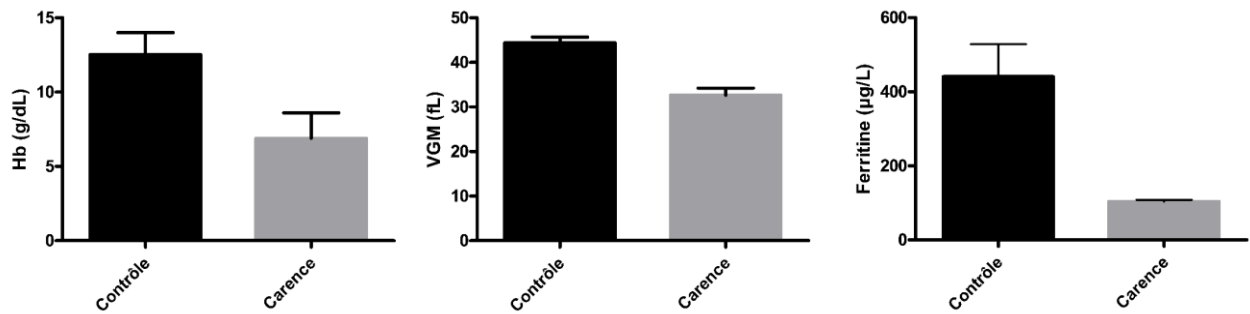
L'ensemble des conditions de surcharge induit une diminution de l'élimination érythrocytaire à l'état basal. Dans le cadre de l'administration parentérale de fer, l'effet est dose-dépendant. Cette diminution est encore renforcée par la combinaison de la surcharge avec l'anémie et l'hypoxie.

Ces résultats dans deux modalités de surcharges différentes indiquent que la surcharge martiale diminue l'élimination érythrocytaire.



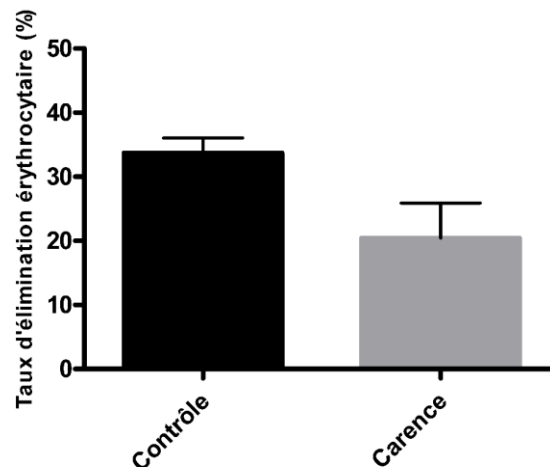
## 2. Effet de la carence en fer

Après avoir étudié l'effet d'un excès de fer, nous avons également étudié la situation inverse qu'est l'anémie induite par une carence en fer d'origine alimentaire. Les souris présentaient alors une anémie microcytaire avec une ferritine abaissée par rapport aux contrôles, signant son origine ferriprive. (Figure 50)



**Figure 50 Valeurs d'hémoglobine (Hb), volume globulaire moyen (VGM) et ferritine plasmatique chez les souris carencées et leur contrôle.** Moyenne±SEM. n=3-4 souris par groupe

Enfin, l'élimination érythrocytaire tend à être diminuée chez les souris anémiques par carence en fer indiquant que la carence martiale n'altère pas la réponse à l'anémie. (Figure 51)



**Figure 51 Effet de l'anémie par carence en fer sur l'élimination érythrocytaire.** Moyenne±SEM. n=3-4 souris par groupe

Cette deuxième partie des résultats concerne l'étude de l'effet de différents niveaux en fer sur l'élimination érythrocytaire. Deux modèles de surcharge (administration parentérale de fer et transfusions multiples) ont été investigués. Ils diffèrent dans l'importance de la surcharge et sa répartition entre les organes mais induisent tous une diminution de l'élimination érythrocytaire chez la souris non-anémique. Par ailleurs, la réduction supplémentaire de l'élimination en réponse à l'anémie et l'hypoxie est préservée. L'effet de la carence en fer a été étudié dans un modèle d'anémie par carence martiale induite par l'alimentation et a également montré une diminution de l'élimination érythrocytaire.



## Partie C : Éléments complémentaires d'exploration de la mécanistique de désactivation de l'élimination érythrocytaire et de sa modulation pathologique

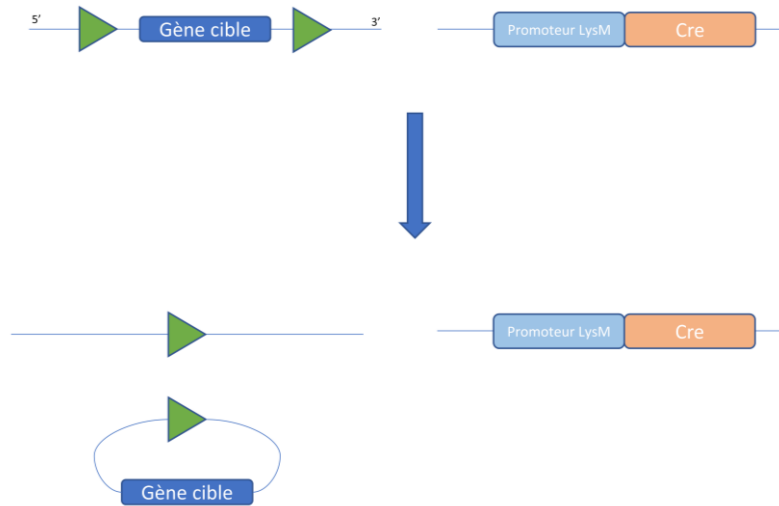
Après avoir démontré l'existence d'un mécanisme de régulation de l'élimination érythrocytaire par l'EPO, nous avons tenté de définir les cibles cellulaires et moléculaires de son action ainsi que l'effet d'éventuels cofacteurs liés à l'hypoxie.

### 1. Effet additif complémentaire de l'hypoxie

L'hypoxie induit une réduction de l'élimination érythrocytaire de 50% tandis que l'administration d'ASE à des doses largement supra-physiologiques la diminue de 29%. Bien que l'hypoxie ne soit pas nécessaire à la modulation de l'élimination, nous avons étudié la possibilité qu'elle exerce un effet additif ou potentialisateur à l'effet de l'EPO.

Le macrophage étant l'acteur principal de l'érythrophagocytose, il était la cible désignée de cet effet potentiel. Dans ce contexte et afin d'étudier l'effet de l'hypoxie spécifiquement sur le métabolisme du macrophage, nous avons utilisé un modèle de souris transgénique déficient, spécifiquement dans la lignée myéloïde, pour HIF gracieusement fourni par le Dr Carole Peyssonnaud (Institut Cochin, Paris).

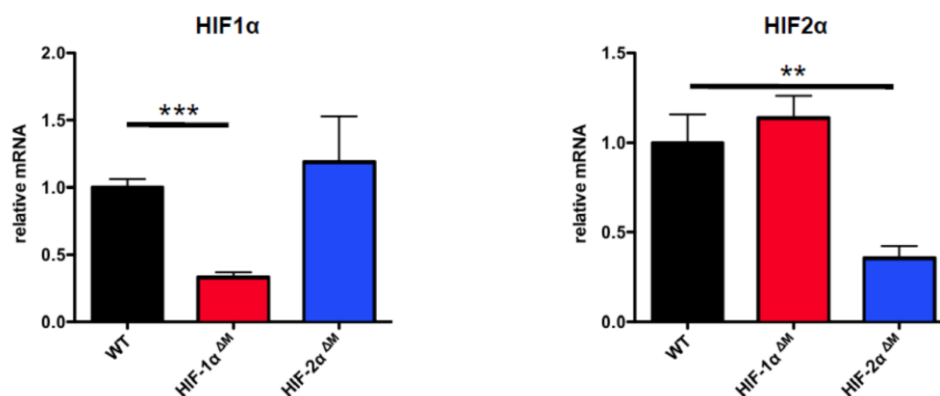
Le transgène utilisé est un système de recombinaison Cre-Lox. L'utilisation d'une *cre recombinase* exprimée sous le contrôle du promoteur du Lysozyme M (ou LysMcre) permet de spécifiquement cibler la lignée mono-macrophagique (monocytes, macrophages, granulocytes et certaines cellules dendritiques)<sup>209</sup>. Les cellules exprimant la recombinase en combinaison de gènes cibles (HIF1 $\alpha$  et HIF2 $\alpha$ ) flanqués de séquences lox P (les cibles de la cre recombinase) seront donc génétiquement invalidés pour ces gènes. (Figure 52)



**Figure 52** Représentation du système cre-lox

Nous avons effectué, au départ des individus fournis par Carole Peyssonaux de nombreux croisements afin d'obtenir les génotypes suivant :  $HIF1\alpha^{lox/lox} HIF2\alpha^{WT/WT}$ ,  $HIF1\alpha^{WT/WT} HIF2\alpha^{lox/lox}$  et  $HIF1\alpha^{lox/lox} HIF2\alpha^{lox/lox}$  combinés ou non à la présence de la recombinaise LysMcre.

L'efficacité de la délétion dans les macrophages spléniques a déjà été évaluée par qPCR par l'équipe de Carole Peyssonaux<sup>210</sup> et repris ci-dessous :

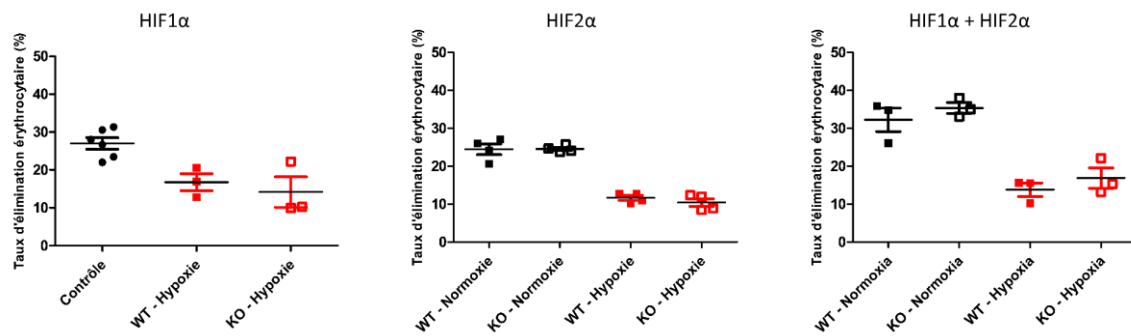


**Figure 53** Quantification en qPCR de l'expression de l'ARNm de HIF1α (à gauche) et HIF2α (à droite) dans les macrophages spléniques. \*\*,  $p < 0,01$  ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . (Issu de Mathieu et al. Haematologica (2014)).

La quantification de la déplétion au niveau protéique n'a pas été effectué.

Nous avons préalablement vérifié que l'expression de la LysMcre seule n'induisait pas de modification de l'élimination érythrocytaire. L'élimination érythrocytaire a ensuite été comparée à l'état basal et dans le modèle d'hypoxie normobare.

Nous n'avons pas observé de différences d'élimination entre les souris transgéniques (quel que soit leur statut pour LysMcre) que ce soit à l'état basal ou en réponse à l'hypoxie. (Figure 54).



**Figure 54** Elimination érythrocytaire des souris lox/lox pour le gène indiqué selon leur statut LysMcre négatif (WT) ou positif (KO) à l'état basal et en réponse à l'hypoxie. Moyenne±SEM. n= 3 souris par groupe.

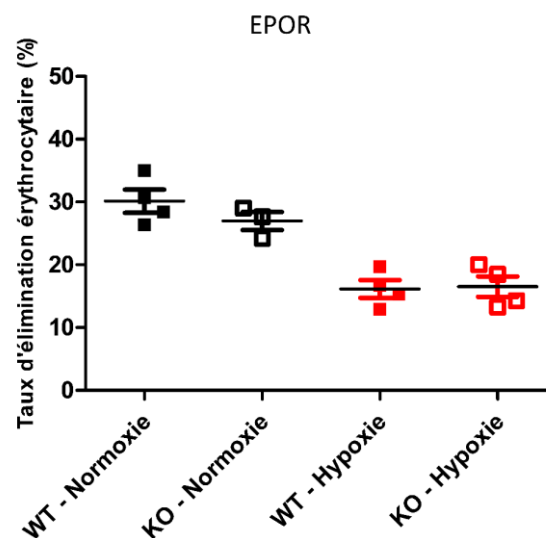
## 2. Cible cellulaire et moléculaire de l'EPO

### 2.1 Rôle de l'expression du récepteur à l'EPO sur les macrophages

L'EPO est nécessaire et suffisant à la modulation de l'élimination. Dans ce contexte, nous avons voulu déterminer quelle(s) cellule(s) étaient impactées par son effet. Nous avons également investigué la nature de sa cible moléculaire.

Dans un premier temps, nous avons utilisé un nouveau modèle murin transgénique possédant un gène du récepteur à l'EPO (*Epor*) floxé associé à la cre recombinase *LysMcre* afin de tester l'importance de l'expression d'EPOR macrophagique sur l'élimination érythrocytaire. Le transgène *Epor<sup>lox/lox</sup>* a été gracieusement fourni par le Pr Christian Grimm (Université de Zurich, Suisse) et nous avons effectué les croisements afin de comparer les génotypes d'intérêts suivants : *Epor<sup>lox/lox</sup> LysMcre<sup>pos</sup>* contre *Epor<sup>lox/lox</sup> LysMcre<sup>neg</sup>*.

Nous n'avons pas observé de différence entre les souris déficientes ou non pour l'EPOR sur les macrophages que ce soit à l'état basal ou en réponse à l'hypoxie. (Figure 55)



**Figure 55** Elimination érythrocytaire des souris *lox/lox* pour le gène indiqué selon leur statut *LysMcre* négatif (WT) ou positif (KO) à l'état basal et en réponse à l'hypoxie. Moyenne±SEM n= 4 souris par groupe.

## 2.2 Modulation de l'activité érythrophagocytaire *in vivo*

Afin d'étudier l'effet de l'EPO sur l'activité érythrophagocytaire des macrophages tissulaires mais également d'autres populations capables d'érythrophagocytose, nous avons développé un modèle d'érythrophagocytose *in vivo*.

A un temps donné après la transfusion, les souris sont sacrifiées afin d'étudier la participation relative de différentes populations cellulaires. La rate et le foie, représentant les sites classiques d'élimination, ont été prélevés et dissociés afin d'extraire les différentes populations cellulaires.

Les populations étudiées et les marqueurs de surface utilisés pour les définir en CMF sont repris dans le tableau ci-dessous :

	Ly6G	CD11c	F4/80	CD11b	Ly6C
Granulocytes	+				
C. dendritiques	-	+			
Macrophages	-	-	+	-	
Monocytes	-	-	-	+	-
Mono. Inflamm.	-	-	-	+	+

**Tableau 2 Populations cellulaires étudiées et marqueurs de surface analysés**

L'analyse de l'importance de la phagocytose relative de chacune des populations est possible grâce à la fluorescence des GR transfusés.

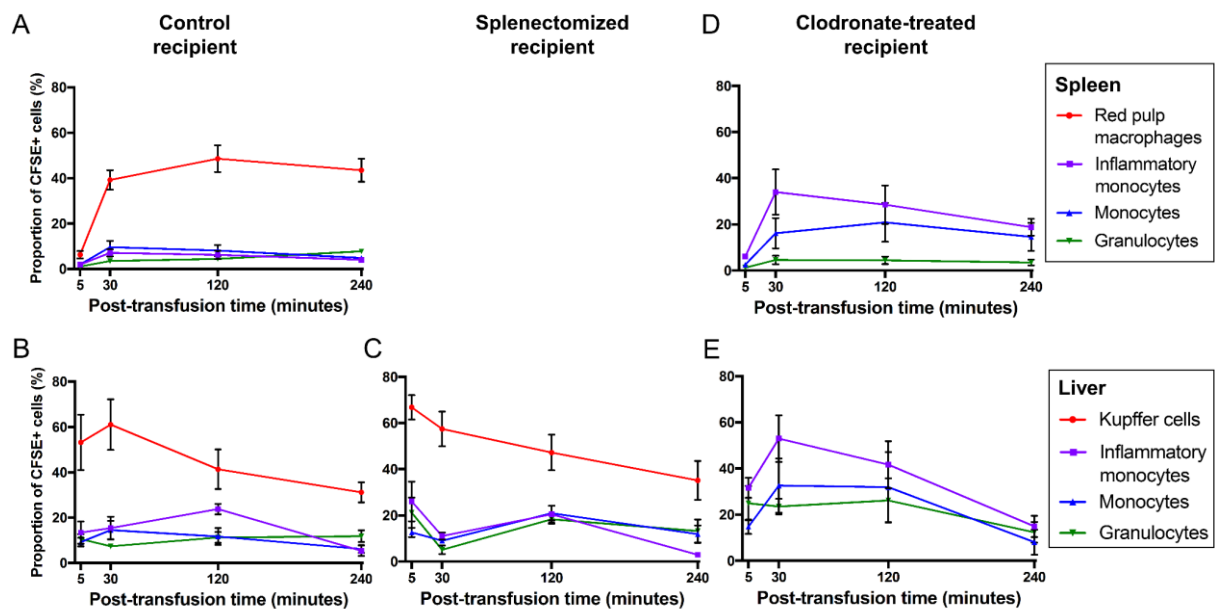
La mise au point de cette technique a permis d'étudier la répartition et la cinétique de l'érythrophagocytose des GR transfusés chez un receveur non anémique et de déterminer les populations cellulaires principalement responsables de son élimination. (Figure 56)

Ainsi, les macrophages de la pulpe rouge sont les principaux acteurs de l'érythrophagocytose splénique avec une augmentation dès 30 minutes post-transfusion et un taux de positivité pour le CFSE qui reste stable sur la durée de suivi (4h). Une activité érythrophagocytaire est détectée dans l'ensemble des autres populations étudiées mais est restée inférieure à 10% des cellules concernées pour toute la durée du suivi. Dans le foie et de manière étonnante, l'ensemble des populations est positif dès 5 minutes post-transfusion tandis que les cellules de Kupffer dominant largement, de manière attendue, en matière d'activité phagocytaire. Par ailleurs, la proportion de macrophages spléniques et hépatiques tend à diminuer au cours du suivi tandis que les autres populations restent stables.



Afin d'étudier les potentiels mécanismes d'adaptation, nous avons réalisé cette expérience chez des receveurs splénectomisés. En l'absence de rate, on observe une augmentation globale du taux d'érythrophagocytose des différentes populations des autres organes dont la cinétique d'évolution reste similaire au receveur intact.

De même, l'absence de macrophage (obtenue par le traitement des souris au clodronate liposomal<sup>211</sup>) est partiellement compensée par l'augmentation de l'érythrophagocytose des monocytes spléniques (inflammatoires ou non). Dans le foie, l'augmentation de l'activité concerne à la fois les monocytes et les granulocytes. Enfin, l'absence de macrophages semble compensée par une augmentation de la proportion des monocytes inflammatoires.

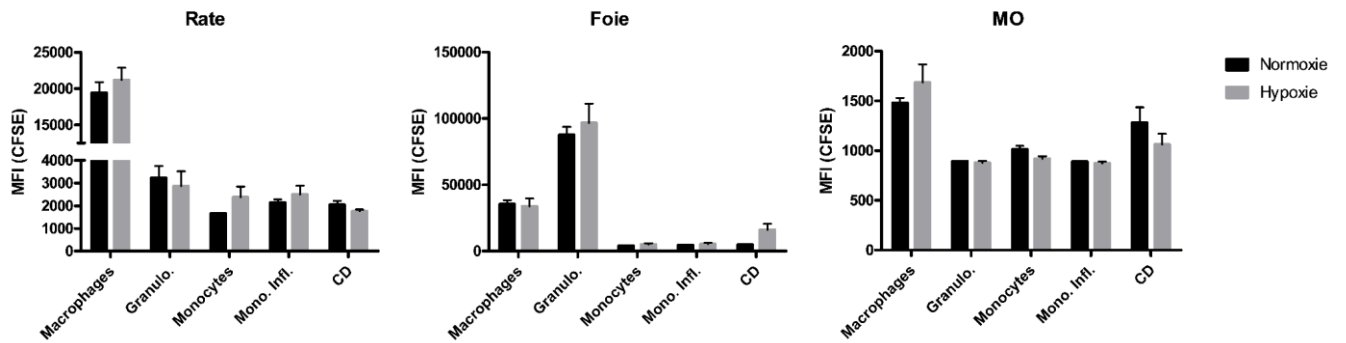


**Figure 56** Evaluation de l'érythrophagocytose post transfusionnelle dans la rate et le foie de différents modèles de receveurs. N=minimum 3 souris par point de cinétique. Données en moyenne  $\pm$  SEM. Issu de Morel, Dussiot et al. (En préparation).

Ces résultats ont été intégrés au manuscrit intitulé « *Macrophage- and spleen-dependent clearance of storage-induced micro-erythrocytes in a murine model of transfusion* » en cours de soumission qui est repris en **annexe 2**.

Ces premiers résultats nous ont permis de définir le temps après transfusion auquel nous comparerions l'effet de l'hypoxie à 2h, correspondant au moment où la phagocytose est la plus importante.

Nous avons ensuite comparé la phagocytose de ces différentes populations en réponse à l'hypoxie en ajoutant l'analyse de la moelle osseuse à celle de la rate et du foie (Figure 57).



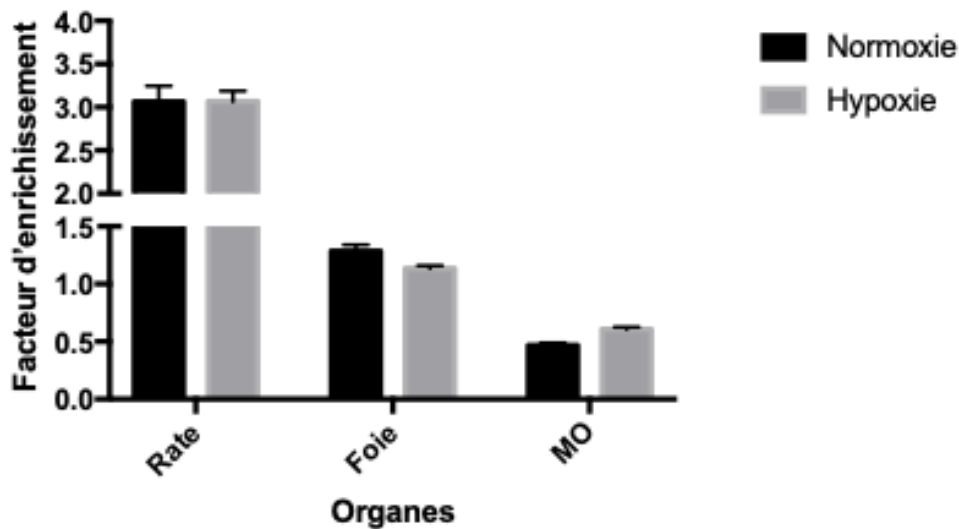
**Figure 57** Evaluation de l'érythrophagocytose tissulaire par organe et type cellulaire exprimée en intensité médiane de fluorescence (MFI) pour le marqueur érythrocytaire (CFSE) en normoxie et en hypoxie. Moyenne  $\pm$  SEM. n= 6 souris par groupe.

Sous réserve d'une variabilité importante au sein des groupes étudiés (coefficient de variation allant de 5 à 55% selon les populations), nous n'avons pas observé de différence entre l'intensité de l'érythrophagocytose tissulaire entre normoxie et hypoxie. Les données ne sont pas normalisées pour le nombre relatif de chacune des populations. Par ailleurs, la proportion des populations macrophagiques est similaire entre la normoxie et l'hypoxie.

### 3. Mécanismes effecteurs non-érythrophagocytaires de la modulation de l'élimination induite par l'EPO

En plus d'un effet sur les cellules phagocytaires, nous avons voulu étudier la possibilité d'une différence de présentation des GR altérés aux phagocytes. Dans cette optique, nous avons utilisé la technique du « Slice Blood » (également détaillée et utilisée dans le manuscrit repris en annexe 2). Cette méthode permet d'évaluer l'accumulation ou la rétention de GR non-phagocytés au sein d'un organe. Cette rétention est exprimée en « facteur d'enrichissement » de l'organe qui correspond à l'enrichissement de l'organe en cellules d'intérêt par rapport au sang circulant.

Nous avons donc comparé la rétention érythrocytaire en normoxie et en hypoxie dans la rate, le foie et la moelle. (Figure 58)



**Figure 58** Rétention érythrocytaire par organe (exprimée en facteur d'enrichissement par rapport au sang circulant) en normoxie et hypoxie. Moyenne  $\pm$  SEM. n= 6 souris par groupe.

Nous n'avons pas observé de différence significative de rétention dans les différents organes suite à l'exposition à l'hypoxie.

## Discussion

### 1. Apport de l'étude et cohésion globale

Ce travail a permis la démonstration d'un nouveau mécanisme de régulation de la biomasse érythrocytaire par la réduction de l'élimination érythrocytaire. Ce mécanisme est médié par l'EPO qui est nécessaire et suffisant à sa réalisation. Nous avons déterminé certaines de ses caractéristiques et en particulier son indépendance vis-à-vis de l'érythropoïèse et de la rate ainsi que sa proportionnalité par rapport au taux d'EPO plasmatique. Certaines conditions pathologiques particulières ont été étudiées comme l'influence d'une surcharge en fer, ou d'une carence, sur l'élimination érythrocytaire.

Enfin, les techniques développées ou adaptées (amélioration du modèle de transfusion sanguine, érythrophagocytose *in vivo*, biotinylation *in vivo*) pour la réalisation de ces expériences permettront d'étudier de nouveaux aspects des mécanismes d'élimination. Elles pourraient en effet améliorer la compréhension des mécanismes régulant l'efficacité transfusionnelle ou encore l'implication des différentes populations cellulaires dans certains processus hémolytiques de l'élimination physiologique des GR aux réactions transfusionnelles.

### 2. Cohérence interne et externe du travail

Nous avons démontré, dans 4 modèles différents et sur deux types d'altérations érythrocytaires, l'existence d'une modulation de l'élimination érythrocytaire suite aux signaux liés à l'anémie (hypoxie et augmentation de l'EPO).

#### 2.1 L'EPO comme médiateur de la modulation de l'élimination érythrocytaire

L'anémie induit une diminution de la capacité de transport en oxygène du sang. Cette diminution entraîne une diminution de l'apport tissulaire en oxygène détecté par le système des HIF qui vont induire l'augmentation de la synthèse d'EPO. Nous avons testé l'effet de chacune des étapes de cette séquence « anémie-hypoxie-EPO » sur l'élimination d'érythrocytes altérés par le stockage et démontré, pour chacune d'elles, une réduction significative de l'élimination (de 27 à 51% selon les modèles). Cette approche par suppression successive d'un élément de la séquence a permis de déterminer les différents paramètres impliqués dans ce phénomène de réduction et est permise par l'utilisation du modèle de

transfusion. En effet, ce modèle permet l'étude de l'élimination érythrocytaire à court terme (sur 24h) ; ce qui n'est pas possible dans le contexte de GR endogènes du fait de leur faible taux d'élimination journalière.

Concernant les différents paramètres identifiés, l'effet de l'hypoxie chez la souris non-anémique indique l'indépendance du phénomène vis-à-vis de l'hématocrite et permet d'écarter un effet mécanique de facilitation du passage du filtre splénique par un hématocrite diminué. L'efficacité du traitement par ASE chez la souris non-anémique et non-hypoxique a permis de démontrer que l'EPO seule est suffisante pour induire la réduction de l'élimination érythrocytaire. Cet effet est en cohérence avec le résultat du traitement par ASE sur la diminution de l'élimination des GR endogènes.

De même, la proportionnalité entre la stimulation appliquée (profondeur de l'anémie, importance de l'hypoxie et dose d'ASE) et la réponse en matière de réduction de l'élimination renforce le lien avec l'EPO. En effet, la régulation de la production d'EPO est elle aussi proportionnelle à l'importance de l'hypoxie (et donc de l'anémie)<sup>34</sup>. On peut d'ailleurs rapprocher l'effet temporel de l'hypoxie sur l'élimination érythrocytaire avec la cinétique en cloche de la production d'EPO chez la souris: elle atteint un maximum entre 12 et 24h avant de diminuer pour rejoindre un plateau<sup>34</sup>.

L'effet de la neutralisation de l'EPO circulant est particulièrement intéressant.

Premièrement, l'absence d'élimination de GR non altérés dans notre modèle de transfusion renforce l'hypothèse que l'élimination concerne spécifiquement une sous-population âgée altérée. Ensuite, l'absence d'effet de la neutralisation de l'EPO sur leur élimination indique que la spécificité de l'élimination pour les GR âgés/altérés n'est pas influencée par le taux d'EPO. En revanche, l'effet majeur de la neutralisation de l'EPO circulant sur l'élimination des GR altérés est très informatif. D'une part, cette neutralisation entraîne l'abolition de la réduction ce qui indique que l'EPO est indispensable à l'effectivité de ce mécanisme. D'autre part, l'augmentation significative de l'élimination après neutralisation de l'EPO, et en particulier en situation non-anémique, met en évidence un nouveau rôle homéostatique de l'EPO sur la régulation de l'élimination érythrocytaire en situation d'équilibre.

Ce rôle répresseur spécifique de l'EPO sur l'élimination érythrocytaire n'a, à notre connaissance, jamais été abordé. Néanmoins différents éléments de la littérature suggèrent

l'existence de mécanismes de régulation de l'élimination érythrocytaire ainsi que le fait que l'EPO pourrait réguler la durée de vie du GR.

En effet, dans le cadre de l'anémie associée à l'insuffisance rénale chronique, divers mécanismes ont été évoqués comme responsables de l'anémie dont on retiendra une altération de la production due à la baisse de stimulation par l'EPO, une diminution de la durée de vie des GR<sup>212-214</sup> proportionnelle à l'importance de l'atteinte rénale<sup>212</sup>, et due à un environnement hostile pro-oxydatif, mais également à l'activation du système phagocytaire<sup>215,216</sup>. Un effet régulateur de l'EPO a été montré par l'amélioration de la durée de vie érythrocytaire chez le patient insuffisant rénal traité par ASE<sup>212,213</sup>, cet effet étant par ailleurs réversible à l'arrêt du traitement. L'observation d'une augmentation de la durée de vie érythrocytaire pourrait être due à l'effet de l'EPO sur la qualité du GR produit en contexte urémique. Néanmoins, certaines observations rapportent une durée de vie normale de GR issus de patients insuffisant rénaux et transfusés dans des volontaires sains démontrant l'implication, au moins partielle, de l'environnement au sens large dans l'élimination érythrocytaire<sup>214</sup>. L'effet de l'EPO pourrait donc également influencer l'élimination indépendamment de la qualité du GR produit.

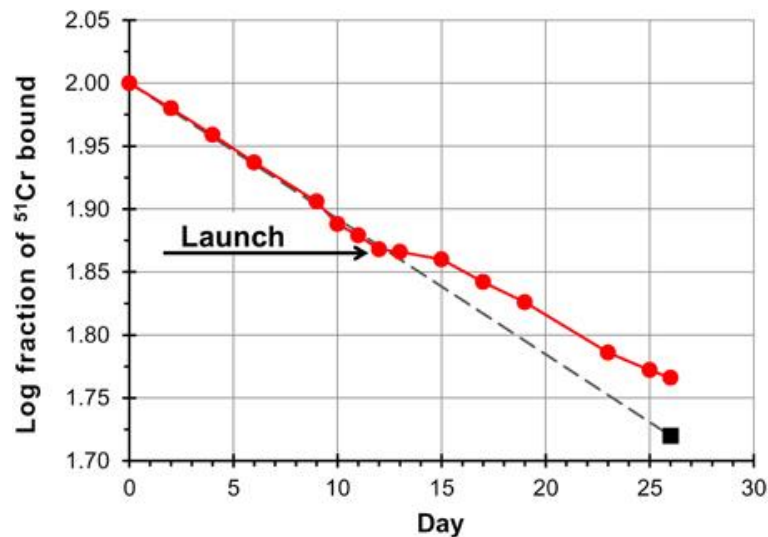
Dans notre modèle de transfusion sanguine, nous avons observé une corrélation inverse entre hémoglobine pré-transfusionnelle et élimination érythrocytaire probablement due à la proportionnalité de l'augmentation du taux d'EPO. Cette proportionnalité entre hémoglobine et efficacité transfusionnelle a récemment été démontrée dans deux importantes études humaines indépendantes. Dans ces études, l'efficacité transfusionnelle est évaluée par l'augmentation de l'hémoglobine du patient à un temps donné après la transfusion. Dans une première étude réalisée chez 195 patients atteints de pathologies hématologiques non-hospitalisés<sup>217</sup>, Karafin *et al.* ont observé une différence de 70% dans l'augmentation de l'hémoglobine à 30 minutes entre les patients avec un hémoglobine pré-transfusionnelle inférieure à 7g/dL ou supérieure à 8g/dL aux dépens de ces derniers tandis que Roubinian *et al.* (23194 transfusions pour lesquelles une seule unité de concentré globulaire a été administrée) retrouvent une différence de 24%. Dans les deux études, l'hémoglobine pré-transfusionnelle est le facteur le plus important pour prédire l'augmentation de l'hémoglobine après administration d'une unité de concentré globulaire. Néanmoins les différences dans l'amplitude des variations observées entre les groupes dans les deux études sont importantes.

Ceci pourrait être dû aux populations incluses différentes ainsi qu'au moment de l'évaluation de l'efficacité (30 minutes dans la première étude contre « dans les 18h » pour la seconde). De même la méthode d'évaluation de l'efficacité transfusionnelle (mesure de la concentration d'hémoglobine) est biaisée par l'impact du volume sanguin total et ses variations. Ces résultats récents et particulièrement intéressants devront faire l'objet de discussions et réévaluations approfondies avant d'en tirer une conclusion définitive. Par ailleurs, les techniques d'évaluation de l'efficacité transfusionnelle entre ces études et la nôtre ne peuvent être comparées en l'état. Néanmoins, la présence d'un lien entre l'importance de l'anémie et l'efficacité transfusionnelle renforce l'idée d'une proportionnalité entre le niveau d'EPO et la réduction de l'élimination.

Le rôle potentiel de l'EPO sur l'élimination érythrocytaire a aussi été suggéré dans la description d'un processus particulier de régulation de la masse sanguine : la néocytole. Ce terme se réfère à la diminution, à un rythme plus important que leur destruction physiologique, de la masse totale de GR observée dans certaines circonstances particulières. Ce phénomène a été initialement décrit lors d'expérience concernant la microgravité des vols spatiaux au milieu des années 90 et la « dé-acclimatation » d'individus ayant séjourné en altitude lors de leur retour au niveau de la mer. En effet, l'augmentation de la destruction érythrocytaire concordant temporellement avec la baisse du niveau d'EPO a été robustement décrite. D'abord dans les années 40-50<sup>218</sup> par une augmentation des métabolites de l'hème associée à une diminution des réticulocytes. Et plus récemment par méthode isotopique lors de la microgravité et la dé-acclimatation<sup>219-221</sup>. La causalité de la décroissance de l'EPO est renforcée par l'absence d'augmentation de l'élimination lorsque le retour au niveau de la mer est combiné avec l'administration d'ASE. Néanmoins, la particularité de la néocytole serait que la destruction concerne préférentiellement la population de GR les plus récemment produits (les « néocytes »). L'identification de cette sous-population « jeune » comme étant la cible de l'augmentation de l'élimination est en contradiction avec nos résultats. Les effets de neutralisation de l'EPO circulant indiquant, dans notre modèle de GR stockés, une élimination sélective de la sous-population la plus altérée. De plus, des résultats d'études abordant la néocytole décrivent la sous-population éliminée comme étant également celle présentant le plus d'altérations classiquement incriminées dans l'élimination érythrocytaire (exposition de la PS et diminution des CD55, CD59 et CD47)<sup>221</sup>. Si les preuves pour une

réduction de la masse érythrocytaire suite à la chute de l'EPO sont établies, les arguments concernant la nature « jeune » de la sous-population éliminée nous semblent insuffisants. En effet, l'article fondateur de l'argumentaire résulte de la combinaison des résultats obtenus lors de deux vols spatiaux<sup>220</sup>. Dans ces études, les GR des sujets ont été marqués au <sup>51</sup>Cr avant le vol et leur décroissance suivie pendant le vol et lors du retour sur Terre. La combinaison d'une diminution du taux de décroissance relative de la fraction marquée lors du vol (Figure 59) avec la mesure d'une baisse de la masse érythrocytaire totale a été interprétée comme une augmentation de la destruction des GR non marqués donc les plus jeunes. Cette conclusion est grevée de nombreux biais et zones d'ombres<sup>222</sup> dont on retiendra en particulier les points suivants : Premièrement, les données sur l'effet de la microgravité sur l'érythropoïèse sont discordantes entre les deux vols étudiés. Le premier rapporte une diminution de l'incorporation du fer suite à la baisse d'EPO tandis que le deuxième n'en observe pas. Pourtant, une baisse de la production érythrocytaire est attendue suite à la chute d'EPO et pourrait expliquer, au moins en partie, l'aspect de la courbe de survie érythrocytaire. De plus, il n'y a pas de mesure du taux de réticulocytes qui aurait pu confirmer le caractère « jeune » de cette population. Enfin, ces modifications ont été attribuées à la baisse du taux d'EPO sans démonstration de sa causalité et les potentielles conséquences de la microgravité sur l'activité splénique n'ont pas été abordées de même que son effet sur le taux d'élution du <sup>51</sup>Cr. La microgravité est pourtant la caractéristique principale des vols spatiaux et, par essence, absente sur Terre. Cette effet d'élimination préférentielle des GR nouvellement produit a ensuite été utilisé comme mécanisme explicatif d'autres situations très différentes sans nouvelle démonstration du caractère jeune de la population éliminée<sup>223,224</sup>. Son application à la dé-acclimatation en particulier nous semble insuffisamment étayée. En effet, les observations des vols spatiaux étudient l'élimination de GR formés en conditions normales tandis que la dé-acclimatation étudie l'élimination de GR issus d'une érythropoïèse de stress dont il a été démontré les différences phénotypiques<sup>119,225</sup> et, chez le rat, une moindre survie en circulation<sup>226</sup>. Enfin, la sélection de la sous-population âgée la plus altérée pour l'élimination apparaît raisonnée et naturelle dans le contexte d'une réduction de la biomasse en GR.





**Figure 59** Survie érythrocytaire au cours d'un vol spatial La ligne pointillée représente l'évolution théorique sur Terre extrapolée à partir des données pré-lancement. La courbe rouge représente l'évolution observée en vol. (Risso, A., Ciana, A., Achilli, C., Antonutto, G. & Minetti, G. Neocytolysis: none, one or many? A reappraisal and future perspectives. *Front. Physiol.* 5, (2014)).

La conjonction de nos résultats expérimentaux et de ces éléments de littérature confirme le rôle central et régulateur de l'EPO sur l'élimination érythrocytaire. En d'autres mots, pour une population circulante de GR de qualité équivalente, l'augmentation du taux d'EPO entraîne une réduction de l'élimination érythrocytaire tandis que sa chute cause son augmentation.

## 2.2 Cohérence des résultats de l'élimination d'érythrocytes sénescents ou stockés

La qualité du GR considéré est néanmoins un paramètre essentiel de l'élimination. En effet, de nombreuses altérations se développant au cours du vieillissement en circulation ou lors du stockage froid ont été décrites. Si le contexte d'acquisition de ces altérations diffère par essence, leur nature et les conséquences de leur accumulation sont pour la plupart communes. On retiendra en particulier les altérations de membrane et de morphologie causant une fragilité et un défaut de déformabilité, les altérations de lipides et protéines membranaires par le stress oxydatif participant aux altérations membranaires fonctionnelles (ou bien la création de signaux immuns d'élimination (CD47, bande 3)<sup>181,227</sup>. Néanmoins leur implication relative dans l'élimination de chacune de ces populations reste à clarifier. Il ne nous semble donc pas possible, sur base de la littérature actuelle ou de nos résultats, de proposer un mécanisme précis dans l'élimination érythrocytaire de chacune de ces situations. L'absence de consensus sur un signal unique renforce cependant la probabilité que l'élimination ne soit pas déterminée par une altération ponctuelle mais plutôt par une combinaison de signaux dont les variations relatives induisent l'élimination dans un contexte (global, d'organe ou d'interaction cellulaire) donné.

Si le type d'altération est essentiel à considérer, la quantité de GR doit également l'être. Dans le modèle de GR endogènes chez le sujet normal, l'augmentation de durée de vie érythrocytaire correspond à une diminution de 25% de leur élimination sous traitement par ASE : une valeur similaire à la réduction de 29% observée sous ASE dans le modèle de GR transfusés. Cependant, la comparaison entre ces modèles doit prendre en considération le type et le degré d'altération des GR transfusés et l'impact de l'apport d'une plus grande quantité de GR altérés à éliminer (représentant en moyenne 11.6% des GR circulant à 5 minutes après la transfusion) sur le système phagocytaire. En effet, l'importante quantité de GR à éliminer pourrait dépasser la capacité d'adaptation du système phagocytaire voire entraîner une mort des macrophages. Ce phénomène potentiel de ferroptose (une forme non-apoptotique de mort cellulaire dépendant du fer libéré par la dégradation de l'hème) est suggéré par la diminution de la proportion de macrophage splénique et hépatique dans notre modèle de transfusion (cf. 2.B.2.2) et a été récemment démontré et caractérisé dans le contexte transfusionnel par un travail récent de Youssef *et al*<sup>228</sup> particulièrement pertinent puisqu'il utilise un modèle de transfusion similaire au nôtre (en procédé de stockage et en

volume de GR administré). De même, la saturation du système d'élimination participe probablement à la relation entre la quantité de GR transfusée et la diminution de l'élimination observée dans notre étude (Figure 34). En revanche, la quantité de GR concernée par l'élimination dans le modèle de GR endogènes est par définition physiologique et n'est donc pas suffisamment importante pour induire une saturation ou une disparition de la population macrophagique.

Les mécanismes de saturation ont donc un rôle important dans l'évaluation des mécanismes d'élimination mais n'expliquent pas les différences observées suite à l'effet de l'ASE chez le sujet normal. De plus la concordance des résultats entre ces deux types d'altération du GR (sénescence et lésion par le stockage) indique un effet commun des signaux liés à l'anémie : la diminution de l'élimination érythrocytaire. Cette observation ne nous éclaire néanmoins pas sur une éventuelle similarité des mécanismes sous-jacents ou du signal érythrocytaire déclenchant l'élimination dans ces modèles.

### 2.3 Rôle du statut en fer sur l'élimination érythrocytaire

Les deux modalités de surcharge (transfusionnelle et par administration parentérale de fer) ont montré une réduction de l'élimination érythrocytaire suite à la transfusion de GR stockés. Si la localisation cellulaire exacte du fer n'a pas été étudiée dans le cadre de notre travail, la localisation hépatique et splénique est claire et la localisation en partie macrophagique est bien décrite dans la littérature<sup>229</sup>. On retrouve dans ces modèles une proportionnalité entre l'importance de la surcharge globale et l'effet de réduction de l'élimination érythrocytaire. Une réduction de l'élimination est également observée dans le modèle d'anémie par carence martiale.

Le lien entre le métabolisme du fer, l'hypoxie et la physiologie érythrocytaire est bien établi et particulièrement complexe. On notera en particulier l'interdépendance entre l'absorption du fer et la synthèse d'EPO. En effet, l'augmentation de l'EPO augmente l'absorption de fer (par répression de l'hepcidine) afin d'accroître l'apport nécessaire à l'augmentation de la production érythrocytaire<sup>90</sup>. Par ailleurs, une augmentation de l'EPO sans fer pour produire de nouveaux GR serait futile. La synthèse de l'EPO est donc limitée (mais pas abolie<sup>230</sup>) en cas de carence par la présence d'un motif IRE inhibiteur sur l'ARN messager de HIF2 $\alpha$ <sup>94</sup>. Tandis que la dégradation de HIF $\alpha$  par la PHD est dépendante du fer et que la chélation expérimentale du fer stabilise HIF $\alpha$ . La balance finale entre ces effets opposés ne nous semble pas établie.

Par ailleurs, l'élimination des GR est centrale dans le métabolisme du fer. En effet, l'essentiel des échanges de fer de l'organisme concerne le recyclage du fer héminique par les macrophages pour la production de nouveaux GR<sup>112,231</sup>. Des anomalies macrophagiques ont été démontrées secondairement à la surcharge en fer. Ainsi une diminution des capacités d'érythrophagocytose et de phagocytose bactérienne a été démontrée dans les macrophages et monocytes de patients atteints d'hémochromatose<sup>232,233</sup> mais également dans un contexte de transfusions chroniques<sup>101,234</sup> ainsi que chez les patients déficients en fer<sup>235,236</sup>.

L'effet de réduction observé dans nos résultats pourrait donc être dû à une altération des capacités d'élimination par le macrophage mais également à un mécanisme de protection supplémentaire. En effet, la surcharge en fer est toxique pour les cellules et l'érythrophagocytose nécessiterait la prise en charge d'une quantité supplémentaire de fer héminique pouvant dépasser les capacités du macrophage, induire sa mort et causer une libération délétère de fer libre. Le maintien du fer à l'intérieur du GR pourrait donc agir comme

un mécanisme temporaire de protection. Concernant la carence, nos données indiquent une diminution de l'élimination érythrocytaire lors de l'anémie par carence martiale. Dans ce contexte, il faut considérer l'action potentielle des trois conditions : à la fois l'augmentation de l'EPO liée à l'anémie, l'effet du statut en fer sur la synthèse de l'EPO mais également sur l'activité macrophagique. Enfin, le modèle de seuil modifiable d'élimination érythrocytaire développé par Higgins (voir plus bas) suggère un effet direct de la carence en fer sur celui-ci puisque l'élimination érythrocytaire diminue précocement plusieurs semaines avant le développement de l'anémie et donc de toute modification du taux d'EPO<sup>237</sup>.

En résumé, les liens entre métabolisme du fer, érythrocytaire ainsi que macrophagique sont nombreux mais l'impact du statut martial sur l'élimination érythrocytaire n'a jamais été directement étudié. Nos travaux démontrent que des modifications du statut en fer induisent une modulation de l'élimination érythrocytaire selon un mécanisme qui reste à identifier. Une meilleure compréhension du ou des mécanismes impliqués nécessitera l'étude du modèle de souris carencées en fer, mais avant l'installation de l'anémie ainsi qu'une gamme plus élargie de niveaux de surcharge.

### 3. Zones d'ombres, fragilités du travail de thèse et leurs perspectives de résolution

Les macrophages sont les principaux acteurs de l'érythrophagocytose tant endogène que lors de transfusions<sup>151,228</sup>. De ce fait, ils constituent la cible désignée de l'effet de l'EPO dont l'effet sur le métabolisme et l'activité macrophagiques est bien démontré (comme par exemple la modification de la production de cytokines inflammatoires et des capacités de phagocytose<sup>238-240</sup> ou l'augmentation de la clairance des cellules apoptotiques<sup>241</sup>). De même, l'hypoxie (en particulier par l'intermédiaire des gènes cibles de HIF) est un modulateur connu de l'activité macrophagique<sup>242,243</sup> justifiant l'investigation de son rôle potentialisateur de l'effet de l'EPO sur l'élimination érythrocytaire par les macrophages.

Néanmoins, nos approches d'inactivation des gènes du récepteur à l'EPO et des différents isoformes de HIF par le système cre-lox (cf sections C.1 et C.2.1 des résultats) n'ont pas montré d'effet sur l'élimination érythrocytaire. L'absence d'effet de ces inactivations sur la réduction de l'élimination érythrocytaire induite par l'hypoxie peut être interprété comme une inactivation de notre hypothèse initiale. Néanmoins, l'inhibition seulement partielle (60% de réduction de l'expression de l'ARNm de HIF dans les RPM) du gène cible par le système cre-lox pourrait être insuffisante pour induire un changement de phénotype. L'étude du récepteur à l'EPO comme cible moléculaire directe de l'EPO sur le macrophage se heurte aux mêmes limitations. Nous n'avons donc pas pu valider ou invalider le macrophage comme cible cellulaire (et l'EPOR à sa surface comme cible moléculaire) de l'EPO et de l'hypoxie dans ce mécanisme de réduction de l'élimination érythrocytaire.

Par ailleurs, nos résultats confirment le rôle central des macrophages et des monocytes dans l'élimination érythrocytaire en cohérence avec les données récentes concernant l'implication en matière d'érythrophagocytose et la dynamique de ces populations dans le foie<sup>128</sup> et dans la rate<sup>228</sup>. Néanmoins, et malgré l'effet majeur sur l'élimination érythrocytaire observé en circulation, nous n'avons pas mis en évidence de différence de l'activité phagocytaire ou la proportion de ces cellules effectrices au sein de la rate, du foie et de la moelle lors de nos expériences d'érythrophagocytose *in vivo* (cf. section C.2.2 des résultats). Les résultats sont néanmoins à considérer au vu de la grande variabilité observée au sein des différentes populations (coefficient de variation de 5 à 55%). Par ailleurs, l'analyse n'a été effectuée qu'à un temps donné après la transfusion ne correspondant peut-être pas au moment où la

différence d'activité entre les conditions est significative et par conséquent n'est pas représentative d'une différence globale sur l'ensemble de la cinétique d'élimination. Cette exploration de l'éventuelle variation dans l'activité phagocytaire devra donc être poursuivie en élargissant la fenêtre d'observation en post-transfusion et en améliorant la technique afin d'en diminuer la variabilité. Par ailleurs, ces différentes hypothèses seront approfondies par le développement, actuellement en cours, d'un modèle d'érythrophagocytose *in vitro* à partir de lignées macrophagiques et de cellules primaires murines. Cette configuration permettra l'étude de l'effet direct de l'EPO sur les macrophages ainsi que l'évaluation de la combinaison de différents facteurs comme par exemple le statut en fer. De même, en cas d'effet direct de l'EPO sur les macrophages, des approches d'invalidations génétiques (par utilisation du système CRISPR-Cas9) permettront de définir la cible moléculaire de l'EPO.

Le rôle d'une modification par l'EPO de l'adressage des GR aux cellules effectrices au sein des organes a également été étudié par mesure de la rétention organique des GR grâce à la technique du *slice blood* (cf. section C.3 des résultats). Cet effet pouvant, par exemple, être médié par des modifications des cellules endothéliales dont la sensibilité à l'EPO a été démontrée<sup>73,244,245</sup>. Nous n'avons pas mis en évidence de différence d'accumulation dans la rate, le foie ou la moelle des GR transfusés en conditions normales ou hypoxiques. L'étude d'une différence d'adressage des GR à l'élimination pourrait être complétée par des expériences d'adhérence *in vitro* de GR sur des cellules endothéliales traitées ou non à l'EPO.

Si l'effet d'une modification de l'endothélium devra être exploré, un effet direct de l'EPO sur le GR mature doit également être considéré. En effet, une modification des propriétés du GR par l'EPO pourrait influencer à la fois l'adhérence mais également les interactions directes entre le GR et la cellule responsable de son élimination. Les données de la littérature à ce sujet sont éparses mais des interactions directes entre EPO et GR matures ont précocement été décrites, malgré l'absence d'EPOR sur les GR matures<sup>28,246</sup>. Par ailleurs, des travaux récents ont montré un effet de l'EPO sur l'entrée de calcium dans le GR par une action sur une famille de récepteurs, les TRPC (pour *transient receptor potential channels of canonical type*)<sup>247-249</sup>. Leurs isoformes sont nombreuses mais au moins une étude a montré un effet de diminution

du calcium intracellulaire et de diminution de l'exposition de la PS suite à l'effet de l'EPO<sup>250</sup>, deux effets potentiellement bénéfiques pour la persistance en circulation du GR.

L'utilisation de la technique de double biotinylation permettra l'isolement de la sous-population la plus âgée des souris traitées ou non par EPO afin de déterminer d'éventuelles modifications de leurs propriétés de déformabilité ou d'expression protéiques (cytométrie, protéomique).



#### 4. Transposabilité des résultats murins à la physiologie humaine, proposition de modélisation et implications cliniques

La transposition des résultats de la souris à l'humain est séduisante mais doit être évoquée avec prudence. Néanmoins une grande partie de nos connaissances sont issues de modèles animaux (et en particulier murins) et leur utilisation extensive a permis leur caractérisation précise permettant un usage raisonné dans l'étude de plusieurs systèmes dont le système érythrocytaire<sup>251-253</sup>. En ce qui concerne notre étude, plusieurs arguments permettent de postuler l'existence de ce mécanisme de régulation de l'élimination érythrocytaire chez l'humain.

Premièrement, notre modèle de banque de sang murin récapitule les principales descriptions de lésion de stockage et les performances post-transfusionnelles retrouvées chez l'humain<sup>251,254</sup>. Les similitudes de proportionnalité entre l'anémie et l'efficacité transfusionnelle des études de Karafin et Roubinian rappellent également les résultats de notre travail. De même, l'effet du traitement par ASE sur la durée de vie des GR des patients insuffisants rénaux, d'une part, ainsi que les mécanismes de régulation de la masse érythrocytaire suivant les variations d'EPO liés à l'altitude d'autre part, renforcent l'hypothèse d'un effet de l'EPO sur l'élimination érythrocytaire humaine.

L'existence de mécanismes de régulation homéostatique de l'élimination a précédemment été théorisée bien que n'ayant jamais été démontrée expérimentalement<sup>237,255</sup>. En effet, en 2010, John Higgins a proposé, à partir de données de numération sanguine classique, un modèle mathématique prédisant l'évolution de différents paramètres érythrocytaires (le volume et le contenu en hémoglobine définissant la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine ou CCMH) au cours du vieillissement jusqu'à atteindre un seuil de CCMH déterminant l'élimination<sup>237</sup>. En se basant sur la présence, chez des patients carencés en fer non anémiés et non microcytaires, d'une sous-population de GR ayant une CCMH inférieure à ce seuil, il a proposé que ce dernier puisse être temporairement abaissé afin de compenser une baisse de production et donc participer au maintien du nombre de GR circulants.

Sur la base de cette hypothèse, le même groupe a évalué l'âge moyen de la population érythrocytaire d'un individu en fonction de la prédiction de ce seuil de clairance. Cet âge moyen a été basé sur la mesure de l'hémoglobine glycosylée (ou HbA1c) dont l'importance est

liée, chez un individu non-diabétique, à la durée en circulation des GR<sup>256</sup>. Cette étude sur 450<sup>257</sup> (et l'analyse des données de 2 autres études indépendantes<sup>258,259</sup> comportant à elles trois plus de 20.000 patients) suggère fortement l'existence d'un seuil d'élimination érythrocytaire et de ses mécanismes de modulation menant à la modification de la durée de vie des GR.

Sur base de ces données humaines, de la littérature et de nos résultats expérimentaux, nous proposons un modèle dynamique (Figure 60) où la durée de vie d'un GR est déterminée par deux facteurs : l'importance de ses altérations pro-phagocytaires (en quantité ou vitesse d'apparition) et l'activité du système d'élimination érythrocytaire. La convergence de ces deux facteurs définit un seuil d'élimination érythrocytaire. En cas d'anémie ou d'hypoxie, l'augmentation de l'EPO agirait potentiellement sur l'un ou plusieurs de ces facteurs pour décaler le seuil d'élimination vers une clairance diminuée.

Cet effet homéostatique permettrait de participer au maintien d'un nombre adéquat de GR jusqu'au rétablissement de l'équilibre entre besoins et apports en oxygène par la production de nouveaux GR.

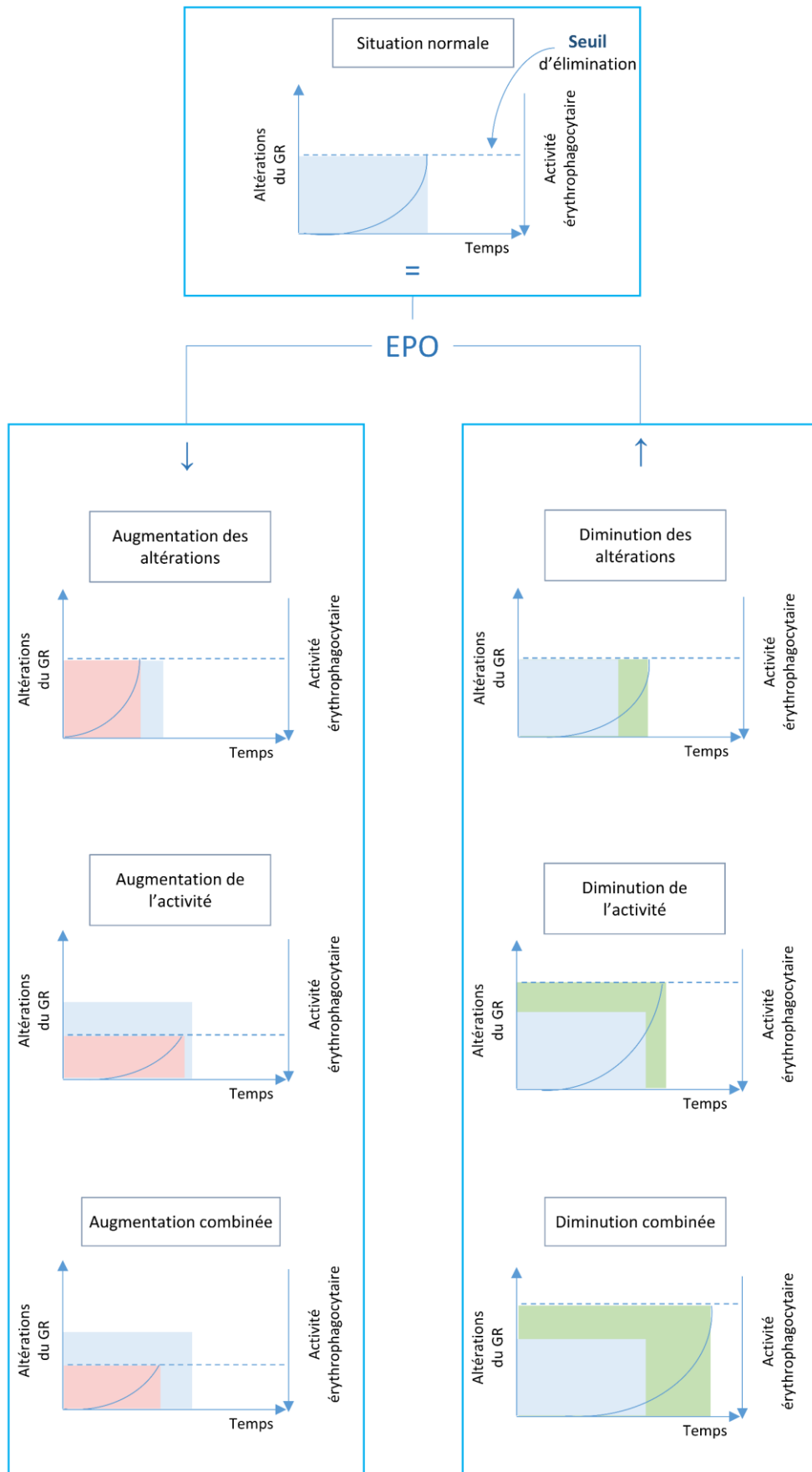


Figure 60 Modèle de seuil dynamique de l'élimination érythrocytaire et effets de l'EPO

L'augmentation du seuil pourrait être une régulation normale en réponse à une diminution brusque de l'EPO circulant comme lors de la dé-acclimatation. Mais on peut également supposer que la dérégulation des mécanismes le contrôlant participe à la genèse de certaines conditions physiopathologiques.

Ainsi, la baisse caractéristique de la production d'EPO dans l'insuffisance rénale pourrait, en plus de l'effet sur la production érythrocytaire, participer à la réduction de la durée de vie des GR par exemple en augmentant leur sensibilité au stress oxydatif mais également l'importance de l'érythrophagocytose pour un même niveau d'altération. Réciproquement, la réduction de ces facteurs par l'EPO participerait à l'efficacité du traitement par ASE dans cette pathologie.

Au-delà de l'aspect quantitatif de l'EPO circulant, la dérégulation des mécanismes effecteurs de l'EPO ou leur insensibilité à son action, pourrait contribuer au manque d'efficacité des ASE chez certains patients.

Cette « hypo »-sensibilité à l'EPO a potentiellement des implications dans certaines maladies où une réduction de la durée de vie du GR a été observée comme l'anémie associée à l'inflammation ou le contexte transfusionnel.

En matière transfusionnelle, l'impact de l'état du receveur sur l'efficacité transfusionnelle reste très peu exploré puisque, jusqu'à maintenant, la majorité des efforts de recherche ont été orientés sur l'impact du stockage pré-transfusionnel. Une éventuelle dérégulation des mécanismes contrôlant le seuil d'élimination réduirait l'efficacité de la transfusion et augmenterait donc le besoin transfusionnel. Ceci pourrait expliquer, au moins partiellement, la grande variabilité du besoin transfusionnel entre les patients atteints d'une même maladie comme par exemple observée dans les syndromes myélodysplasiques<sup>260,261</sup>.

En effet, chez les patients chroniquement transfusés (comme par exemple dans la thalassémie, la drépanocytose ou encore les syndromes myélodysplasiques), l'augmentation du besoin augmente le risque de complications associées à la transfusion chronique (immunisation, surcharge martiale) ainsi que le coût et l'impact sur la qualité de vie du patient.

En plus d'un effet sur l'efficacité transfusionnelle, ce mécanisme pourrait avoir un rôle dans la composante extravasculaire de complications aiguës comme le syndrome d'hémolyse post-transfusionnelle retardée où l'ampleur de la destruction érythrocytaire dépasse la quantité de GR transfusés.

L'intégration de l'existence de ce facteur dans les études physiopathologiques de ces maladies pourrait aboutir au développement de nouvelles cibles thérapeutiques et améliorer leur prise en charge globale.

## Conclusion

Nos résultats confirment, pour la première fois expérimentalement, l'existence d'un mécanisme de régulation de l'élimination érythrocytaire. Ce mécanisme est médié par un nouvel effet homéostatique de l'EPO, la réduction de l'élimination érythrocytaire. L'EPO a donc deux effets indépendants mais à la finalité similaire : maintenir un nombre adéquat de GR en circulation. D'une part, en régulant la production et d'autre part, en modulant l'élimination érythrocytaire tant en situation normale qu'en réponse à une anémie aiguë.

Bien que les cibles et mécanismes effecteurs précis de l'EPO restent à identifier, ce travail ouvre la voie à l'étude d'un nouvel aspect de la physiologie érythrocytaire en abordant l'angle de la (dé)régulation de l'élimination érythrocytaire en conditions normales et pathologiques indépendamment de la qualité du GR circulant. La compréhension fine de ce mécanisme et son implication potentielle en pathologie comme en transfusion permettrait également à terme le développement de nouveaux outils thérapeutiques.



## Références

1. Verkleij, A. J. *et al.* The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **323**, 178–193 (1973).
2. Kobayashi, T. & Menon, A. K. Transbilayer lipid asymmetry. *Current Biology* **28**, R386–R391 (2018).
3. Narla, J. & Mohandas, N. Red cell membrane disorders. *International Journal of Laboratory Hematology* **39**, 47–52 (2017).
4. Boas, F. E., Forman, L. & Beutler, E. Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3077–3081 (1998).
5. Ciana, A., Balduini, C. & Minetti, G. Detergent-resistant membranes in human erythrocytes and their connection to the membrane-skeleton. *J. Biosci.* **30**, 317–328 (2005).
6. McGraw, K. & List, A. Chapter Five - Erythropoietin Receptor Signaling and Lipid Rafts. in *Vitamins and Hormones* (ed. Litwack, G.) **105**, 79–100 (Academic Press, 2017).
7. Lux, S. E. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood* **127**, 187–199 (2016).
8. Mohandas, N. & Gallagher, P. G. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* **112**, 3939–3948 (2008).
9. *Wintrobe's clinical hematology*. (Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins Health, 2014).
10. *Nathan and Oski's hematology and oncology of infancy and childhood*. (Elsevier, Saunders, 2015).
11. Mankelov, T. J., Satchwell, T. J. & Burton, N. M. Refined views of multi-protein complexes in the erythrocyte membrane. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **49**, 1–10 (2012).
12. Burton, N. M. & Bruce, L. J. Modelling the structure of the red cell membrane. *Biochem. Cell Biol.* **89**, 200–215 (2011).
13. Gallagher, P. G. Disorders of erythrocyte hydration. *Blood* **130**, 2699–2708 (2017).
14. Chu, H. *et al.* Reversible binding of hemoglobin to band 3 constitutes the molecular switch that mediates O<sub>2</sub> regulation of erythrocyte properties. *Blood* **128**, 2708–2716 (2016).
15. O'Connell, K. E. *et al.* Practical Murine Hematopathology: A Comparative Review and Implications for Research. *Comp Med* **65**, 96–113 (2015).
16. An, X. & Mohandas, N. Disorders of red cell membrane. *British Journal of Haematology* **141**, 367–375 (2008).
17. Safeukui, I. *et al.* Sensing of red blood cells with decreased membrane deformability by the human spleen. *Blood Advances* **2**, 2581–2587 (2018).
18. Mohandas, N., Clark, M. R., Jacobs, M. S. & Shohet, S. B. Analysis of factors regulating erythrocyte deformability. *J Clin Invest* **66**, 563–573 (1980).



19. Clark, M. R., Mohandas, N. & Shohet, S. B. Osmotic gradient ektacytometry: comprehensive characterization of red cell volume and surface maintenance. *Blood* **61**, 899–910 (1983).
20. Santos, E. W. *et al.* Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* **53**, 138 (2016).
21. Erslev, A. J. & Silver, R. K. In vitro studies of erythropoiesis. *Semin. Hematol.* **4**, 315–326 (1967).
22. Socolovsky, M. Molecular insights into stress erythropoiesis: *Current Opinion in Hematology* **14**, 215–224 (2007).
23. Crosby, W. H. & Akeroyd, J. H. The limit of hemoglobin synthesis in hereditary hemolytic anemia: Its relation to the excretion of bile pigment. *The American Journal of Medicine* **13**, 273–283 (1952).
24. Muta, K., Krantz, S. B., Bondurant, M. C. & Dai, C. H. Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progenitor cells while stimulating proliferation. *Blood* **86**, 572–580 (1995).
25. McNiece, I. K. & Briddell, R. A. Stem cell factor. *Journal of Leukocyte Biology* **58**, 14–22 (1995).
26. Sawada, K. *et al.* Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. *Journal of Cellular Physiology* **142**, 219–230 (1990).
27. Kelley, L. L. *et al.* Survival or death of individual proerythroblasts results from differing erythropoietin sensitivities: a mechanism for controlled rates of erythrocyte production. *Blood* **82**, 2340–2352 (1993).
28. Broudy, V. C., Lin, N., Brice, M., Nakamoto, B. & Papayannopoulou, T. Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood* **77**, 2583–2590 (1991).
29. Arcasoy, M. O. Non-erythroid effects of erythropoietin. *Haematologica* **95**, 1803–1805 (2010).
30. Tsiftoglou, A. S., Vizirianakis, I. S. & Strouboulis, J. Erythropoiesis: Model systems, molecular regulators, and developmental programs. *IUBMB Life* **61**, 800–830 (2009).
31. An, X. & Mohandas, N. Erythroblastic islands, terminal erythroid differentiation and reticulocyte maturation. *International Journal of Hematology* **93**, 139–143 (2011).
32. Chow, A. *et al.* CD169+ macrophages provide a niche promoting erythropoiesis under homeostasis and stress. *Nature Medicine* **19**, 429–436 (2013).
33. Jacobson, L. O., Goldwasser, E., Fried, W. & Plzak, L. Role of the Kidney in Erythropoiesis. *Nature* **179**, 633 (1957).
34. Wenger, R. H., Kurtz, A. & Kurtz, A. Erythropoietin. *Comprehensive Physiology* **1**, 1759–1794 (2011).
35. Zanjani, E. D., Ascensao, J. L., McGlave, P. B., Banisadre, M. & Ash, R. C. Studies on the Liver to Kidney Switch of Erythropoietin Production. *J Clin Invest* **67**, 1183–1188 (1981).
36. Fried, W. The Liver as a Source of Extrarenal Erythropoietin Production. *Blood* **40**, 671–677 (1972).

37. Harris, J. & Kellermeyer, R. *The Red Cell. Production, Metabolism, Destruction : Normal and Abnormal.* (1972).
38. Obara, N. *et al.* Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood* **111**, 5223–5232 (2008).
39. Rich, I. N., Heit, W. & Kubanek, B. Extrarenal erythropoietin production by macrophages. *Blood* **60**, 1007–1018 (1982).
40. Ohls, R. K., Li, Y., Trautman, M. S. & Christensen, R. D. Erythropoietin Production by Macrophages from Preterm Infants: Implications Regarding the Cause of the Anemia of Prematurity. *Pediatr Res* **35**, 169–170 (1994).
41. Haase, V. H. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Reviews* **27**, 41–53 (2013).
42. Masuda, S. *et al.* A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J. Biol. Chem.* **269**, 19488–19493 (1994).
43. Egrie, J. C., Dwyer, E., Browne, J. K., Hitz, A. & Lykos, M. A. Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin. *Experimental Hematology* **31**, 290–299 (2003).
44. Su, D., Zhao, H. & Xia, H. Glycosylation-modified erythropoietin with improved half-life and biological activity. *Int J Hematol* **91**, 238–244 (2010).
45. Fong, G.-H. & Takeda, K. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. *Cell Death Differ* **15**, 635–641 (2008).
46. Appelhoff, R. J. *et al.* Differential Function of the Prolyl Hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the Regulation of Hypoxia-inducible Factor. *J. Biol. Chem.* **279**, 38458–38465 (2004).
47. Watts, E. R. & Walmsley, S. R. Inflammation and Hypoxia: HIF and PHD Isoform Selectivity. *Trends Mol Med* **25**, 33–46 (2018).
48. Imtiyaz, H. Z. *et al.* Hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *J Clin Invest* **120**, 2699–2714 (2010).
49. Gruber, M. *et al.* Acute postnatal ablation of Hif-2 $\alpha$  results in anemia. *PNAS* **104**, 2301–2306 (2007).
50. Abbrecht, P. H. & Littell, J. K. Plasma erythropoietin in men and mice during acclimatization to different altitudes. *Journal of Applied Physiology* **32**, 54–58 (1972).
51. Eckardt, K. U., Dittmer, J., Neumann, R., Bauer, C. & Kurtz, A. Decline of erythropoietin formation at continuous hypoxia is not due to feedback inhibition. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **258**, F1432–F1437 (1990).
52. Lacombe, C. & Mayeux, P. Biology of erythropoietin. *Haematologica* **83**, 724–732 (1998).
53. Wojchowski, D. M., Gregory, R. C., Miller, C. P., Pandit, A. K. & Pircher, T. J. Signal Transduction in the Erythropoietin Receptor System. *Experimental Cell Research* **253**, 143–156 (1999).

54. Constantinescu, S. N., Ghaffari, S. & Lodish, H. F. The Erythropoietin Receptor: Structure, Activation and Intracellular Signal Transduction. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **10**, 18–23 (1999).
55. Brines, M. & Cerami, A. The Receptor That Tames the Innate Immune Response. *Mol Med* **18**, 486–496 (2011).
56. Vainchenker, W. & Constantinescu, S. N. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene* **32**, 2601–2613 (2013).
57. Garçon, L. *et al.* Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. *Blood* **108**, 1551–1554 (2006).
58. Broxmeyer, H. E. Erythropoietin: multiple targets, actions, and modifying influences for biological and clinical consideration. *Journal of Experimental Medicine* **210**, 205–208 (2013).
59. Kuhrt, D. & Wojchowski, D. M. Emerging EPO and EPO receptor regulators and signal transducers. *Blood* **125**, 3536–3541 (2015).
60. Digicaylioglu, M. *et al.* Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *PNAS* **92**, 3717–3720 (1995).
61. Depping, R. *et al.* Expression of the erythropoietin receptor in human heart. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **130**, 877.e1-877.e4 (2005).
62. Choi, D. *et al.* Erythropoietin protects against diabetes through direct effects on pancreatic  $\beta$  cells. *Journal of Experimental Medicine* **207**, 2831–2842 (2010).
63. Juul, S. E., Joyce, A. E., Zhao, Y. & Ledbetter, D. J. Why Is Erythropoietin Present in Human Milk? Studies of Erythropoietin Receptors on Enterocytes of Human and Rat Neonates. *Pediatric Research* **46**, 263 (1999).
64. Echigoya, M. H., Obikane, K., Nakashima, T. & Sasaki, S. Glomerular Localization of Erythropoietin Receptor mRNA and Protein in Neonatal and Mature Mouse Kidney. *NEE* **100**, e21–e29 (2005).
65. Collino, M., Thiemermann, C., Cerami, A. & Brines, M. Flipping the molecular switch for innate protection and repair of tissues: Long-lasting effects of a non-erythropoietic small peptide engineered from erythropoietin. *Pharmacology & Therapeutics* **151**, 32–40 (2015).
66. Bohr, S. *et al.* Modulation of cellular stress response via the erythropoietin/CD131 heteroreceptor complex in mouse mesenchymal-derived cells. *J Mol Med* **93**, 199–210 (2015).
67. Ostrowski, D., Heinrich, R., Ostrowski, D. & Heinrich, R. Alternative Erythropoietin Receptors in the Nervous System. *Journal of Clinical Medicine* **7**, 24 (2018).
68. Jubinsky, P. T., Krijanovski, O. I., Nathan, D. G., Tavernier, J. & Sieff, C. A. The  $\beta$  Chain of the Interleukin-3 Receptor Functionally Associates With the Erythropoietin Receptor. *Blood* **90**, 1867–1873 (1997).
69. Brines, M. *et al.* Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common  $\beta$ -subunit heteroreceptor. *PNAS* **101**, 14907–14912 (2004).

70. Blake, T. J., Jenkins, B. J., D'Andrea, R. J. & Gonda, T. J. Functional cross-talk between cytokine receptors revealed by activating mutations in the extracellular domain of the  $\beta$ -subunit of the GM-CSF receptor. *Journal of Leukocyte Biology* **72**, 1246–1255 (2002).
71. Shing, K. S. C. T. *et al.* EPO does not promote interaction between the erythropoietin and beta-common receptors. *Scientific Reports* **8**, 12457 (2018).
72. Kilar, C. R. *et al.* Activation of the  $\beta$ -common receptor by erythropoietin impairs acetylcholine-mediated vasodilation in mouse mesenteric arterioles. *Physiological Reports* **6**, e13751 (2018).
73. Su, K.-H. *et al.*  $\beta$  Common receptor integrates the erythropoietin signaling in activation of endothelial nitric oxide synthase. *J. Cell. Physiol.* **226**, 3330–3339 (2011).
74. Ding, J. *et al.* Neuroprotection and CD131/GDNF/AKT Pathway of Carbamylated Erythropoietin in Hypoxic Neurons. *Mol Neurobiol* **54**, 5051–5060 (2017).
75. Lee, T.-S., Lu, K.-Y., Yu, Y.-B., Lee, H.-T. & Tsai, F.-C.  $\beta$  Common Receptor Mediates Erythropoietin-Conferred Protection on OxLDL-Induced Lipid Accumulation and Inflammation in Macrophages. *Mediators Inflamm.* **2015**, 439759 (2015).
76. Pradeep, S. *et al.* Erythropoietin Stimulates Tumor Growth via EphB4. *Cancer Cell* **28**, 610–622 (2015).
77. Ganz, T. Macrophages and Iron Metabolism. *Microbiology Spectrum* **4**, (2016).
78. Zhang, D.-L., Ghosh, M. C. & Rouault, T. A. The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis - an update. *Front. Pharmacol.* **5**, (2014).
79. Mastrogiannaki, M., Matak, P. & Peyssonnaud, C. The gut in iron homeostasis: role of HIF-2 under normal and pathological conditions. *Blood* **122**, 885–892 (2013).
80. Musumeci, M., Maccari, S. & Al, E. Iron excretion in iron dextran-overloaded mice. *Blood Transfusion* **12**, 485–490 (2014).
81. Mercadante, C. J. *et al.* Gastrointestinal iron excretion and reversal of iron excess in a mouse model of inherited iron excess. *Haematologica* **104**, 678–689 (2019).
82. Ganz, T. & Nemeth, E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1823**, 1434–1443 (2012).
83. Dev, S. & Babitt, J. L. Overview of Iron Metabolism in Health and Disease. *Hemodial Int* **21**, S6–S20 (2017).
84. Eickholt, T. H. & White, W. F. Determination of Iron Content in Mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **53**, 1418–1420 (1964).
85. Han, O. Molecular mechanism of intestinal iron absorption. *Metallomics* **3**, 103–109 (2011).
86. Peyssonnaud, C., Nizet, V. & Johnson, R. S. Role of the hypoxia inducible factors HIF in iron metabolism. *Cell Cycle* **7**, 28–32 (2008).
87. Zhang, D.-L., Hughes, R. M., Ollivierre-Wilson, H., Ghosh, M. C. & Rouault, T. A. A Ferroportin Transcript that Lacks an Iron-Responsive Element Enables Duodenal and Erythroid Precursor Cells to Evade Translational Repression. *Cell Metabolism* **9**, 461–473 (2009).

88. Lou, D.-Q. *et al.* Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice. *Blood* **103**, 2816–2821 (2004).
89. Rybinska, I. & Cairo, G. Chapter Eight - Mutual Cross Talk Between Iron Homeostasis and Erythropoiesis. in *Vitamins and Hormones* (ed. Litwack, G.) **105**, 143–160 (Academic Press, 2017).
90. Kautz, L. *et al.* Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet* **46**, 678–684 (2014).
91. Papanikolaou, G. & Pantopoulos, K. Systemic iron homeostasis and erythropoiesis. *IUBMB Life* **69**, 399–413 (2017).
92. Shirazian, S., Grant, C., Miller, I. & Fishbane, S. How Can Erythropoietin-Stimulating Agent Use be Reduced in Chronic Dialysis Patients? *Seminars in Dialysis* **26**, 534–536 (2013).
93. Suzuki, N. *et al.* Iron attenuates erythropoietin production by decreasing hypoxia-inducible transcription factor 2 $\alpha$  concentrations in renal interstitial fibroblasts. *Kidney International* **94**, 900–911 (2018).
94. Sanchez, M., Galy, B., Muckenthaler, M. U. & Hentze, M. W. Iron-regulatory proteins limit hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  expression in iron deficiency. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 420–426 (2007).
95. Choi, J. W. Serum Transferrin Receptor Concentration and its Ratio to Bone Marrow Erythroblasts in Iron Deficiency Anemia and Anemia of Chronic Diseases. *Ann Clin Lab Sci* **37**, 288–290 (2007).
96. Recalcati, S. *et al.* Differential regulation of iron homeostasis during human macrophage polarized activation. *Eur. J. Immunol.* **40**, 824–835 (2010).
97. Weiss, G. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1790**, 682–693 (2009).
98. Alam, M. Z., Devalaraja, S. & Haldar, M. The Heme Connection: Linking Erythrocytes and Macrophage Biology. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
99. Cairo, G., Recalcati, S., Mantovani, A. & Locati, M. Iron trafficking and metabolism in macrophages: contribution to the polarized phenotype. *Trends in Immunology* **32**, 241–247 (2011).
100. Pereira, M. *et al.* Acute Iron Deprivation Reprograms Human Macrophage Metabolism and Reduces Inflammation In Vivo. *Cell Rep* **28**, 498-511.e5 (2019).
101. Vinchi, F. *et al.* Chronic red blood cell transfusions impair the innate immune response to infectious cues by shaping macrophages towards an anti-inflammatory functional phenotype[abstract #S152]. Presented at the 23rd Congress of European Hematology Association, 2018-06-15, Stockholm. (2018).
102. Brissot, P., Troadec, M.-B., Loréal, O. & Brissot, E. Pathophysiology and classification of iron overload diseases; update 2018. *Transfusion Clinique et Biologique* **26**, 80–88 (2019).
103. Yun, S. & Vincelette, N. D. Update on iron metabolism and molecular perspective of common genetic and acquired disorder, hemochromatosis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **95**, 12–25 (2015).
104. Berlin, N. I., Waldmann, T. A. & Weissman, S. M. Life Span of Red Blood Cell. *Physiological Reviews* **39**, 577–616 (1959).

105. Mitlyng, B. L., Singh, J. A., Furne, J. K., Ruddy, J. & Levitt, M. D. Use of breath carbon monoxide measurements to assess erythrocyte survival in subjects with chronic diseases. *American Journal of Hematology* **81**, 432–438 (2006).
106. Khandelwal, S. & Saxena, R. K. Assessment of survival of aging erythrocyte in circulation and attendant changes in size and CD147 expression by a novel two step biotinylation method. *Experimental Gerontology* **41**, 855–861 (2006).
107. Dholakia, U., Bandyopadhyay, S., Hod, E. A. & Prestia, K. A. Determination of RBC Survival in C57BL/6 and C57BL/6-Tg(UBC-GFP) Mice. *Comparative Medicine* **65**, 196–201 (2015).
108. Eadie, G. S. Studies of Red Cell Survival. *Annals of the New York Academy of Sciences* **77**, 737–752 (1959).
109. Bratosin, D. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie* **80**, 173–195 (1998).
110. Terpstra, V. & Berkel, T. J. C. van. Scavenger receptors on liver Kupffer cells mediate the in vivo uptake of oxidatively damaged red blood cells in mice. *Blood* **95**, 2157–2163 (2000).
111. Khandelwal, S., Van Rooijen, N. & Saxena, R. K. Reduced expression of CD47 during murine red blood cell (RBC) senescence and its role in RBC clearance from the circulation. *Transfusion* **47**, 1725–1732 (2007).
112. Beaumont, C. & Delaby, C. Recycling Iron in Normal and Pathological States. *Seminars in Hematology* **46**, 328–338 (2009).
113. Mebius, R. E. & Kraal, G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* **5**, 606–616 (2005).
114. Groom, A. C. The Microcirculatory Society Eugene M. Landis award lecture. Microcirculation of the spleen: new concepts, new challenges. *Microvasc. Res.* **34**, 269–289 (1987).
115. *The Complete Spleen.* (Humana Press, 2002).
116. Hataba, Y., Kirino, Y. & Suzuki, T. Scanning Electron Microscopic Study of the Red Pulp of Mouse Spleen. *J Electron Microsc (Tokyo)* **30**, 46–56 (1981).
117. Blue, J. & Weiss, L. Vascular pathways in nonsinusoidal red pulp--an electron microscope study of the cat spleen. *Am. J. Anat.* **161**, 135–168 (1981).
118. Merkel, T. J. *et al.* Using mechanobiological mimicry of red blood cells to extend circulation times of hydrogel microparticles. *PNAS* **108**, 586–591 (2011).
119. Rhodes, M. M. *et al.* Stress reticulocytes lose transferrin receptors by an extrinsic process involving spleen and macrophages: Maturation of Stress Reticulocytes. *American Journal of Hematology* **91**, 875–882 (2016).
120. Haan, L. D. *et al.* Alterations in size, shape and osmotic behaviour of red cells after splenectomy: a study of their age dependence. *British Journal of Haematology* **69**, 71–80 (1988).
121. Song, S. H. & Groom, A. C. Sequestration and Possible Maturation of Reticulocytes in the Normal Spleen. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **50**, 400–406 (1972).
122. Crosby, W. H. & Benjamin, N. R. Siderocytes and the Spleen. *Blood* **12**, 165–170 (1957).

123. Buffet, P. A. *et al.* Ex vivo perfusion of human spleens maintains clearing and processing functions. *Blood* **107**, 3745–3752 (2006).
124. Schnitzer, B., Sodeman, T., Mead, M. L. & Contacos, P. G. Pitting Function of the Spleen in Malaria: Ultrastructural Observations. *Science* **177**, 175–177 (1972).
125. Crosby, W. H. Normal Functions of the Spleen Relative to Red Blood Cells: A Review. *Blood* **14**, 399–408 (1959).
126. Jandl, J. H., Greenberg, M. S., Yonemoto, R. H. & Castle, W. B. Clinical determination of the sites of red cell sequestration in hemolytic anemias. *J. Clin. Invest.* **35**, 842–867 (1956).
127. Ultmann, J. E. & Gordon, C. S. The Removal of in Vitro Damaged Erythrocytes from the Circulation of Normal and Splenectomized Rats. *Blood* **26**, 49–62 (1965).
128. Theurl, I. *et al.* On-demand erythrocyte disposal and iron recycling requires transient macrophages in the liver. *Nat Med* **22**, 945–951 (2016).
129. Hughes Jones, N. C. & Cheney, B. The use of <sup>51</sup>Cr and <sup>59</sup>Fe as red cell labels to determine the fate of normal erythrocytes in the rat. *Clin Sci* **20**, 323–332 (1961).
130. Marton, F. Erythrophagocytosis in the Human Bone Marrow. *Scandinavian Journal of Haematology* **7**, 177–183 (1970).
131. Marton, P. F. Erythrophagocytosis in the Human Bone Marrow as Disclosed by Iliacal Bone Biopsies. *Scandinavian Journal of Haematology* **14**, 153–159 (1975).
132. Marton Per F. Ultrastructural study of erythrophagocytosis in the rat bone marrow: ii. iron metabolism in reticulum cells following red cell digestion. *Scandinavian Journal of Haematology* **15**, 27–48 (1975).
133. Marton, P. F. Erythrophagocytosis in the Rat Bone Marrow Following Splenectomy. *Scandinavian Journal of Haematology* **10**, 81–87 (1973).
134. Hughes Jones, N. C. The use of <sup>51</sup>Cr and <sup>59</sup>Fe as red cell labels to determine the fate of normal erythrocytes in the rabbit. *Clin Sci* **20**, 315–321 (1961).
135. Jandl, J. H., Jones, A. R. & Castle, W. B. The destruction of red cells by antibodies in man. I. Observations of the sequestration and lysis of red cells altered by immune mechanisms. *J. Clin. Invest.* **36**, 1428–1459 (1957).
136. Jandl, J. H., Aster, R. H., Forkner, C. E., Fisher, A. M. & Vilter, R. W. Splenic pooling and the pathophysiology of hypersplenism. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* **78**, 9–27 (1967).
137. Jandl, J. H., Files, N. M., Barnett, S. B. & MacDonald, R. A. Proliferative Response of the Spleen and Liver to Hemolysis. *Journal of Experimental Medicine* **122**, 299–326 (1965).
138. Italiani, P. & Boraschi, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol* **5**, (2014).
139. De Kleer, I., Willems, F., Lambrecht, B. & Goriely, S. Ontogeny of Myeloid Cells. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
140. Mass, E. *et al.* Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science* **353**, aaf4238 (2016).

141. Kurotaki, D., Uede, T. & Tamura, T. Functions and development of red pulp macrophages. *Microbiol Immunol* **59**, 55–62 (2015).
142. Kohyama, M. *et al.* Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature* **457**, 318–321 (2009).
143. Haldar, M. *et al.* Heme-Mediated SPI-C Induction Promotes Monocyte Differentiation into Iron-Recycling Macrophages. *Cell* **156**, 1223–1234 (2014).
144. Kovtunovych, G., Eckhaus, M. A., Ghosh, M. C., Ollivierre-Wilson, H. & Rouault, T. A. Dysfunction of the heme recycling system in heme oxygenase 1-deficient mice: effects on macrophage viability and tissue iron distribution. *Blood* **116**, 6054–6062 (2010).
145. Youssef, L., Rebbaa, A., Pampou, S., Stockwell, B. R. & Spitalnik, S. Transfusion of Storage-Damaged Red Blood Cells Induces Ferroptosis in Splenic Macrophages. *Blood* **130**, 3567–3567 (2017).
146. Haschka, D. *et al.* Classical and intermediate monocytes scavenge non-transferrin-bound iron and damaged erythrocytes. *JCI Insight* **4**, (2019).
147. Meindert, S. M. *et al.* Human and murine splenic neutrophils are potent phagocytes of IgG-opsinized red blood cells. *Blood Advances* **1**, 875–886 (2017).
148. Richards, A. L., Hendrickson, J. E., Zimring, J. C. & Hudson, K. E. Erythrophagocytosis by plasmacytoid dendritic cells and monocytes is enhanced during inflammation. *Transfusion* **56**, 905–916 (2016).
149. Hendrickson, J. E., Eisenbarth, S. C. & Tormey, C. A. Red blood cell alloimmunization: new findings at the bench and new recommendations for the bedside. *Current Opinion in Hematology* **23**, 543–549 (2016).
150. Segawa, K. & Nagata, S. An Apoptotic ‘Eat Me’ Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends in Cell Biology* **25**, 639–650 (2015).
151. de Back, D. *et al.* Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Front. Physiol.* **5**, (2014).
152. Freikman, I. & Fibach, E. Distribution and shedding of the membrane phosphatidylserine during maturation and aging of erythroid cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1808**, 2773–2780 (2011).
153. Franco, R. S. *et al.* Changes in the properties of normal human red blood cells during in vivo aging. *American Journal of Hematology* **88**, 44–51 (2013).
154. Khandelwal, S. & Saxena, R. K. A role of phosphatidylserine externalization in clearance of erythrocytes exposed to stress but not in eliminating aging populations of erythrocyte in mice. *Experimental Gerontology* **43**, 764–770 (2008).
155. Kean, L. S. *et al.* Comparison of mechanisms of anemia in mice with sickle cell disease and  $\beta$ -thalassemia. *Experimental Hematology* **30**, 394–402 (2002).
156. Dasgupta, S. K. & Thiagarajan, P. The role of lactadherin in the phagocytosis of phosphatidylserine-expressing sickle red blood cells by macrophages. *Haematologica* **90**, 1267–1268 (2005).



157. Mankelov, T. J. *et al.* Autophagic vesicles on mature human reticulocytes explain phosphatidylserine-positive red cells in sickle cell disease. *Blood* **126**, 1831–1834 (2015).
158. Ibrahim, H. A., Fouda, M. I., Yahya, R. S., Abousamra, N. K. & Abd Elazim, R. A. Erythrocyte phosphatidylserine exposure in  $\beta$ -thalassemia. *Lab Hematol* **20**, 9–14 (2014).
159. Kay, M. M. B. Isolation of the phagocytosis-inducing IgG-binding antigen on senescent somatic cells. *Nature* **289**, 491 (1981).
160. Kay, M. M. Localization of senescent cell antigen on band 3. *PNAS* **81**, 5753–5757 (1984).
161. Lutz, H. U. & Bogdanova, A. Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans. *Front Physiol* **4**, 387 (2013).
162. Kay, M. Immunoregulation of Cellular Life Span. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1057**, 85–111 (2005).
163. Mannu, F. *et al.* Role of hemichrome binding to erythrocyte membrane in the generation of band-3 alterations in beta-thalassemia intermedia erythrocytes. *Blood* **86**, 2014–2020 (1995).
164. Pantaleo, A., Giribaldi, G., Mannu, F., Arese, P. & Turrini, F. Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions. *Autoimmunity Reviews* **7**, 457–462 (2008).
165. Lutz, H. U. *et al.* Naturally occurring anti-band-3 antibodies and complement together mediate phagocytosis of oxidatively stressed human erythrocytes. *PNAS* **84**, 7368–7372 (1987).
166. Matozaki, T., Murata, Y., Okazawa, H. & Ohnishi, H. Functions and molecular mechanisms of the CD47–SIRP $\alpha$  signalling pathway. *Trends in Cell Biology* **19**, 72–80 (2009).
167. Fossati-Jimack, L. *et al.* Selective Increase of Autoimmune Epitope Expression on Aged Erythrocytes in Mice: Implications in Anti-erythrocyte Autoimmune Responses. *Journal of Autoimmunity* **18**, 17–25 (2002).
168. Ishikawa-Sekigami, T. *et al.* SHPS-1 promotes the survival of circulating erythrocytes through inhibition of phagocytosis by splenic macrophages. *Blood* **107**, 341–348 (2006).
169. Olsson, M. & Oldenborg, P.-A. CD47 on experimentally senescent murine RBCs inhibits phagocytosis following Fc receptor-mediated but not scavenger receptor-mediated recognition by macrophages. *Blood* **112**, 4259–4267 (2008).
170. Oldenborg, P. A., Gresham, H. D. & Lindberg, F. P. CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) regulates Fc $\gamma$  and complement receptor-mediated phagocytosis. *J. Exp. Med.* **193**, 855–862 (2001).
171. Sosale, N. G. *et al.* Cell rigidity and shape override CD47's “self”-signaling in phagocytosis by hyperactivating myosin-II. *Blood* **125**, 542–552 (2015).
172. Burger, P., Hilarius-Stokman, P., de Korte, D., van den Berg, T. K. & van Bruggen, R. CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis. *Blood* **119**, 5512–5521 (2012).
173. Bosch, F. H. *et al.* Characteristics of red blood cell populations fractionated with a combination of counterflow centrifugation and Percoll separation. *Blood* **79**, 254–260 (1992).
174. Waugh, R. E. *et al.* Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age. *Blood* **79**, 1351–1358 (1992).

175. Willekens, F. L. A. *et al.* Hemoglobin loss from erythrocytes in vivo results from spleen-facilitated vesiculation. *Blood* **101**, 747–751 (2003).
176. Renoux, C. *et al.* Impact of surface-area-to-volume ratio, internal viscosity and membrane viscoelasticity on red blood cell deformability measured in isotonic condition. *Scientific Reports* **9**, 6771 (2019).
177. Waugh, R. E. & Sarelius, I. H. Effects of lost surface area on red blood cells and red blood cell survival in mice. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **271**, C1847–C1852 (1996).
178. Safeukui, I. *et al.* Quantitative assessment of sensing and sequestration of spherocytic erythrocytes by the human spleen. *Blood* **120**, 424–430 (2012).
179. Looareesuwan, S. *et al.* Dynamic alteration in splenic function during acute falciparum malaria. *N. Engl. J. Med.* **317**, 675–679 (1987).
180. Owen CA, Orvis, A. & Kiely, J. Sequestration of erythrocytes by rat spleen. *American Journal of Physiology-Legacy Content* **211**, 273–280 (1966).
181. Yoshida, T., Prudent, M. & D’Alessandro, A. Red blood cell storage lesion: causes and potential clinical consequences. *Blood Transfusion* **17**, 27–52 (2019).
182. Orlov, D. & Karkouti, K. The pathophysiology and consequences of red blood cell storage. *Anaesthesia* **70**, 29-e12 (2015).
183. Kriebardis, A. G. *et al.* Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **11**, 148–155 (2007).
184. Sparrow, R. L. Time to revisit red blood cell additive solutions and storage conditions: a role for ‘omics’ analyses. *Blood Transfus* **10 Suppl 2**, s7-11 (2012).
185. D’Alessandro, A. *et al.* An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies: An omics update on RBC storage. *Transfusion* **55**, 205–219 (2015).
186. Azouzi Slim *et al.* Band 3 phosphorylation induces irreversible alterations of stored red blood cells. *American Journal of Hematology* **93**, E110–E112 (2018).
187. Wang, D., Sun, J., Solomon, S. B., Klein, H. G. & Natanson, C. Transfusion of older stored blood and risk of death: a meta-analysis. *Transfusion* **52**, 1184–1195 (2012).
188. McQuilten, Z. K., French, C. J., Nichol, A., Higgins, A. & Cooper, D. J. Effect of age of red cells for transfusion on patient outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Transfusion Medicine Reviews* **32**, 77–88 (2018).
189. Hod, E. A. *et al.* Transfusion of human volunteers with older, stored red blood cells produces extravascular hemolysis and circulating non–transferrin-bound iron. *Blood* **118**, 6675–6682 (2011).
190. Rapido, F. *et al.* Prolonged red cell storage before transfusion increases extravascular hemolysis. *J Clin Invest* **127**, 375–382 (2017).
191. Nielsen, N. D., Martin-Loeches, I. & Wentowski, C. The Effects of red Blood Cell Transfusion on Tissue Oxygenation and the Microcirculation in the Intensive Care Unit: A Systematic Review. *Transfusion Medicine Reviews* **31**, 205–222 (2017).

192. Dumont, L. J., AuBuchon, J. P. & Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative. Evaluation of proposed FDA criteria for the evaluation of radiolabeled red cell recovery trials. *Transfusion* **48**, 1053–1060 (2008).
193. Luten Marleen *et al.* Survival of red blood cells after transfusion: a comparison between red cells concentrates of different storage periods. *Transfusion* **48**, 1478–1485 (2008).
194. Rydén, J., Clements, M., Hellström-Lindberg, E., Höglund, P. & Edgren, G. A longer duration of red blood cell storage is associated with a lower hemoglobin increase after blood transfusion: a cohort study. *Transfusion* **59**, 1945–1952 (2019).
195. Hunsicker, O. *et al.* Duration of storage influences the hemoglobin rising effect of red blood cells in patients undergoing major abdominal surgery. *Transfusion* **0**, (2018).
196. Pieracci, F. M. *et al.* The age of transfused blood predicts hematocrit response among critically ill surgical patients. *The American Journal of Surgery* **204**, 269–273 (2012).
197. Kim, J., Usmani, A., Simone, N. D. & Sarode, R. Mathematical calculation of lifespan of transfused RBCs in sickle cell disease patients. *Transfus Apher Sci* **57**, 46–49 (2018).
198. Mastrogiannaki, M. *et al.* Hepatic hypoxia-inducible factor-2 down-regulates hepcidin expression in mice through an erythropoietin-mediated increase in erythropoiesis. *Haematologica* **97**, 827–834 (2012).
199. Saxena, R. K., Bhardwaj, N., Sachar, S., Puri, N. & Khandelwal, S. A Double in vivo Biotinylation Technique for Objective Assessment of Aging and Clearance of Mouse Erythrocytes in Blood Circulation. *TMH* **39**, 335–341 (2012).
200. Sage, B. H., O'Connell, J. P. & Mercolino, T. J. A rapid, vital staining procedure for flow cytometric analysis of human reticulocytes. *Cytometry* **4**, 222–227 (1983).
201. Riemer, J., Hoepken, H. H., Czerwinska, H., Robinson, S. R. & Dringen, R. Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Analytical Biochemistry* **331**, 370–375 (2004).
202. Gilson, C. R. *et al.* A novel mouse model of red blood cell storage and posttransfusion in vivo survival. *Transfusion* **49**, 1546–1553 (2009).
203. Waterman, H. R. *et al.* Analysis of 24-h recovery of transfused stored RBCs in recipient mice of distinct genetic backgrounds. *Vox Sang* **109**, 148–154 (2015).
204. Simon, T. L., McCullough, J., Snyder, E. L. & Sol. *Rossi's Principles of Transfusion Medicine, 5th Edition*. (John Wiley & Sons, 2016).
205. Haute Autorité de Santé, H. A. S. *Transfusions de globules rouges homologues : produits, indications, alternatives*. (2014).
206. Bowman, Z. *et al.* Single versus double-unit transfusion: Safety and efficacy for patients with hematologic malignancies. *European Journal of Haematology* **102**, 383–388 (2019).
207. Shih, A. W. *et al.* Systematic reviews of guidelines and studies for single versus multiple unit transfusion strategies. *Transfusion* **58**, 2841–2860 (2018).
208. Italia, K., Colah, R. & Ghosh, K. Experimental animal model to study iron overload and iron chelation and review of other such models. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **55**, 194–199 (2015).

209. Clausen, B. E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R. & Förster, I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* **8**, 265–277 (1999).
210. Mathieu, J. R. R. *et al.* Investigating the real role of HIF-1 and HIF-2 in iron recycling by macrophages. *Haematologica* **99**, e112–e114 (2014).
211. Rooijen, N. V., Kors, N., Ende, M. v d & Dijkstra, C. D. Depletion and repopulation of macrophages in spleen and liver of rat after intravenous treatment with liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Cell Tissue Res* **260**, 215–222 (1990).
212. Schwartz, A. B. One year of rHuEPO therapy prolongs RBC survival and may stabilize RBC membranes despite natural progression of chronic renal failure to uremia and need for dialysis. *Asaio transactions* **36**, (1990).
213. Polenakovic, M. & Sikole, A. Is erythropoietin a survival factor for red blood cells? *JASN* **7**, 1178–1182 (1996).
214. Joske, R. A., Mcalister, J. M. & Pranker, T. A. Isotope investigations of red cell production and destruction in chronic renal disease. *Clin Sci* **15**, 511–522 (1956).
215. Weiss, G. & Goodnough, L. T. Anemia of Chronic Disease. *New England Journal of Medicine* **352**, 1011–1023 (2005).
216. Georgatzakou, H. T. *et al.* Pathophysiological aspects of red blood cells in end-stage renal disease patients resistant to recombinant human erythropoietin therapy. *Eur J Haematol* **98**, 590–600 (2017).
217. Karafin, M. S. *et al.* The impact of recipient factors on the lower-than-expected hemoglobin increment in transfused outpatients with hematologic diseases. *Transfusion* **59**, 2544–2550 (2019).
218. Merino, C. F. Studies on Blood Formation and Destruction in the Polycythemia of High Altitude. *Blood* **5**, 1–31 (1950).
219. Udden, M. M., Driscoll, T. B., Pickett, M. H., Leach-Huntoon, C. S. & Alfrey, C. P. Decreased production of red blood cells in human subjects exposed to microgravity. *J Lab Clin Med* **125**, 442–449 (1995).
220. Alfrey, C. P., Udden, M. M., Leach-Huntoon, C., Driscoll, T. & Pickett, M. H. Control of red blood cell mass in spaceflight. *J Appl Physiol* **81**, 98–104 (1996).
221. Risso, A., Turello, M., Biffoni, F. & Antonutto, G. Red blood cell senescence and neocytolysis in humans after high altitude acclimatization. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **38**, 83–92 (2007).
222. Risso, A., Ciana, A., Achilli, C., Antonutto, G. & Minetti, G. Neocytolysis: none, one or many? A reappraisal and future perspectives. *Front. Physiol.* **5**, (2014).
223. Rice, L. *et al.* Neocytolysis contributes to the anemia of renal disease. *American Journal of Kidney Diseases* **33**, 59–62 (1999).
224. Mairbäurl, H. Neocytolysis: How to Get Rid of the Extra Erythrocytes Formed by Stress Erythropoiesis Upon Descent From High Altitude. *Front. Physiol.* **9**, (2018).
225. Xiang, J., Wu, D.-C., Chen, Y. & Paulson, R. F. In vitro culture of stress erythroid progenitors identifies distinct progenitor populations and analogous human progenitors. *Blood* **125**, 1803–1812 (2015).

226. Noble, N. A., Xu, Q. P. & Hoge, L. L. Reticulocytes II: Reexamination of the in vivo survival of stress reticulocytes. *Blood* **75**, 1877–1882 (1990).
227. Bosman, G. J. C. G. M., Werre, J. M., Willekens, F. L. A. & Novotný, V. M. J. Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: structural aspects and implications for transfusion. *Transfusion Medicine* **18**, 335–347 (2008).
228. Youssef, L. A. *et al.* Increased erythrophagocytosis induces ferroptosis in red pulp macrophages in a mouse model of transfusion. *Blood* **131**, 2581–2593 (2018).
229. Pantopoulos, K. Inherited Disorders of Iron Overload. *Front. Nutr.* **5**, (2018).
230. Urabe, A., Saito, T., Fukamachi, H., Takaku, F. & Kubota, M. Serum erythropoietin titers in the anemia of chronic renal failure and other hematological states. *The International Journal of Cell Cloning* **5**, 202–208 (1987).
231. Knutson, M. & Wessling-Resnick, M. Iron Metabolism in the Reticuloendothelial System. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **38**, 61–88 (2003).
232. Moura, Verheul & Marx. A functional defect in hereditary haemochromatosis monocytes and monocyte-derived macrophages. *European Journal of Clinical Investigation* **28**, 164–173 (1998).
233. Moura, E., Noordermeer, M. A., Verhoeven, N., Verheul, A. F. M. & Marx, J. J. M. Iron Release From Human Monocytes After Erythrophagocytosis In Vitro: An Investigation in Normal Subjects and Hereditary Hemochromatosis Patients. *Blood* **92**, 2511–2519 (1998).
234. Vinchi, F. *et al.* Transfusion-Induced Impairment of Macrophage Responses Is Partially Restored By the Iron Chelator Deferasirox. *Blood* **132**, 3625–3625 (2018).
235. Ekiz, C., Agaoglu, L., Karakas, Z., Gurel, N. & Yalcin, I. The effect of iron deficiency anemia on the function of the immune system. *Hematol J* **5**, 579–583 (2005).
236. Bergman, M. *et al.* Phagocytic capacity and apoptosis of peripheral blood cells from patients with iron deficiency anemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **59**, 307–311 (2005).
237. Higgins, J. M. & Mahadevan, L. Physiological and pathological population dynamics of circulating human red blood cells. *PNAS* **107**, 20587–20592 (2010).
238. Nairz, M. *et al.* Erythropoietin Contrastingly Affects Bacterial Infection and Experimental Colitis by Inhibiting Nuclear Factor- $\kappa$ B-Inducible Immune Pathways. *Immunity* **34**, 61–74 (2011).
239. Wang, S. *et al.* Erythropoietin protects against rhabdomyolysis-induced acute kidney injury by modulating macrophage polarization. *Cell Death Dis* **8**, e2725 (2017).
240. Lee, J. H. *et al.* Erythropoietin Attenuates Postoperative Cognitive Dysfunction by Shifting Macrophage Activation toward the M2 Phenotype. *Front. Pharmacol.* **8**, (2017).
241. Luo, B. *et al.* Erythropoietin Signaling in Macrophages Promotes Dying Cell Clearance and Immune Tolerance. *Immunity* **44**, 287–302 (2016).
242. Sadiku, P. & Walmsley, S. R. Hypoxia and the regulation of myeloid cell metabolic imprinting: consequences for the inflammatory response. *EMBO reports* **20**, e47388 (2019).
243. Peyssonnaud, C. *et al.* HIF-1 $\alpha$  expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest* **115**, 1806–1815 (2005).

244. Trial, J., Rice, L. & Alfrey, C. P. Erythropoietin Withdrawal Alters Interactions Between Young Red Blood Cells, Splenic Endothelial Cells, and Macrophages: An In Vitro Model of Neocytolysis. *J Investig Med* **49**, 335–345 (2001).
245. Beleslin-Cokic, B. B. *et al.* Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. *Blood* **104**, 2073–2080 (2004).
246. Baciú, I. & Ivanof, L. Erythropoietin Interaction with the Mature Red Cell Membrane. *Annals of the New York Academy of Sciences* **414**, 66–72 (1983).
247. Danielczok, J. *et al.* Does Erythropoietin Regulate TRPC Channels in Red Blood Cells? *CPB* **41**, 1219–1228 (2017).
248. Tong, Q. *et al.* TRPC3 Is the Erythropoietin-regulated Calcium Channel in Human Erythroid Cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 10385–10395 (2008).
249. Chu, X. *et al.* Interaction of TRPC2 and TRPC6 in Erythropoietin Modulation of Calcium Influx. *J. Biol. Chem.* **279**, 10514–10522 (2004).
250. Myssina, S. Inhibition of Erythrocyte Cation Channels by Erythropoietin. *Journal of the American Society of Nephrology* **14**, 2750–2757 (2003).
251. Hod, E. A. *et al.* Use of mouse models to study the mechanisms and consequences of RBC clearance: The mechanisms and consequences of RBC clearance. *Vox Sanguinis* **99**, 99–111 (2010).
252. Moras, M., Lefevre, S. D. & Ostuni, M. A. From Erythroblasts to Mature Red Blood Cells: Organelle Clearance in Mammals. *Front. Physiol.* **8**, (2017).
253. Pasini, E. M. *et al.* Deep Coverage Mouse Red Blood Cell Proteome: A First Comparison with the Human Red Blood Cell. *Molecular & Cellular Proteomics* **7**, 1317–1330 (2008).
254. Hod, E. A. *et al.* Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation. *Blood* **115**, 4284–4292 (2010).
255. Arias, C. F. & Arias, C. F. How do red blood cells know when to die? *R Soc Open Sci* **4**, (2017).
256. Bunn, H. F., Haney, D. N., Kamin, S., Gabbay, K. H. & Gallop, P. M. The biosynthesis of human hemoglobin A1c. Slow glycosylation of hemoglobin in vivo. *J Clin Invest* **57**, 1652–1659 (1976).
257. Patel, H. H., Patel, H. R. & Higgins, J. M. Modulation of red blood cell population dynamics is a fundamental homeostatic response to disease. *Am J Hematol* **90**, 422–428 (2015).
258. Engström, G. *et al.* Red cell distribution width, haemoglobin A1c and incidence of diabetes mellitus. *Journal of Internal Medicine* **276**, 174–183 (2014).
259. Veeranna, V., Zalawadiya, S. K., Panaich, S. S., Ramesh, K. & Afonso, L. The Association of Red Cell Distribution Width with Glycated Hemoglobin among Healthy Adults without Diabetes Mellitus. *Cardiology* **122**, 129–132 (2012).
260. Swart, L. de *et al.* Impact of red blood cell transfusion dose density on progression-free survival in lower-risk myelodysplastic syndromes patients. *Haematologica* Epub ahead of print (2019). doi:10.3324/haematol.2018.212217
261. DeZern, A. E. *et al.* Patterns of treatment and costs associated with transfusion burden in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia & Lymphoma* **58**, 2649–2656 (2017).



## Annexe 1

Manuscrit issu de la partie A des résultats, en préparation pour soumission.



***Erythropoietin controls RBC clearance at Steady-State and in Response to Anemia***

Colard M<sup>1,2,3</sup>, Dussiot M<sup>1,2</sup>, Martinez A<sup>1</sup>, Peyssonnaud C<sup>2,4</sup>, Mayeux P<sup>2,4</sup>, Benghiat FS<sup>3</sup>, Buffet P<sup>2,5,6,7,8</sup>, Hermine O<sup>1,2,8</sup>, Amireault P<sup>1,2,5,6</sup>.

1. Laboratory of Cellular and Molecular Mechanisms of Hematological Disorders and Therapeutic Implications U1163/CNRS ERL 8254, INSERM, CNRS, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France
2. Laboratoire d'Excellence GR-Ex, Paris, France
3. Université Libre de Bruxelles, Hopital Erasme, Department of Hematology, Brussels, Belgium
4. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1016, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 8104, Institut Cochin, Paris, France
5. Biologie Intégrée du Globule Rouge UMR\_S1134, INSERM, Univ. Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Université de la Réunion, Université des Antilles, Paris, France
6. Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris, France
7. Université Paris Descartes, Paris, France
8. Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris, France

## Introduction

Erythropoiesis produces about  $2.10^6$  red blood cells (RBC) every second. After their release from the bone marrow, RBC circulate for about 120 days in humans and 45-55 days in mice<sup>1,2</sup>. During their lifespan in circulation, they undergo a wide range of physiological modifications ultimately leading to their senescence and removal from circulation. RBC production and clearance occur permanently. They must thus equilibrate to maintain an appropriate number of RBC while avoiding the persistence in circulation of damaged, potentially harmful<sup>3</sup> RBC. These balanced activities require fine regulation.

On the production side, the physiological response to anemia and consequently hypoxia has been and is still extensively studied. The regulation of RBC production depending on the need for oxygen supply is well described and is under the hormonal control of erythropoietin (EPO) whose oxygen-dependent production is regulated by hypoxia<sup>4-7</sup>. Increased EPO levels induces the proliferation and improved survival of erythroid progenitors, leading to the production of new RBC.

Contrastingly, considerably less is known about the regulation of RBC clearance. Among the modifications of ageing RBC, some are proposed to be the trigger for clearance although no single signal has been proven causative. The most commonly proposed signals, which are not mutually exclusive and whose importance probably varies according to the context, are: membrane loss by vesiculation causing a decrease of the RBC membrane surface and cellular volume ratio (S/V ratio) and leading to impaired deformability; phosphatidylserine exposure at the outer leaflet of RBC membrane; alterations or abnormal distribution (namely clustering) of the most abundant membrane protein "band3" notably causing the development of anti-band3 antibodies with further implication of the complement system; and quantitative or qualitative anomalies of the "don't eat me" signal of the CD47 protein<sup>8-14</sup>. Once tagged for clearance, RBC are removed from circulation essentially by extravascular hemolysis. The spleen is generally designated as the main clearance site with some contribution of the liver and the bone marrow although the relative involvement of each organ in this process remains to be clarified. In these organs, macrophages (i.e. red pulp macrophages and Kupffer cells for the spleen and the liver respectively) are responsible for the safe clearance and recycling of senescent RBC by a process called erythrophagocytosis<sup>15,16</sup>. If the spleen and liver share the ability to recognize immune signals on senescent RBC, data show that RBC deformability testing is a function restricted to the spleen that retains RBC with altered deformability<sup>15,17-19</sup>. We thus know the sites and main operators of RBC clearance, but its potential regulation remains to be determined. Intrinsic RBC defects and antibody-mediated RBC clearance apart, variations in clearance mechanisms and specifically the effect of environment have been less investigated despite interesting works addressing the reduced RBC lifespan observed during chronic renal failure and anemia of chronic diseases<sup>20-24</sup>. The response to

anemia and hypoxia however remains to be directly investigated. The main objective of this study was to investigate the possibility that, similarly to RBC production, RBC clearance might be physiologically regulated by hypoxia and therefore that its downregulation could contribute to maintain an appropriate RBC biomass. Different mouse models were used to evaluate the impact of specific parameters on RBC clearance including: phlebotomy-induced anemia, normobaric hypoxia, erythropoiesis-stimulating agent (ESA) treatment (darbepoietin), splenectomy, doxorubicin-induced inhibition of erythropoiesis and EPO neutralization (anti-EPO rabbit serum) either alone or in combination. Here we show that the physiological response to anemia is to prematurely decrease RBC clearance in an erythropoiesis-independent EPO-driven manner.

## Material and methods

### Animal models

For splenectomy experiments, C57BL/6JRj splenectomized and control mice were purchased from Janvier Labs (Saint Berthevin, France). For all other experiments, C57BL/6JOLaHsd mice were used and purchased from Envigo RMS (Gannat, France). All experiments were conducted using 7-10 week-old female mice (20-25g) in a pathogen free facility according to European Directives (EU2010/63) and were approved by the local Ethics Committee of Paris Descartes University and the French Ministry of Education and Research (approval n°12071-2017012712012626 v5).

### *In vivo* biotinylation

Two steps *in vivo* biotinylation was performed as described by Saxena *et al*<sup>25</sup>. For biotinylation of circulating RBC, mice were anesthetized with isoflurane and locally with 1% tetracaine and were given i.v. injection of biotin-N-hydroxysuccinimide ester (Sigma Aldrich) (suspended in DMSO and diluted in phosphate buffered saline) through the retro-orbital plexus. The first step consisted in three consecutive daily injection of 1mg of biotin followed after seven days by one injection of 0.6mg of biotin. 2µl of blood was sampled from tail vein at various time point after the second biotinylation step and proportion of RBC cohorts were analyzed by flow cytometry (Gallios, Beckman Coulter) after staining with streptavidin-APC (Invitrogen).

### Blood banking and transfusion

Mice were anesthetized with ketamine (100mg/kg) and xylazine (10mg/kg) and bled aseptically by cardiac puncture with a syringe containing 50µl of Citrate-phosphate-dextrose (CPDA) solution (Sigma Aldrich). One volume of CPDA was then further added to 9 volumes of blood. The collected whole blood was pooled and leukoreduced using a Leukocyte Reduction Filter (PALL Corporation). Blood was centrifuged at 600g for 15min and the hematocrit adjusted to 75% with CPDA plasma. RBC were stored in tubes for various periods in the dark at 4°C.

Before transfusion, stored RBC were stained with 20 µM CFSE (Sigma Aldrich), washed twice and resuspended in RPMI at 75% of final hematocrit. CFSE<sup>+</sup> RBC suspensions (200µL) were transfused through the retro-orbital plexus. 2µl of blood was sampled from tail vein at 5min, 2h and 24h post-transfusion (PT). These samples were stained for reticulocytes as described by Sage *et al*<sup>26</sup> by

incubation in 50µL of thioflavin T (Sigma Aldrich) 0.03%w/v solution 7min at room temperature in the dark. The proportion of reticulocytes and CFSE<sup>+</sup>RBC circulating at 5min, 2h and 24h post-transfusion (PT) was measured among total RBC, by flow cytometry (Gallios, Beckman Coulter). RBC clearance was calculated using the following formula:

$$100 - \left( \frac{\% \text{ of CFSE}^+ \text{RBC in the sample at time point}}{\% \text{ of CFSE}^+ \text{RBC in the 5 min sample}} \times 100 \right).$$

## **Treatments**

To induce anemia by phlebotomy, mice were anesthetized with isoflurane and locally with 1% tetracaine and bled through the retro-orbital plexus on two consecutive days beginning three days before transfusion. 300µL of blood were withdrawn on the first day and 200µL on the second day, each time compensated by the same volume of warm PBS. Hypoxia experiments were conducted by exposing mice to normobaric hypoxic environment at indicated oxygen concentration from 24h before transfusion until the end of the follow-up. For EPO-analog treatment, mice were given darbepoietin (10µg/kg unless otherwise specified) intraperitoneally 24h before transfusion. Endogenous EPO neutralization was performed using anti-erythropoietin blocking serum. The neutralizing capacity of this serum was assessed previously<sup>27</sup> and is 50ng of recombinant erythropoietin (5 EPO units) for 100µL of serum. Total amount of circulating EPO was evaluated and mice were given the quantity of serum able to neutralize 3-fold this amount at each injection. Injections were performed under anesthesia with isoflurane and locally with 1% tetracaine and following the schedule indicated in Figure 3A.

## **Plasmatic erythropoietin level measurement**

Plasmatic erythropoietin level was determined using Quantikine<sup>®</sup> mouse erythropoietin immunoassay kit (R&D Systems). Plasma was collected using heparin as an anticoagulant and after centrifugation of whole blood samples for 20min at 2000g within 30min of collection.

## **Hemoglobin measurement**

Hemoglobin concentration from whole blood was determined by colorimetric assay at 540nm (Infinite<sup>®</sup> 200 PRO, Tecan) using Drabkin's reagent (Sigma Aldrich). Standard solutions were prepared from dilution of control mice blood whose hemoglobin concentration was measured by ProCyte Dx<sup>®</sup> (IDEXX Laboratories).

## **Statistical Analysis**

Statistical analyses were performed using the Prism software (version 5.01; GraphPad Software Inc.). Gaussian distribution was evaluated using D'Agostino-Pearson normality test. Means were compared using unpaired Student's t-test. When more than two groups are compared, a one-way ANOVA was used followed by the indicated post-test. A  $p$ -value  $<0.05$  was considered statistically significant. Statistical significance is indicated by \* symbols (\* $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ).

## Results

### EPO increases the RBC life span by decreasing clearance of the oldest subpopulation

The fate of different subpopulations of circulating RBC was first determined using a two steps *in vivo* biotinylation protocol as previously described<sup>28</sup> (Suppl. Figure 1). This allows the differential staining and evaluation of the kinetics of production and clearance of three RBC subpopulations of different age (Figure 1A). The RBC subpopulation of intermediate age (which is neither produced nor cleared) was used as a normalizer to evaluate the rate of production of the young subpopulation and the clearance of the old subpopulation. To mimic the anemia-induced EPO increase, mice were given the EPO-analog (darbepoetin) every 3 days starting on day 25 of the biotinylation protocol. As expected, an increase of the young RBC subpopulation production rate (defined as Biotin<sup>Neg</sup> on Biotin<sup>Low</sup> ratio) was observed 7 days after the beginning of EPO treatment (Figure 1B). A significant effect on the clearance rate of the oldest population (defined as Biotin<sup>Hi</sup> on Biotin<sup>Low</sup> ratio) was observed only 2 days after EPO treatment. At the end of study period, the absolute number of each RBC subpopulation was measured by conducting a blood count. EPO-treated mice showed an increased number of RBC from the oldest subpopulation when compared to the control group ( $12,75.10^8 \pm 1,05.10^8$  vs  $7,01.10^8 \pm 0,49.10^8$  RBC.  $p=0,0001$ ) (Figure 1C). Since the oldest subpopulation is not produced after biotin staining, these results show that EPO decreases clearance of the oldest RBC in circulation.

### Anemia, hypoxia and EPO decreases the post-transfusion clearance of storage-damaged RBC

Since senescent RBC represent a small subpopulation of RBC whose variations are difficult to capture on a short period of time, we next used a mouse model of RBC banking and transfusion<sup>3,+MouseStorix</sup> to further explore the mechanisms involved in the regulation of RBC clearance. After 14 days of storage (long-stored), RBC were stained with CFSE, transfused and blood samples were collected at 5min, 2h and 24h after transfusion to evaluate RBC clearance. This transfusion model allows to quantify the clearance of a stable number of storage-damaged RBC, and thus to directly compare selected conditions.

We first evaluated the effect of acute phlebotomy-induced anemia on transfused RBC (tRBC) clearance. Hb and reticulocytes levels of mice from different models are shown in Figure 2A. tRBC clearance is reduced by 27% in anemic recipients when compared to control ( $21.4 \pm 3.4$  vs  $29.4 \pm 1.1\%$  respectively.  $p < 0.0001$ ) (Figure 2B, top). We observed a negative linear correlation between the reduction of tRBC clearance and pre-transfusion hemoglobin (Spearman  $r = 0.63$ .  $P < 0.0001$ ) (Figure 2B, bottom).

We next exposed recipients to 10%O<sub>2</sub> normobaric hypoxia 24h before and until 24h after transfusion. Hypoxia decreases tRBC elimination by 51% (27.7±1.2% in control vs 13.6±2.1 in hypoxia, p<0.0001) (Figure 2C, top). Hypoxic mice were not anemic suggesting that low hematocrit *per se* does not affect tRBC elimination. Similarly to pre-transfusion Hb, we observed a dose-dependent effect of hypoxia on the reduction of tRBC clearance (p<0,001) (Figure 2C, bottom).

To evaluate the effect of EPO, non-anemic non-hypoxic mice were given EPO-analog (darbepoietin 10µg/kg i.p.) 24h before transfusion. In EPO-treated non-anemic non-hypoxic mice, tRBC elimination is reduced by 29% (29.7±1.3% in control vs 21.1±1.5% in EPO-treated. p=0.0003) showing that EPO alone is sufficient to decrease tRBC clearance (Figure 2D, top). This reduction also is dose-dependent (p=0.0018) (Figure 2D, bottom).

### **EPO neutralization increases the post-transfusion clearance of storage-damaged RBC**

Since EPO downregulates tRBC clearance, we next investigated the effect of EPO neutralization. The plasmatic EPO level was first quantified in anemic and control mice to determine the circulating EPO level (Figure 3A). A dose of EPO neutralizing antibody expected to neutralize a plasmatic concentration of xpg/ml (3X the EPO of the phlebotomy group) was administered according to a protocol described in figure 3B. To rule out variation in tRBC clearance induced by the EPO neutralizing antibody, we confirmed it did not modify short-stored RBC clearance in control mice (Figure 3C). EPO neutralization abolished the anemia-induced downregulation of tRBC clearance (Figure 3D). Even more, it increases tRBC clearance in both anemic (36.4±1.6%) and non-anemic mice (35.4±1.3%) when compared to non-anemic controls (28.8±1.4%, p<0.01) (Figure 3D). These results show that EPO is necessary for the downregulation of RBC clearance during anemia and its neutralization, even in non-anemic mice, causes a significant increase in tRBC elimination.

### **EPO-driven downregulation of storage-damaged clearance is not spleen-specific**

We next evaluated the effect of acute anemia, hypoxia and EPO-treatment in splenectomized mice to determine if RBC clearance downregulation is specific to this important organ of tRBC clearance that possesses distinctive RBC filtration capacities. We first confirmed that splenectomy decreases tRBC elimination (27.9±1.0% in control vs 21.7±0.9% in splenectomized mice. p<0.001) (Figure 4A). Interestingly, we observed that tRBC elimination is further reduced by hypoxia (13.6±1.9%) and EPO-treatment (15.7±1.4%) in splenectomized recipients when compared to non-anemic splenectomized



mice ( $21.7 \pm 0.9\%$ ,  $p < 0.01$ ) (Figure 4B). These results indicate that the EPO-driven downregulation is not spleen-specific even though this organ has a significant role in tRBC clearance.

### **Anemia-induced downregulation of storage-damaged clearance does not require stress erythropoiesis**

We next evaluated the role of stress erythropoiesis on tRBC clearance since the three models explored (i.e. acute anemia, hypoxia and EPO-treatment) stimulate erythropoietic production. Doxorubicin treatment prior to the induction of anemia abrogates the anemia-induced increase in reticulocytes confirming erythropoiesis inhibition (figure 4C). This inhibition does not affect tRBC clearance in non-anemic mice and does not impair the anemia-induced downregulation of tRBC clearance (Figure 4D). These data indicate that anemia-induced downregulation of tRBC clearance does not require stress erythropoiesis.

## Discussion

We demonstrated, in four independent models, that RBC clearance is down regulated during anemia and hypoxia. EPO is sufficient to downregulate RBC clearance both in a model of senescent and storage-damaged RBC. In addition, EPO neutralization abrogates anemia-induced downregulation of tRBC clearance and even causes an increase in tRBC clearance in non-anemic mice, showing that EPO is necessary for its regulation, even in absence of anemia. Taken together, these data show that, mirroring erythropoiesis, EPO level regulates RBC clearance to maintain an appropriate RBC biomass in circulation.

We tested the effect of each step of the "anemia-hypoxia-EPO" sequence on the elimination of erythrocytes altered by storage and demonstrated, for each one, a significant reduction in elimination (ranging from 27 to 51% depending on the model). This approach by successive deletion of an element of the sequence has made it possible to determine the different parameters involved in this reduction phenomenon and is made possible by the use of the transfusion model. Indeed, this model allows the study of erythrocyte elimination in the short term (over 24 hours) which is not possible in the context of endogenous RBCs due to their low daily elimination rate.

With regard to the various parameters identified, the effect of hypoxia in non-anemic mice indicates the independence of the phenomenon from hematocrit and makes it possible to rule out a mechanical effect of facilitating the passage of the splenic filter through a decreased hematocrit. The efficacy of ESA treatment in non-anemic and non-hypoxic mice has demonstrated that EPO alone is sufficient to induce the reduction of erythrocyte elimination. This effect is consistent with the result of ESA treatment on reducing the elimination of endogenous RBCs.

Similarly, the proportionality between the stimulation applied (depth of anemia, extent of hypoxia and dose of ESA) and the elimination reduction response strengthens the link with EPO. Indeed, the regulation of EPO production is also proportional to the importance of hypoxia (and therefore anemia)<sup>29</sup>.

The major effect of the neutralization of circulating EPO on the elimination of RBC is also particularly interesting. On the one hand, this neutralization leads to the abolition of the reduction in RBC elimination, which indicates that EPO is essential to the effectiveness of this mechanism. On the other hand, the significant increase in elimination after neutralization, in particular in non-anemic mice, highlights a new homeostatic role of EPO in regulating RBC elimination at steady-state.

To our knowledge, this specific repressive role of EPO on erythrocyte elimination has never been addressed. Nevertheless, various elements in the literature suggest that EPO could regulate the lifetime of the RBC and the existence of mechanisms to regulate elimination.

Indeed, in the context of anemia associated with chronic renal failure, various mechanisms have been identified as responsible for anemia, including altered production due to decreased EPO stimulation, a decrease in the RBC lifespan<sup>20,30,31</sup> proportional to the extent of renal failure, and due to a hostile pro-oxidative environment, but also to the activation of the phagocytic system. A regulatory effect of EPO has been shown by the improvement of erythrocyte lifetime in patients with renal failure treated with ESA<sup>20,30</sup> and this effect is reversible upon discontinuation of treatment. The observation of an increase in erythrocyte lifetime may be due to the effect of EPO on the quality of the RBC produced in the uremic context. Nevertheless, some observations report a normal lifespan of RBC from patients with renal insufficiency transfused into healthy volunteers demonstrating at least partial involvement of the wider environment in RBC elimination<sup>31</sup>. The effect of EPO could therefore also influence the elimination regardless of the quality of the RBC production.

In our transfusion model, we observed an inverse correlation between pre-transfusion hemoglobin and RBC elimination, probably due to the proportionality of the increase in EPO levels. This proportionality between hemoglobin and transfusion efficiency has recently been demonstrated in two major independent human studies<sup>32,33</sup>. If the techniques for evaluating transfusion effectiveness between these studies and our cannot be compared as they stand. The link between the importance of anemia and transfusion efficacy reinforces the idea of proportionality between the level of EPO and the reduction in RBC elimination.

Nonetheless, the type of RBC involved is an essential parameter of elimination. Indeed, many alterations which develop during ageing in circulation or during cold storage have been described. While the context in which these alterations are acquired differently, their nature and the consequences of their accumulation are for the most part common. Moreover, the concordance of the results between these two types of RBC indicates at least, if not a mechanism, a common purpose of the signals related to anemia: the reduction of elimination regardless of the erythrocyte signal that triggers it.

This points to another potential effect of EPO on RBC elimination which is direct modification of RBC features. Indeed, although reticulocytes and mature RBC do not possess the canonical EPOR<sup>34</sup>, the binding capacity of EPO on mature RBC was demonstrated a long time ago<sup>35</sup> and a few works addressed the direct effect of EPO on mature RBC. Notably, EPO could modify the cation channels function<sup>36–38</sup>. In particular, the effect on Ca<sup>2+</sup> entry alters not only the volume, which is known to alter RBC deformability, but also PS exposure, two factors leading to RBC elimination<sup>39</sup>. The reduction in RBC elimination we observed could then, in part, due to EPO-mediated reduction in Ca<sup>2+</sup> entry. The effect of EPO is then potentially complex and concerning more than one target and possibly benefit from co-factors.

The existence of homeostatic regulation mechanisms for elimination has previously been theorized although it has, so far, never been demonstrated experimentally<sup>40,41</sup>. In 2010, John Higgins proposed a mathematical model based on conventional blood count data that predicted the evolution of different erythrocyte parameters during aging. Based on the presence, in patients with iron deficiency but non-anemic, of a subpopulation of aged RBC population, he proposed that this could reflect a temporarily lowered RBC elimination to compensate for a decrease in production and thus contribute to maintaining the number of circulating RBC.

On the basis of these human data, the literature and our experimental results, we propose a dynamic model (Figure 5) where the RBC lifespan is determined by two factors: the importance of its alterations and the activity of the erythrophagocytic system. The convergence of these two factors defines a threshold for RBC elimination. In anemia or hypoxia, the increase in EPO would potentially affect one or more of these factors to shift the elimination threshold to a decreased clearance.

In transfusion, the impact of the recipient's condition on transfusion efficiency remains largely unexplored since, to date, most research efforts have focused on the impact of storage lesion. A possible deregulation of the mechanisms controlling the clearance threshold would reduce the effectiveness of transfusion and therefore increase the need for transfusion.

The integration of this factor into the pathophysiological studies of these diseases could lead to the development of new therapeutic targets and improve their overall management.

### **Conclusion**

Our results confirm, for the first time experimentally, the existence of a regulatory mechanism for RBC elimination. This mechanism is mediated by a new homeostatic effect of EPO, the reduction of RBC elimination. EPO therefore has two independent effects, but with a similar purpose: to maintain an adequate number of RBC in circulation. On the one hand, by regulating production and on the other hand, by modulating RBC elimination both in normal situations and in response to acute anemia.

Although the precise targets and effector mechanisms of EPO have yet to be identified, this work paves the way for the study of a new aspect of erythrocyte physiology by addressing the (dys)regulation of RBC elimination under normal and pathological conditions regardless of the quality of the RBC. A precise understanding of this mechanism and its potential involvement in both pathology and transfusion would also ultimately lead to the development of new therapeutic tools.

## References

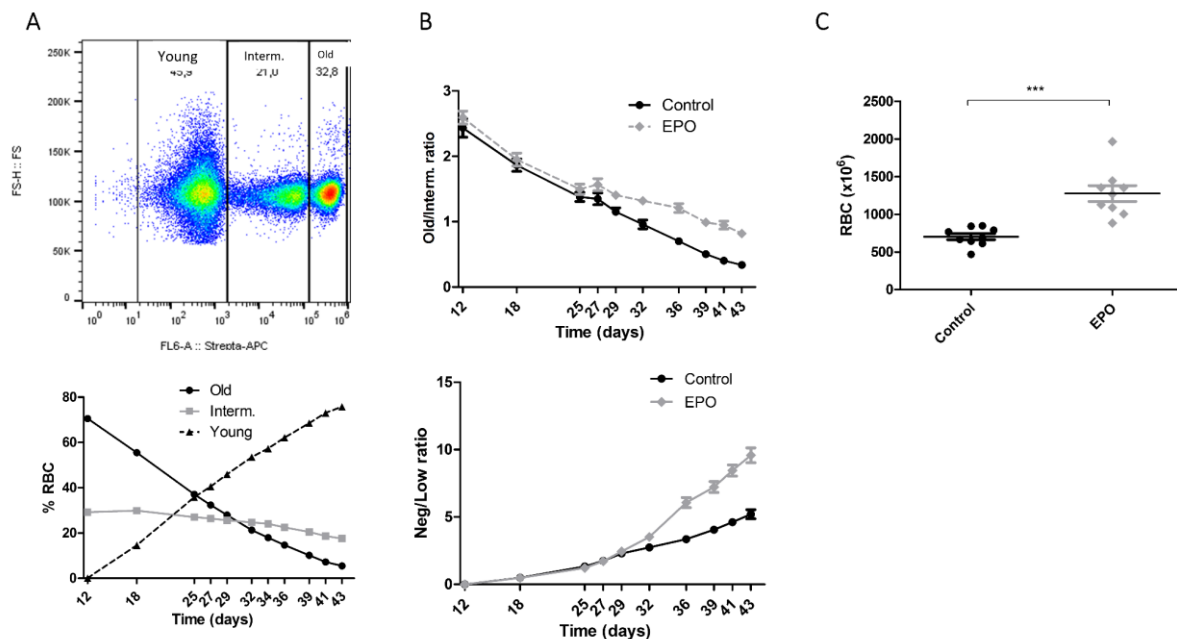
1. Dholakia, U., Bandyopadhyay, S., Hod, E. A. & Prestia, K. A. Determination of RBC Survival in C57BL/6 and C57BL/6-Tg(UBC-GFP) Mice. *Comp. Med.* 65, 196–201 (2015).
2. Gilson, C. R. et al. A novel mouse model of red blood cell storage and posttransfusion in vivo survival. *Transfusion (Paris)* 49, 1546–1553 (2009).
3. Hod, E. A. et al. Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation. *Blood* 115, 4284–4292 (2010).
4. Gruber, M. et al. Acute postnatal ablation of Hif-2  $\alpha$  results in anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 2301–2306 (2007).
5. Scortegagna, M. et al. HIF-2  $\alpha$  regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner. *Blood* 105, 3133–3140 (2005).
6. Anderson, S. A. et al. The IRP1-HIF-2  $\alpha$  Axis Coordinates Iron and Oxygen Sensing with Erythropoiesis and Iron Absorption. *Cell Metab.* 17, 282–290 (2013).
7. Koury, M. J. & Haase, V. H. Anaemia in kidney disease: harnessing hypoxia responses for therapy. *Nat. Rev. Nephrol.* 11, 394–410 (2015).
8. Lutz, H. U. & Bogdanova, A. Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans. *Front. Physiol.* 4, 387 (2013).
9. Qadri, S. M., Bissinger, R., Solh, Z. & Oldenburg, P.-A. Eryptosis in health and disease: A paradigm shift towards understanding the (patho)physiological implications of programmed cell death of erythrocytes. *Blood Rev.* 31, 349–361 (2017).
10. Bratosin, D. et al. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie* 80, 173–195 (1998).
11. Kay, M. M. Mechanism of removal of senescent cells by human macrophages in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 3521–3525 (1975).
12. Kaufman, R. Red Blood Cell Life Span, Senescence, and Destruction. in *Anemia* (eds. Benz, Jr., E. J., Berliner, N. & Schiffman, F. J.) 19–22 (Cambridge University Press, 2017). doi:10.1017/9781108586900.004
13. de Back, D. et al. Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Front. Physiol.* 5, (2014).
14. Oldenburg, P.-A. Role of CD47 in Erythroid Cells and in Autoimmunity. *Leuk. Lymphoma* 45, 1319–1327 (2004).
15. Mebius, R. E. & Kraal, G. Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 606–616 (2005).
16. Theurl, I. et al. On-demand erythrocyte disposal and iron recycling requires transient macrophages in the liver. *Nat. Med.* 22, 945–951 (2016).
17. Pivkin, I. V. et al. Biomechanics of red blood cells in human spleen and consequences for physiology and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 7804–7809 (2016).
18. Groom, A. C. The Microcirculatory Society Eugene M. Landis award lecture. Microcirculation of the spleen: new concepts, new challenges. *Microvasc. Res.* 34, 269–289 (1987).

19. Duez, J. et al. Mechanical clearance of red blood cells by the human spleen: Potential therapeutic applications of a biomimetic RBC filtration method. *Transfus. Clin. Biol.* 22, 151–157 (2015).
20. Schwartz, A. B. One year of rHuEPO therapy prolongs RBC survival and may stabilize RBC membranes despite natural progression of chronic renal failure to uremia and need for dialysis. *Asaio Trans.* 36, (1990).
21. Weiss, G., Ganz, T. & Goodnough, L. T. Anemia of inflammation. *Blood* 133, 40–50 (2019).
22. Ly, J., Marticorena, R. & Donnelly, S. Red blood cell survival in chronic renal failure. *Am. J. Kidney Dis.* 44, 715–719 (2004).
23. Kruse, A., Uehlinger, D. E., Gotch, F., Kotanko, P. & Levin, N. W. Red Blood Cell Lifespan, Erythropoiesis and Hemoglobin Control. *Hemodial. - Basic Res. Clin. Trials* 161, 247–254 (2008).
24. Straat, M., van Bruggen, R., de Korte, D. & Juffermans, N. P. Red Blood Cell Clearance in Inflammation. *Transfus. Med. Hemotherapy* 39, 353–360 (2012).
25. Saxena, R. K., Bhardwaj, N., Sachar, S., Puri, N. & Khandelwal, S. A Double in vivo Biotinylation Technique for Objective Assessment of Aging and Clearance of Mouse Erythrocytes in Blood Circulation. *Transfus. Med. Hemotherapy* 39, 335–341 (2012).
26. Sage, B. H., O'Connell, J. P. & Mercolino, T. J. A rapid, vital staining procedure for flow cytometric analysis of human reticulocytes. *Cytometry* 4, 222–227 (1983).
27. Mastrogiannaki, M. et al. Hepatic hypoxia-inducible factor-2 down-regulates hepcidin expression in mice through an erythropoietin-mediated increase in erythropoiesis. *Haematologica* 97, 827–834 (2012).
28. Saxena, R. K., Bhardwaj, N., Sachar, S., Puri, N. & Khandelwal, S. A Double in vivo Biotinylation Technique for Objective Assessment of Aging and Clearance of Mouse Erythrocytes in Blood Circulation. *Transfus. Med. Hemotherapy* 39, 335–341 (2012).
29. Wenger, R. H. & Kurtz, A. Erythropoietin. in *Comprehensive Physiology* 1759–1794 (American Cancer Society, 2011). doi:10.1002/cphy.c100075
30. Polenakovic, M. & Sikole, A. Is erythropoietin a survival factor for red blood cells? *J. Am. Soc. Nephrol.* 7, 1178–1182 (1996).
31. Joske, R. A., Mcalister, J. M. & Prankerd, T. A. Isotope investigations of red cell production and destruction in chronic renal disease. *Clin. Sci.* 15, 511–522 (1956).
32. Karafin, M. S. et al. Risk factors for red blood cell alloimmunization in the Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study (REDS-III) database. *Br. J. Haematol.* 181, 672–681 (2018).
33. Roubinian, N. et al. Effect of donor, component and recipient characteristics on hemoglobin increments following red blood cell transfusion. *Blood* blood.2019000773 (2019). doi:10.1182/blood.2019000773
34. Broudy, V. C., Lin, N., Brice, M., Nakamoto, B. & Papayannopoulou, T. Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood* 77, 2583–2590 (1991).
35. Baci, I. & Ivanof, L. Erythropoietin Interaction with the Mature Red Cell Membrane. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 414, 66–72 (1983).
36. Föllner, M. et al. Enhanced susceptibility to suicidal death of erythrocytes from transgenic mice overexpressing erythropoietin. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R1127–R1134 (2007).

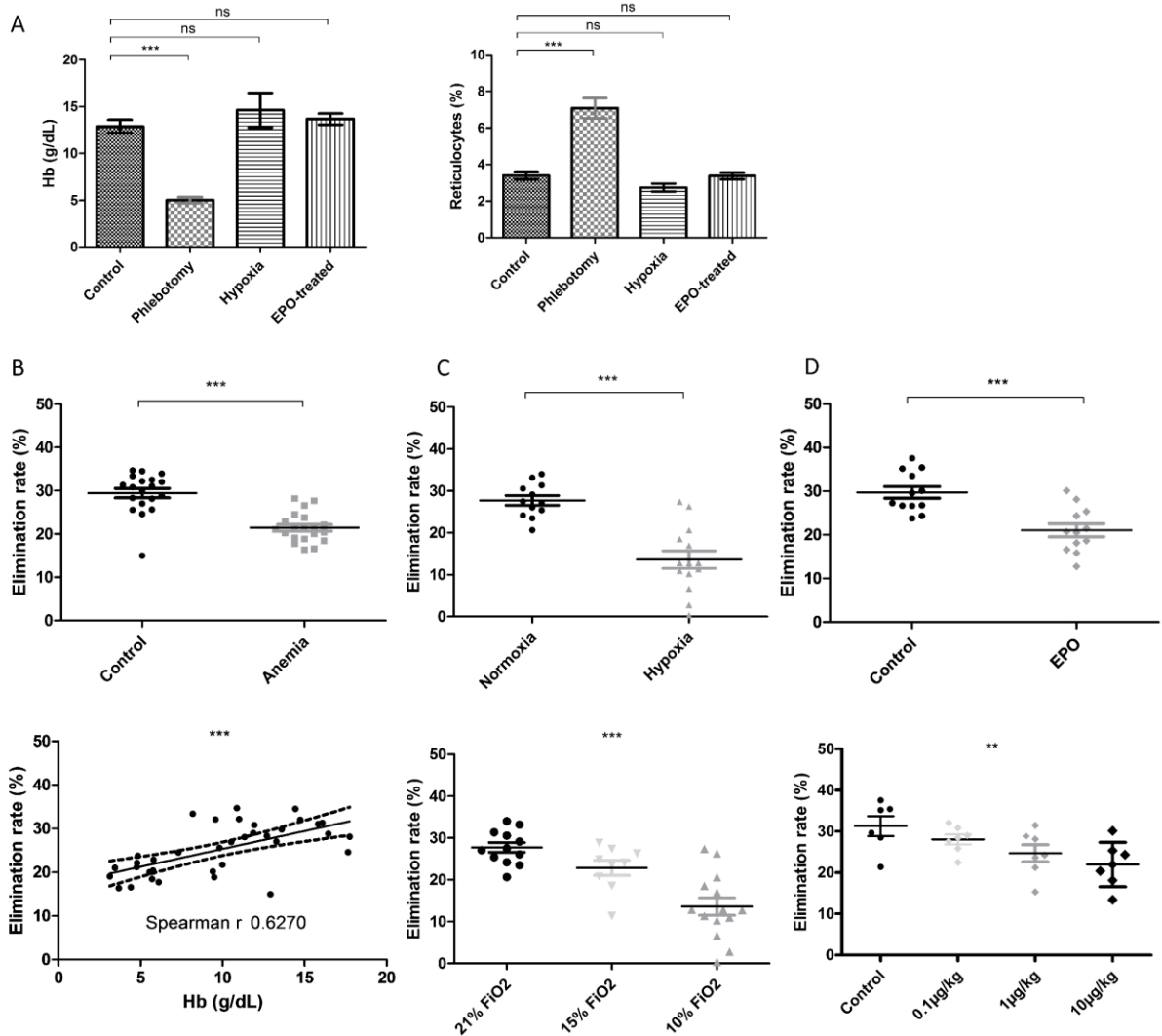
37. Myssina, S. Inhibition of Erythrocyte Cation Channels by Erythropoietin. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 2750–2757 (2003).
38. Danielczok, J. et al. Does Erythropoietin Regulate TRPC Channels in Red Blood Cells? *Cell. Physiol. Biochem.* 41, 1219–1228 (2017).
39. Lang, F. et al. Cation channels, cell volume and the death of an erythrocyte. *Pflüg. Arch.* 447, 121–125 (2003).
40. Higgins, J. M. Red Blood Cell Population Dynamics. *Clin. Lab. Med.* 35, 43–57 (2015).
41. Patel, H. H., Patel, H. R. & Higgins, J. M. Modulation of red blood cell population dynamics is a fundamental homeostatic response to disease. *Am. J. Hematol.* 90, 422–428 (2015).
42. Arias, C. F. & Arias, C. F. How do red blood cells know when to die? *R. Soc. Open Sci.* 4, (2017).



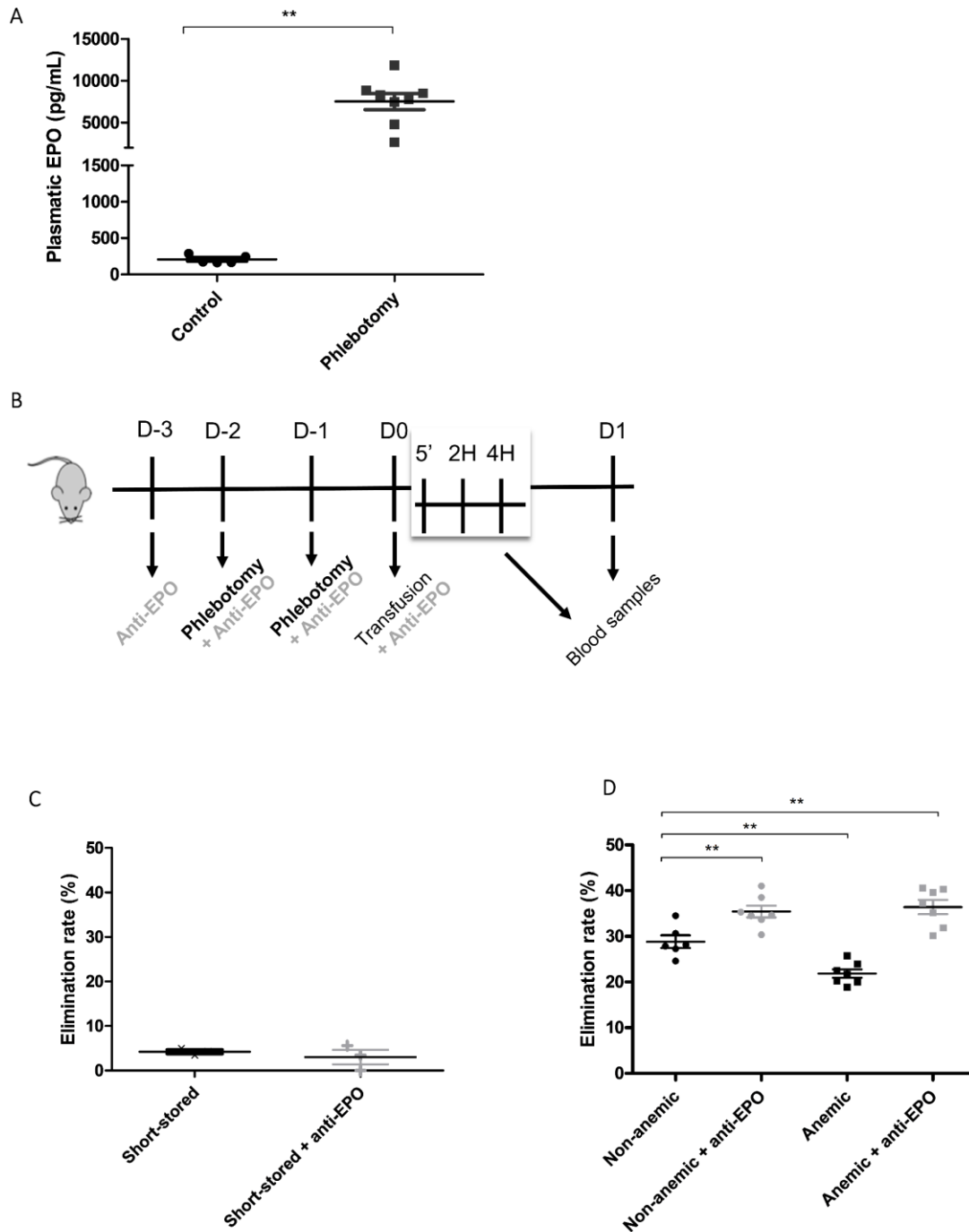
## Figures



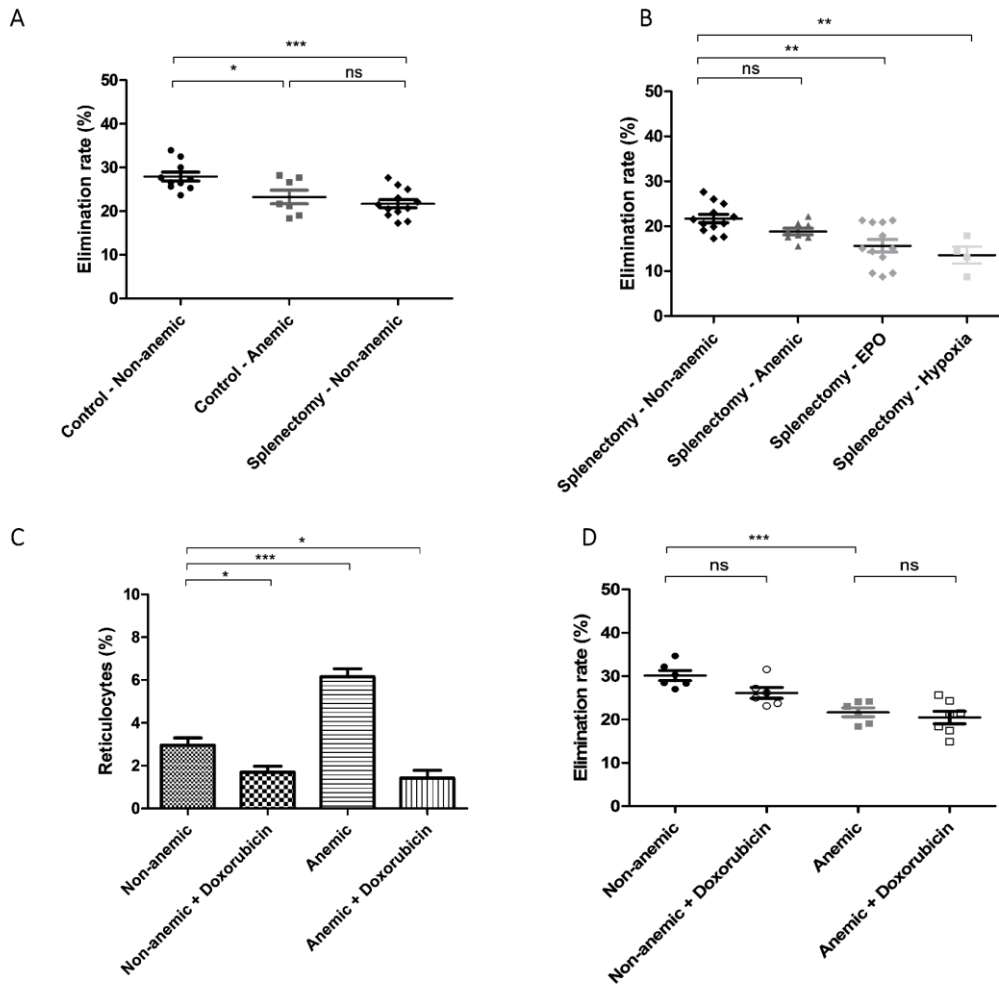
**Figure 1: Effect of EPO on endogenous senescent RBC elimination.** Differential *in vivo* biotinylation was used to separate three sub-populations of RBC based on their age and evaluate their lifespan. Typical example of RBC separation and evolution is shown (A top and bottom respectively). Elimination rate of the oldest population was calculated from the rate of old RBC normalized with the rate of intermediate RBC. This elimination ratio was evaluated in control and EPO-treated mice (darbepoietin 10 $\mu$ g/kg i.p. every 3 days starting on day 25) (B top). Similarly, production rate (young RBC rate normalized with intermediate) was also evaluated (B bottom). At the end of the treatment period, the absolute number of the oldest fraction was measured (C). n = a minimum of 6 mice/group. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*\*\*p<0,001



**Figure 2: Effect of anemia, hypoxia and EPO on long-stored transfused RBC elimination.** The impact of phlebotomy-induced anemia, EPO-analog treatment (darbepoietin) and normobaric hypoxia on transfused RBC (tRBC) elimination was evaluated. Hemoglobin (Hb) and reticulocytes from each model at the time of transfusion is shown(A). Acute anemia (B, top), normobaric hypoxia (10%O<sub>2</sub> 24h prior to transfusion) (C, top) and EPO-analog treatment (darbepoietin 10μg/kg i.p. 24h prior to transfusion) (D, top) decrease tRBC elimination rate. This reduction inversely correlates with pre-transfusion hemoglobin (B, bottom. Linear regression with 95%CI is shown), hypoxia extent (B, bottom) and with EPO-analog doses (D, bottom. p=0,055). n = a minimum of 7 mice/group. Data are presented as mean ± SEM. \*\*\*p<0,001

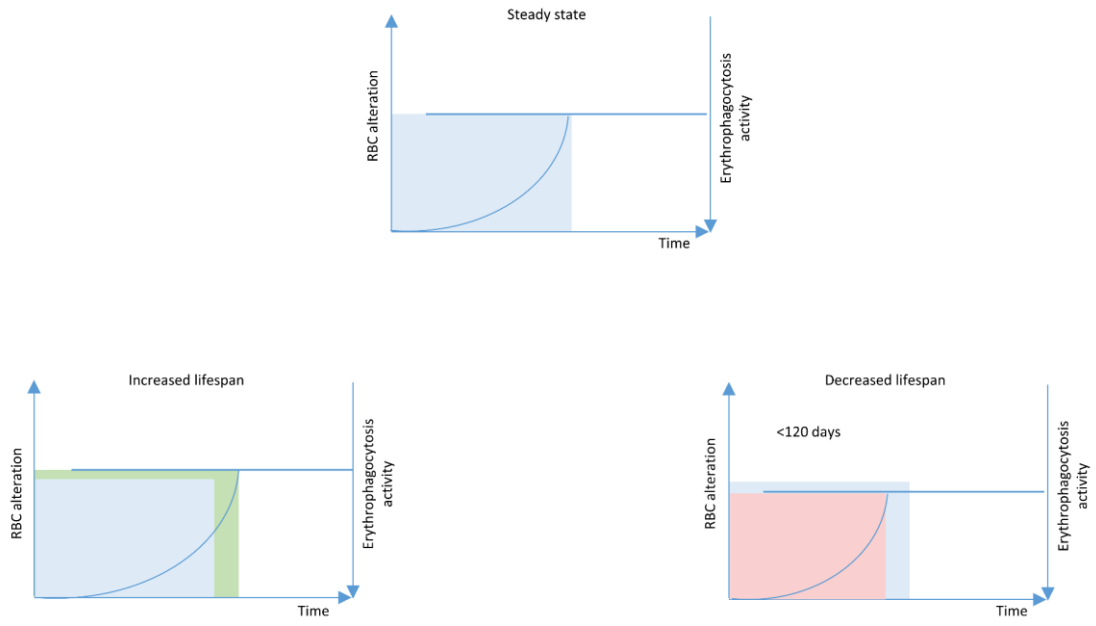


**Figure 3: Effect of EPO neutralization on long-stored transfused RBC elimination during anemia.** To study the impact of EPO deprivation during anemia on transfused RBC (tRBC) elimination rate, mice were treated with rabbit EPO-blocking serum. Plasma EPO concentration were measured (A) to calculate the total amount to neutralize according to schema in (B). Neutralization does not affect elimination of short-stored RB (C) but abolishes the effect of anemia and increases tRBC elimination in both anemic and non-anemic mice.  $n = 7$  mice/group ( $n=3$  for C). Data are presented as mean  $\pm$  SEM.  $**p<0,01$

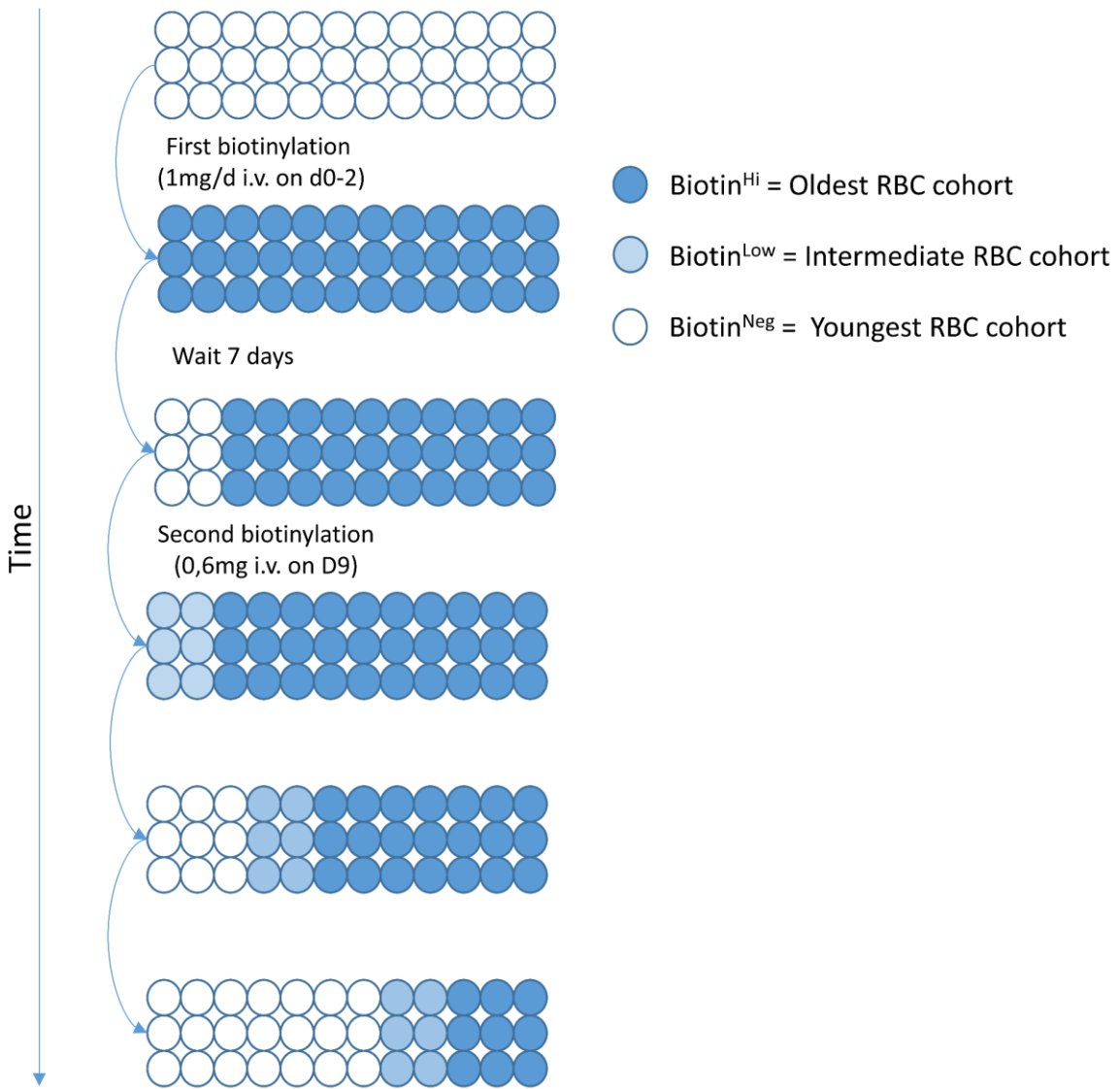


**Figure 4: Effect of spleen and erythropoietic activity on long-stored transfused RBC elimination.**

Splenectomy does reduce transfused RBC (tRBC) elimination to the same extent as anemia (A). In splenectomized mice, tRBC elimination is also sensitive to EPO-analog (darbepoietin 10 $\mu$ g/kg i.p. 24h prior to transfusion) and hypoxia (10%O<sub>2</sub> 24h prior to transfusion) but not to anemia (B). To assess the impact of erythropoietic stimulation on tRBC elimination, we suppressed erythropoiesis (doxorubicin 12,5mg/kg i.p. 2days prior induction of anemia) as assessed by reticulocytes count before transfusion (C, left). The impact of anemia on tRBC elimination is not related to erythropoietic activity (C, right). n = a minimum of 4 mice/group. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 ns = non significant



**Figure 5.** Proposed model for RBC elimination threshold and its regulation



**Supplementary figure 1** Representation of *in vivo* biotinylation protocol related to figure 1



## Annexe 2

Manuscrit en préparation pour soumission auxquels nous avons contribué par la participation à la réalisation des expériences de « Slice Blood » ainsi que le développement et la réalisation des expériences d'érythrophagocytose *in vitro*.



## Macrophage- and spleen-dependent clearance of storage-induced micro-erythrocytes in a murine model of transfusion

*Alexandre Morel<sup>1,2,\*</sup>, Michael Dussiot<sup>1,2,\*</sup>, Martin Colard<sup>1,2</sup>, Anaïs Martinez<sup>1,2</sup>, Camille Roussel<sup>1,2,3,4</sup>, Mickaël Marin<sup>2,3,4</sup>, Papa Alioune Ndour<sup>2,3,4</sup>, Caroline Le Van Kim<sup>2,3,4</sup>, Pierre Buffet<sup>2,3,4</sup>, Olivier Hermine<sup>1,2,5,\*</sup>, Pascal Amireault<sup>1,2,3,4,\*</sup>*

<sup>1</sup> Université de Paris, Laboratory of cellular and molecular mechanisms of hematological disorders and therapeutic implications, U1163, INSERM, F-75015, Paris, France

<sup>2</sup>Laboratoire d'Excellence GR-Ex, France

<sup>3</sup>Université de Paris, Biologie Intégrée du Globule Rouge, UMR\_S1134, BIGR, INSERM, F-75015, Paris, France

<sup>4</sup>Institut National de la Transfusion Sanguine, F-75015, Paris, France

<sup>5</sup>Service d'hématologie adulte, AP-HP, Hôpital Necker, F-75015, Paris, France

Correspondence

Pascal Amireault

Institut National de la Transfusion Sanguine

6 rue Alexandre Cabanel, 75015 Paris, France.

Tel : +33(1) 44 49 31 37

E-mail: [pamireault@ints.fr](mailto:pamireault@ints.fr)

### Keywords:

Transfusion, red blood cell morphology, storage lesion, red blood cell clearance

## Introduction

Transfusion of red blood cells (RBC) is a major therapeutic intervention facilitated by the hypothermic storage of RBC concentrates (RCC) for up to 6 weeks. However, during storage, RBC undergo multiple morphological, biochemical and molecular modifications that are collectively named storage lesion.<sup>1,2</sup> Storage lesion likely enhances the clearance of a significant proportion of the transfused RBC in the hours following transfusion. The proportion of cleared RBC increases indeed with storage duration, reducing transfusion efficacy.<sup>3-5</sup> The proportion of transfused RBC remaining in circulation after 24h, usually measured by 51-Chromium transfusion recovery studies, is thus a regulation criterion to validate new storage processes.<sup>6,7</sup> A better understanding of the storage lesion and identification of markers predictive of transfusion recovery would be a useful tool to evaluate both RBC storage and transfusion efficacy.

Of many storage-related RBC modifications, the progressive accumulation of morphologically altered cells, including spherocytes, is a strong candidate to predict the proportion of RBC that are cleared in the hours following transfusion. Indeed, the reduced surface/volume (S/V) ratio of spherocytic RBC is known to reduce the deformability and capacity to circulate of RBC in hereditary spherocytosis.<sup>8,9</sup> Also, the S/V ratio of chemically induced spherocytes was directly shown to correlate with their ability to circulate in an *ex vivo* model of human spleen perfusion.<sup>10</sup> In the transfusion setting, two transfusion recovery studies directly correlated either a RBC morphology index or a proportion of discocytes to transfusion recovery.<sup>11,12</sup> These correlations and *ex vivo* demonstration are useful, but direct evidence that morphologically altered RBC are indeed the target for early post-transfusion clearance is lacking.

Quantifying the clearance of morphologically altered RBC after transfusion requires discriminating transfused RBC from recipient RBC with simultaneous analysis of their morphology. Imaging flow cytometry combines the fluorescent discriminating and high-throughput capacity of flow cytometry with an imaging capacity appropriate to evaluate RBC morphology. This technology has recently been used to evaluate precisely the pre-transfusion morphology of stored human RBC and identified a subpopulation of storage-induced micro-erythrocytes (SME), that appears and expands during storage with wide variations between donors.<sup>13</sup>

Measurement of post-transfusion recovery and characterization of the recipient clearance mechanism in human studies is burdened by technical difficulty and ethical limitations. Murine models enable the study of a large number of individuals and the precise isolation of distinct variables within a homogeneous population through the induction of specific experimental conditions.

Previous studies in mice have shown that transfusion of stored RBC leads to an increase in hepatic and splenic iron suggesting that clearance is mediated preferentially by these two macrophage-rich tissues.<sup>14</sup> Also, transfusion of damaged RBC can induce the differentiation of

circulating erythrophagocytic inflammatory monocytes into Kupffer cells<sup>15</sup> or red pulp macrophages.<sup>16</sup>

At the anatomical level, the architecture of the mouse spleen, although showing differences from that of a human, is also constituted by an open circulation, discharging the arterial blood into the reticular meshwork of the red pulp.<sup>17,18</sup> This particular circulation forces RBC to pass through 1 to 3  $\mu\text{m}$ -wide holes in the wall of small vessels, which likely control the deformability of RBC. In addition, many macrophages line this circulation and participate in the surface control of RBC circulating in the spleen. These data are therefore compatible with similar splenic retention and elimination mechanisms between humans and mice.<sup>19</sup>

The main objective of this study was to determine the fate of morphologically altered RBC after transfusion in a murine model, using either normal control mice or subgroups with defective clearance mechanisms (splenectomy, macrophage depletion). The combination of this optimized murine model of transfusion and imaging flow cytometry identified major spleen and cell-related determinants of clearance of storage-altered RBC.

## **Methods**

### **Animal models**

C57BL/6 mice either intact, splenectomized and sham splenectomized were purchased from the Janvier Laboratory (Le Genest Saint Isle, France). For macrophage depletion, clodronate liposomes were purchased from Nico van Rooijen (Vrije University, Amsterdam, The Netherlands). Mice were intraperitoneally injected twice with 1mg and 0,5mg of clodronate liposomes 5 and 2 days before transfusion, respectively. A control group was injected similarly with PBS liposomes. All experiments were conducted using 8 to 10 week-old female mice (20-25g) in a pathogen free facility according to European Directives (2010/63/UE) and were approved by the local Ethics Committee of Paris Descartes University and the French Ministry of Education and Research (n°12071-2017012712012626 v5).

### **Blood banking and transfusion**

Mice were anesthetized with ketamine (100mg/kg) and xylazine (10mg/kg) and bled aseptically by cardiac puncture with a syringe containing 50µl of CPDA solution (Sigma Aldrich). One volume of CPDA was then further added to 9 volumes of blood. The collected whole blood was pooled and leukoreduced using a Leukocyte Reduction Filter (PALL Corporation). Blood was centrifuged at 600g for 15min and the hematocrit adjusted to 75% with the CPDA plasma. RBC were stored in tubes for up to 14 days in the dark at 4°C.

Before transfusion, stored RBC were stained with CFSE (20µM), washed twice and resuspended in RPMI. CFSE-positive (CFSE<sup>+</sup>) RBC suspensions (200µL) were transfused through the retro-orbital plexus and the proportion of CFSE<sup>+</sup>RBC circulating at 5min, 2h and 24h post-transfusion (PT) was measured among total RBC, by flow cytometry (Gallios, Beckman Coulter). RBC 24h recovery survival was calculated using the following formula: (% of CFSE<sup>+</sup> RBC in the sample at each time point/% of CFSE<sup>+</sup> RBC in the 5min sample)\*100.

### **Imaging Flow Cytometry (ImageStream)**

To analyze RBC morphology, blood samples recovered from transfused mice were diluted (1/100) in DPBS supplemented with glucose 1g/L and BSA 0,01% (pH 7.3) and incubated on a rotating mixer at 37°C during 50min. Samples were run on an Imagestream ISX mkII (Amnis Corp, Millipore, Seattle, USA) and a 60X magnification was used for all acquisitions. Channels

1 (brightfield), 2 (CFSE) and 6 (SSC) were selected. Data were acquired using the INSPIRE software (Amnis Corp) and analyzed using the IDEAS™ software (version 6.2 Amnis Corp). At least 20 000 events were captured for each sample in all experiments. To select front view RBC, we used the same gating strategy as previously described.<sup>13</sup> Transfused RBC were analyzed by gating on circular CFSE<sup>+</sup> events.

### **Retention in organs**

Mice were sacrificed 5, 30, 60, 120 or 240min after transfusion of CFSE<sup>+</sup> RBC. The spleen, liver and tibia/femur were harvested. The spleen and liver were sliced and dissociated in 1ml of PBS/2% FBS/EDTA 2mM while bone marrow cells were obtained by flushing the bones. After a 15min incubation at room temperature, the supernatants (containing the RBC) were collected, filtered (40µm) and stained (10<sup>6</sup> cells) with Draq5 (1:1000 dilution). A sample from venous blood was also harvested at each time point. Samples were analyzed by flow cytometry (Gallios, Beckman Coulter) and the enrichment factor was calculated using the following formula: (% of CFSE<sup>+</sup> RBC within the Draq5<sup>-</sup> cells of a given organ/% of CFSE<sup>+</sup> RBC in the blood sample)\*100. The rate of elimination of transfused RBC from the general circulation was calculated using the following formula: (% of CFSE<sup>+</sup> RBC in the 5min blood sample - % of CFSE<sup>+</sup> RBC in the blood sample at each time point/% of CFSE<sup>+</sup> RBC in the 5min blood sample)\*100.

### ***In vivo* erythrophagocytosis**

Mice were sacrificed 5, 30, 120 or 240 min after transfusion of CFSE<sup>+</sup> RBC. Spleen and liver cells were dissociated mechanically from the organs using dedicated dissociation kits and gentleMACS Octo dissociator (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer instructions. Bone marrow cells were obtained by flushing tibia and femur with PBS/2% FBS/EDTA 2mM. RBC were removed from the suspension using ACK lysing buffer (Invitrogen). Cells (1×10<sup>6</sup>) from mouse tissues were first incubated with anti-mouse CD16/CD32 clone 2.4G2 to block IgG receptors (BD Biosciences). Then, cells were stained at 4°C with a panel of antibodies against mouse F4/80 (eF450) (clone BM8, Ebioscience), CD11b (AF700) (cloneM1/70, BD Biosciences), CD11c (BV510) (clone N418, SONY), Ly-6G (PerCep) (clone 1A8, SONY), Ly-6C (PeCy7) (clone HK1.4, SONY), CD3ε (APC) (clone 145-2C11, SONY), CD19 (APC)

(clone 6D5, SONY) and NK1.1 (APC) (clone PK136, SONY). Isotype controls used were anti-rat IgG2aK (eF450) (clone eBR2a, BD Biosciences), anti-rat IgG2b (AF700) (clone eB149/10H5, Ebioscience), anti-armenian hamster IgG (BV510) (clone HTK 888, SONY), anti-rat IgG2a (PerCep) (clone RTK2758, SONY), anti-rat IgG2c (PeCy7) (clone RTK4174, SONY), anti-armenian hamster IgG (APC) (clone HTK 888, SONY), anti-rat IgG2a (APC) (clone RTK2758, SONY) and anti-mouse IgG2a (APC) (clone MOPC-173, SONY). Stained samples were analyzed by flow cytometry (Gallios, Beckman Coulter).

### **Statistical Analysis**

Statistical analyses were performed using the Prism software (version 5.0; GraphPad Software Inc.). A  $p$ -value  $<0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### **Post-transfusion recovery of long-stored RBC is determined in part by the recipient**

A mouse model of red blood cell (RBC) banking and transfusion was used to evaluate the effect of hypothermic storage on their capacity to circulate. RBC from donor C57Bl/6 mice were collected in CPDA, leukoreduced and stored at 4°C as previously reported.<sup>20</sup> After 1 (short-stored) or 14 days of storage (long-stored), RBC were stained with CFSE, transfused to a control C57Bl/6 recipient and blood samples were collected at 5min, 2h and 24h after transfusion. Long-stored RBC showed a lower 24h transfusion recovery ( $62\pm 2\%$ ) when compared to short-stored RBC ( $95\pm 1\%$ ) (Figure 1A). These results confirm that a subpopulation of the long-stored RBC is damaged during storage and eliminated from the circulation in the first 24h following transfusion.

We next evaluated the potential implication of the spleen and macrophages in the clearance of long-stored RBC by monitoring the 24h transfusion recovery in two additional recipient subgroups: splenectomized and clodronate-treated mice (Figure 1B). 24h transfusion recovery of long-stored RBC was improved both in clodronate-treated ( $79\pm 2\%$ ) and splenectomized recipients ( $74\pm 2\%$ ). Both PBS liposome-treated and sham splenectomized mice recipients showed 24h transfusion recovery similar to control recipients (Supplementary figure 1). These results confirm that both clodronate-sensitive cells and the spleen significantly contribute to the clearance of storage-damaged RBC following transfusion. These data also show that, in addition to storage duration, the absence/presence of spleen or macrophages in the recipient determines in part the proportion of RBC remaining in circulation after transfusion.

### **Imaging flow cytometry identifies a subpopulation of cells with altered morphology in long-stored mouse RBC**

We next investigated the morphological properties of mouse RBC after storage by adapting an imaging flow cytometry (IFC) technique previously used to evaluate human RBC during storage.<sup>13</sup> The distribution of the projected surface area of at least 20 000 fresh, short-stored or long-stored RBC was analyzed on normalized frequency plots. Projected surface area exhibited a Gaussian or nearly Gaussian distribution for short-stored RBC and this pattern was similar to those of fresh RBC collected just before analysis (Figure 2A). Distribution of long-stored RBC showed a shift to the left, indicating that some RBC have lost projected surface area (Figure 2B). Mean projected surface area was  $47,0\mu\text{m}^2$  and  $47,1\mu\text{m}^2$  for fresh and short-

stored RBC, respectively, while the mean projected surface area for long-stored RBC was significantly reduced to  $43,0\mu\text{m}^2$  (Figure 2C).

A morphologic analysis of IFC brightfield images was then conducted to categorize long-stored cells into altered RBC (echinocytes III, sphero-echinocytes, sphero-stomatocytes and spherocytes) or normal RBC (echinocytes II, echinocytes I, stomatocytes and discocytes). As shown in figure 3A, altered cells have a mean projected area of  $36,5\mu\text{m}^2$  and correspond to RBC with a lower projected area that accumulate during storage, while the normal cells profile is very similar to short-stored RBC with a mean projected area of  $45,4\mu\text{m}^2$ . In short-stored RBC, the same morphological analysis shows that most RBC fall into the normal category (Figure 3B). Quantification of altered cells showed that they represent 14,3% and 32,3% of short- and long-stored RBC, respectively (Figure 3C).

As for human RBC, the projected surface area parameter appears appropriate to evaluate the proportion of morphologically altered mouse RBC after storage. However, since the 2 subpopulations overlap on the projected surface area distribution profile, determination of a gating strategy necessitates a long morphological analysis of the brightfield images. To automatically quantify the proportion of morphologically altered RBC, we conducted a ROC analysis to select the most appropriate gating strategy. Figure 3D shows that a gating strategy at  $41\mu\text{m}^2$  allows identification of the altered cells with a specificity of 83,2% and a sensitivity of 85,1%. Using this gating strategy, the proportion of storage-induced micro-erythrocytes (SME) was of 13,5% and 36,1% in short- and long-stored RBC respectively (Figure 3E).

Taken together, these IFC data show that, as previously observed during human RBC storage, a subpopulation of SME with altered morphology and reduced projected surface area is present in long-stored mouse RBC and that a gating threshold set at  $41\mu\text{m}^2$  enables a robust automatic quantification.

### **Clodronate-sensitive normalization of the morphology of transfused long-stored RBC in the recipient's circulation**

We next used IFC to follow the post-transfusion fate of the long-stored RBC in the recipient's circulation after transfusion. The projected surface area of at least 2 000 long-stored mouse RBC was determined at different time points after transfusion using normalized frequency plots. Transfused RBC with reduced surface area can be detected in the circulation of the recipient 5min PT (Figure 4A, green line). At 2h PT (yellow line), an intermediate distribution



profile is observed while, at 24h PT (red line), the distribution profile of transfused RBC is very similar to that of control fresh RBC (in blue). Mean projected surface of transfused RBC shifted from  $43,9\mu\text{m}^2$  (5min), to  $45,7\mu\text{m}^2$  (2h) and  $48,4\mu\text{m}^2$  (24h) a value very similar to the  $47,0\mu\text{m}^2$  of fresh RBC (Figure 4D). In splenectomized recipients, a similar normalization of the transfused RBC projected surface was observed (Figure 4B), with a mean that shifted from  $44,1\mu\text{m}^2$  (5min), to  $45,7\mu\text{m}^2$  (2h) and  $48,0\mu\text{m}^2$  (24h). In clodronate-treated recipients, the distribution profiles of projected surface area of RBC in samples collected 5min and 2h after transfusion were very similar, indicating a delay in its normalization and suggesting a delay in the clearance of RBC with altered morphology (Figure 4C). At 24h after transfusion, the distribution profile of RBC transfused to clodronate-treated recipients was very similar to that of fresh RBC. Mean projected area of transfused RBC shifted from  $43,8\mu\text{m}^2$  (5min), to  $44,1\mu\text{m}^2$  (2h) then  $47,3\mu\text{m}^2$  (24h).

Automatic quantification of the SME by gating on RBC under  $41\mu\text{m}^2$  also illustrates this normalization of the morphology after transfusion with a significant decrease in the number of mouse SME that went from 30,5% (5min), to 20,1% (2h) and 9,3% at 24h (Figure 4E). In splenectomized recipients, a very similar kinetic of disappearance of SME was observed: 32,4% (5min), to 21,9% (2h) and 9,3% (24h). In clodronate-treated recipients, quantification of the mouse SME confirmed the delayed normalization of the morphology after transfusion with a similar number at 5min (32,4%), and 2h PT (28,6%) and a significant decrease to 12,4% at 24h PT. This effect is specific to clodronate-treated recipients since PBS liposome-treated recipients showed a normalization of the post-transfusion morphology similar to control recipients (Supplementary figure 2).

These data show that the projected surface area of long-stored RBC is normalized in the recipient's circulation after transfusion. The prolonged persistence of transfused SME observed in clodronate-treated recipients suggest that macrophages are key cells involved in the early clearance of morphologically altered RBC. In absence of macrophages, an alternative mechanism can clear the altered RBC from the circulation, but with a delayed kinetics.

### **Early post-transfusion erythrophagocytosis is mediated principally by macrophages in control recipients and by monocytes in clodronate-treated recipients**

We next sought to assess whether macrophages operate or not the clearance of long-stored RBC and to identify the potential implication of other cell types in this process by evaluating

the proportion of erythrophagocytic CFSE<sup>+</sup> cells in the spleen, liver and bone marrow of transfused mice. Macrophages (Lin<sup>-</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>/F4/80<sup>hi</sup>/CD11b<sup>lo</sup>), monocytes (Lin<sup>-</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>/F4/80<sup>-</sup>/CD11b<sup>lo</sup>/Ly-6C<sup>-</sup>), inflammatory monocytes (Lin<sup>-</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>/F4/80<sup>-</sup>/CD11b<sup>lo</sup>/Ly-6C<sup>+</sup>) and granulocytes (Lin<sup>-</sup>/Ly-6G<sup>+</sup>) were analyzed. In the spleen of control recipients, the proportion of CFSE<sup>+</sup> red pulp macrophages was low at 5min PT, but increased to 39,3% (30min) and remained stable up to 4h (Figure 6A). Erythrophagocytic monocytes, inflammatory monocytes and granulocytes are also detected from 30min to 4h following transfusion but the proportion of CFSE<sup>+</sup> cells in each population remained under 10% during this period. In the liver, CFSE<sup>+</sup> monocytes, inflammatory monocytes and granulocytes are detected as early as 5min PT and for the whole 4h period studied (Figure 5B). 5min PT, 53,2% of Kupffer cells are CFSE<sup>+</sup>, reaching a maximum at 30min (61,1%) and then slowly declining to reach 31,2% at 4h PT.

In the liver of splenectomized recipients, an early increased erythrophagocytosis was detected in Kupffer cells, inflammatory monocytes and granulocytes, but the overall kinetics of erythrophagocytosis was similar to control recipients (Figure 5C).

In the spleen of clodronate-treated recipients, increased erythrophagocytosis was observed both in monocytes and inflammatory monocytes showing that, in absence of red pulp macrophages, erythrophagocytosis of long-stored RBC is compensated in part by these two cell populations (Figure 5D). Similarly, in the liver of clodronate-treated recipients, monocytes, inflammatory monocytes and granulocytes all show increased erythrophagocytosis during the first 2h following transfusion (Figure 5E). In the bone marrow, the proportion of CFSE<sup>+</sup> cells remained low during this period (Supplementary figure 3).

In parallel, analysis of the proportion of macrophages, inflammatory monocytes, monocytes and granulocytes in the spleen and liver of the 3 different recipient subgroups revealed a complex pattern (Supplementary figure 4). For example, the proportion of red pulp macrophages and Kupffer cells decreased after transfusion (Supplementary figure 4A, 4B and 4C): a result compatible with the ferroptosis of erythrophagocytic macrophages previously observed by Youssef et al.<sup>16</sup> Also, the proportion of inflammatory monocytes increased at 4h PT in all conditions: confirming that transfusion of damaged RBC can lead to migration of these cells in the spleen and liver in the hours following transfusion.<sup>15,16</sup>

Taken together these data confirm that macrophages are the main erythrophagocytic cells after transfusion of long-stored RBC. Comparison of data from control and splenectomized recipients show that, in absence of spleen, the liver does not compensate by increasing

noticeably its erythrophagocytosis. In addition, we confirmed that transfusion of long-stored RBC can lead to the disappearance of erythrophagocytic macrophages and the migration of inflammatory monocytes to replace them.

### **Post-transfusion clearance of long-stored RBC and storage-induced micro-erythrocytes are similar**

To evaluate if the decrease in transfusion recovery can be explained by the SME clearance after transfusion, we next compared the kinetics of elimination of the long-stored RBC with the disappearance of SME from the circulation in the 3 recipient subgroups.

In control recipients, the kinetics of elimination/disappearance was very similar between the whole transfused RBC population and the SME subpopulation (Figure 6A). However, the proportion of transfused SME disappearing from the circulation after 24h (21,2%) is lower than the proportion of transfused RBC eliminated (38,1%) showing that some other long-stored RBC are eliminated. In splenectomized recipients, the proportion of disappearing SME (23,2%) is very close to the proportion of eliminated RBC (26,3%, Figure 6B). In clodronate-treated recipients, the proportion of SME disappearing from circulation (19,9%) is lower than in the other 2 subgroups, and is very similar to the proportion of eliminated RBC (20,7%, Figure 6C).

### **Clodronate-sensitive retention of long-stored RBC in the spleen**

To better understand the mechanism of RBC elimination, we evaluated the possibility that transfused RBC are concentrated in the spleen, liver and bone marrow after transfusion. To do so, we calculated an enrichment factor (EF) by dividing the proportion of transfused RBC present in blood obtained either from sliced spleen, liver or bone marrow by the proportion of transfused RBC present in the circulation.

Transfusion of long-stored RBC leads to a rapid increase of the spleen EF that is already present at 5min PT (EF = 2,5), that steadily increases to reach a maximum at 120min (EF = 3,6) and that then remains stable up to 240min (EF = 3,5), showing a long-lasting enrichment of transfused RBC in the spleen (Figure 7A). In the liver, EF was slightly increased only at 5min PT (EF = 1,2) while, in the bone marrow, it was increased after 30min (EF = 1,4) and 60 min (EF = 1,3), and came back to normal by 120min. Interestingly, in the bone marrow of splenectomized recipients, enrichment was increased at 120 (EF = 1,6) and 240min (EF = 1,3) when compared

to control recipients, suggesting that this organ may retain some of the storage-damaged RBC left in circulation when the spleen is absent (Figure 7B). Enrichment was very low in the liver of splenectomized recipients and thus similar to control. A lower level of enrichment was observed in the spleen of clodronate-treated recipients since the EF remained under 1,3 during the first 60min following transfusion. 120min PT, an increase in EF was observed (EF = 1,7) that persisted and increased to reach a maximum of 2,1 at 240min (Figure 7C). No enrichment was observed in the liver and bone marrow of clodronate-treated recipients.

An evaluation of the proportion of transfused long-stored RBC eliminated from the circulation was conducted in parallel in the same mice to illustrate the correlation between organ enrichment and disappearance from the circulation. In control recipient mice, the elimination of transfused RBC from the circulation is almost linear over the 4h period studied and is coherent with the observed sustained enrichment in the spleen (compare panel 7A and 7D). In splenectomized recipients, the elimination kinetics is decreased, mirrors well the low retention kinetics observed in the liver and bone marrow and thus suggest that splenic retention is associated with elimination (compare panel 7B and 7E). In clodronate-treated recipients, decreased and delayed RBC elimination kinetics is also similar to the enrichment kinetics observed in the spleen (Compare panel 7C and 7F).

These results indicate that post-transfusion retention of long-stored RBC occurs mainly in the spleen and is clodronate-sensitive. The similar pattern between enrichment in the potential erythrophagocytic organs and the kinetics of disappearance from circulation suggest that retention favors elimination. Also, the delayed and lower EF increase observed in the spleen of clodronate-treated recipients suggests that macrophages are involved in retention.

## Discussion

In this report we show that, similarly to human RBC, a subpopulation of morphologically altered mouse RBC with reduced projected surface area, the SME subpopulation, accumulates during hypothermic storage and can be robustly identified and quantified using IFC. These SME disappear from the circulation in the hours following transfusion and the process is in part macrophage-dependent since clodronate treatment of recipients is associated with a delayed clearance of these altered RBC. After transfusion, long-stored RBC are concentrated in the spleen and eliminated principally by macrophages both in the liver and spleen. Transfusion recovery is increased in splenectomized recipients, underlining the importance of this organ in RBC elimination. As expected, macrophage-depleted recipients also show an increased transfusion recovery, underlining the importance of this cell type in RBC elimination. Transfusion recovery decreases with storage duration and may depend on donor characteristics. The increased transfusion recovery of long-stored RBC observed in splenectomized and clodronate-treated recipients shows that transfusion efficacy may also depend on recipient-related characteristics, such as the integrity of an organ or a cell population. It also suggests that some long-stored RBC, cleared following transfusion in normal recipients, are left in circulation in splenectomized or macrophage-depleted recipients. Our erythrophagocytosis experiments point to red pulp macrophages of the spleen and Kupffer cells of the liver as important erythrophagocytic operators after transfusion. Organ retention experiments also reveal an interesting difference between spleen and liver removal of storage-damaged RBC since the spleen concentrates transfused RBC while the liver does not, probably through its unique anatomy designed to filter altered RBC. Indeed, the large open flow of the reticular meshwork present in the red pulp slows the progression of the RBC.<sup>18</sup> The altered biophysical, adhesive and/or pro-phagocytic properties of long-stored RBC likely contribute to this retention process, maximizing the interaction time between RBC and macrophages.

The main advantage of the current mouse model is that it allows to evaluate the post-transfusion fate of fluorescently stained RBC and to show that transfused RBC morphology is normalized in the hours following transfusion. This normalization confirms and extends a previous report showing that murine RBC, made spherical by incubation in frozen/thawed plasma several times, have a diminished post-transfusion survival.<sup>21</sup>

In addition, the delay we observed in this normalization process in clodronate-treated recipients indicates that it is macrophage-mediated. Disappearance of a morphologically altered subpopulation of RBC from the circulation can result either from genuine clearance, or from their intravascular destruction, or from the intravascular restoration of a normal morphology. Some morphological alterations of RBC are known to be reversible upon incubation in fresh plasma. However, the long persistence of SME in the clodronate-treated recipients is a very strong indication that the spherocytic alterations of SME are not reversible and that most SME are no longer detected because they are cleared from the circulation. Intravascular destruction would also result in their disappearance from the circulation of clodronate-treated recipients. The similarity, 24h after transfusion, between the proportions of SME that are no longer observed in circulation (19,9%) and of eliminated RBC (20,7%) suggests that the majority of removed RBC are SME in this clodronate-treated recipient model. Similarly, in splenectomized recipients, the kinetics of transfused RBC and disappearance of SME is very similar although the proportion of eliminated RBC is slightly superior to the proportion of SME (26,3 vs 23,2%). In control recipients, some removed RBC are clearly not SME since the proportion of disappearing SME (21,2%) is approximately half the proportion of removed RBC (38,2%). This excess of long-stored RBC eliminated in control recipients could be due to the favorable pro-erythrophagocytic conditions induced by the concentration of transfused RBC in the spleen. This last mechanism, the bystander effect, has been suggested in other situations such as malaria infection.<sup>22</sup>

Results showing that macrophages of the spleen and liver are the main erythrophagocytic cells is in agreement with previous reports<sup>14,23</sup> and with the fact that long-stored RBC were shown to be more susceptible to erythrophagocytosis by macrophages *in vitro*.<sup>24</sup>

The clodronate-treated recipient model also confirms that, after transfusion of long-stored RBC, the proportion of erythrophagocytic inflammatory monocytes increases in the spleen and these contribute to the elimination of transfused RBC.<sup>16</sup> The observed increase of hepatic inflammatory monocytes is also similar to what has already been observed after transfusion of heat-treated RBC.<sup>15</sup> Migration and possible differentiation of these patrolling monocytes – that resist the effect of clodronate - is probably responsible for the delayed clearance of SME in clodronate-treated recipients, underlining the importance of eliminating these morphologically altered RBC. This result also suggests that transfusion of a quantity of long-

stored RBC that overwhelms the capacity of the steady-state RBC mononuclear phagocyte system induces an immunomodulatory reaction in the recipient.

Limitations of this study include the fact that, we did not definitely determine which alteration of SME induces their elimination. Previous studies had suggested that the decreased S/V ratio of human SME, identified and quantified by IFC, would lead to their retention and elimination by the spleen-specific sensing of their altered deformability, even in the absence of detectable surface alterations.<sup>13,25</sup> Although this mechanism may contribute to the clearance of SME, the similar kinetics between control and splenectomized mouse recipients suggests instead that this subpopulation can also be recognized by the mononuclear phagocyte system. One possible mechanism could be that, morphologically altered RBC such as the SME also over-express pro-phagocytic surface markers such as PS or clustered band 3 or under-express “don’t eat” signals such as CD47. Also, our data on the post-transfusion clearance of SME using a mouse model of transfusion have yet to be observed in humans and should be directly evaluated since important inter-species differences are expected and known to exist.<sup>26,27</sup> Still, the hypotheses formulated using mouse models could orient future explorations in humans. For example, our data support the hypothesis of a recipient effect on transfusion recovery, but remains poorly explored in humans since standard transfusion recovery methods were developed to evaluate storage process and donor characteristics, and do not recapitulate all the conditions of a normal autologous RBC transfusion.<sup>28</sup> The immunomodulatory effect of transfusion could also be investigated and could have both positive or negative effect depending on the context.<sup>29</sup>

We have demonstrated that a subpopulation of morphologically altered RBC, the SME, disappears from the circulation after transfusion. The premature clearance of this subpopulation underlines the pertinence of this marker to evaluate storage. Validation of such a simple predictive quality marker of RBC concentrates in humans may enable the selection of optimal RBCs for transfusion of fragile or chronically transfused patients.

## **Acknowledgments**

MC and CR were supported by a Labex GR-Ex Fellowship. The labex GR-Ex, Reference No. ANR-11-LABX-0051 is funded by the program “Investissements d’Avenir” of the French National Research Agency, Reference No. ANR-11-IDEX-0005-02.

## **Author’s contribution**

AIM, MD, PAN, PB, OH and PA designed the research

AIM, MD, MC, AnM, CR, MM and PA performed experiments

AIM, MD, MC, AnM, CR, MM, PAN, CLVK, PB, OH and PA analyzed the data

AIM, MD, PB, OH and PA wrote the paper.

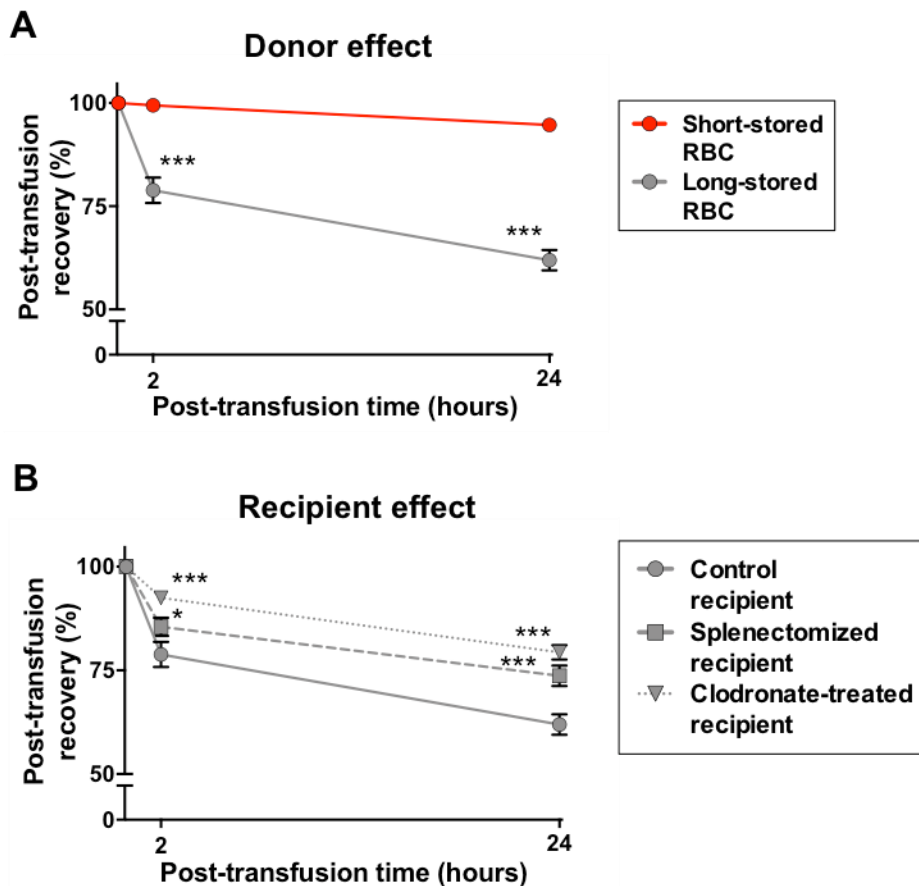


## References

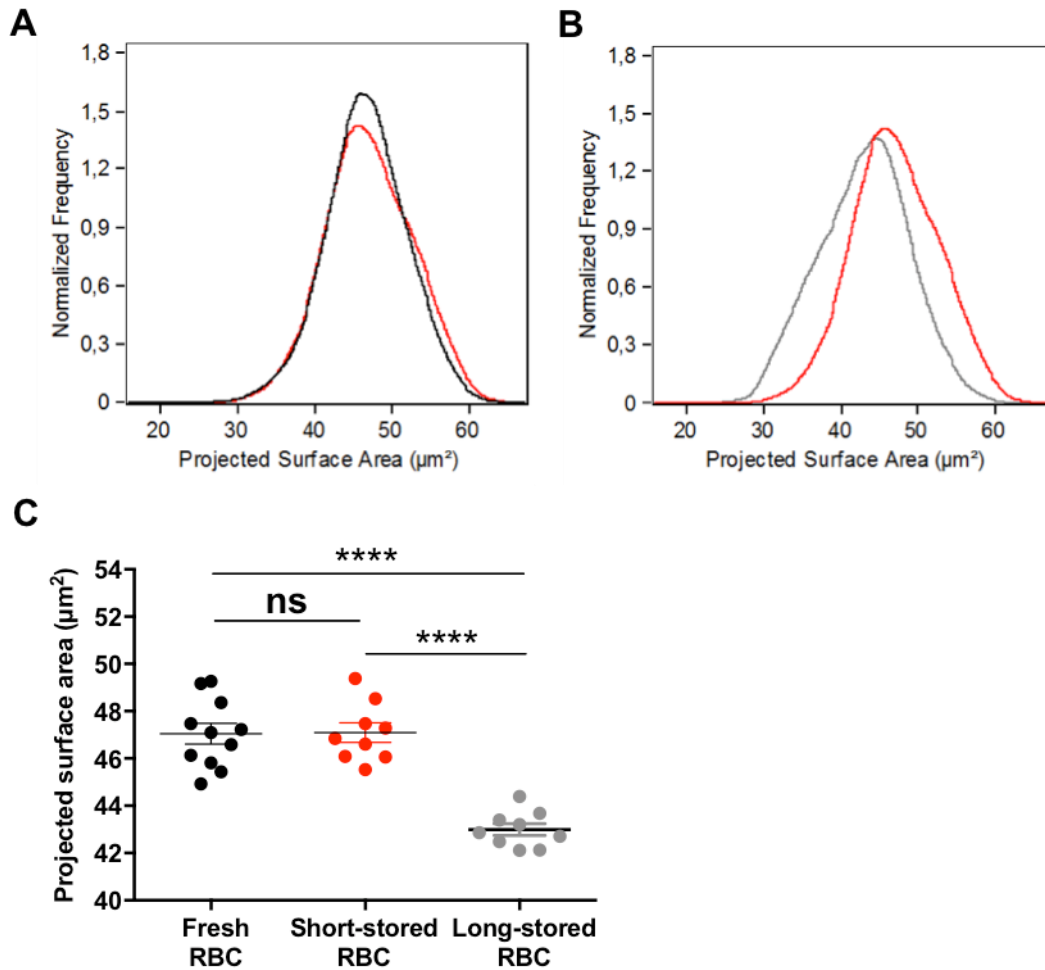
1. D'Alessandro A, Kriebardis AG, Rinalducci S, et al. An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies. *Transfusion* 2015;55(1):205–219.
2. Prudent M, Tissot J-D, Lion N. In vitro assays and clinical trials in red blood cell aging: Lost in translation. *Transfus Apher Sci* 2015;52(3):270–276.
3. Shields CE. Effect of adenine on stored erythrocytes evaluated by autologous and homologous transfusions. *Transfusion* 1969;9(3):115–119.
4. Luten M, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Schaap NPM, de Grip WJ, Bos HJ, Bosman GJCGM. Survival of red blood cells after transfusion: a comparison between red cells concentrates of different storage periods. *Transfusion* 2008;48(7):1478–1485.
5. Rapido F, Brittenham GM, Bandyopadhyay S, et al. Prolonged red cell storage before transfusion increases extravascular hemolysis. *J Clin Invest* 2017;127(1):375–382.
6. Dumont LJ, AuBuchon JP. Evaluation of proposed FDA criteria for the evaluation of radiolabeled red cell recovery trials. *Transfusion* 2008;48(6):1053–1060.
7. Hess JR, Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative. Scientific problems in the regulation of red blood cell products. *Transfusion* 2012;52(8):1827–1835.
8. Griggs RC, Weisman R, Harris JW. Alterations in osmotic and mechanical fragility related to in vivo erythrocyte aging and splenic sequestration in hereditary spherocytosis. *J Clin Invest* 1960;39:89–101.
9. Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. *Lancet* 2008;372(9647):1411–1426.
10. Safeukui I, Buffet PA, Deplaine G, et al. Quantitative assessment of sensing and sequestration of spherocytic erythrocytes by the human spleen. *Blood* 2012;120(2):424–430.
11. Högman CF, de Verdier CH, Ericson A, Hedlund K, Sandhagen B. Studies on the mechanism of human red cell loss of viability during storage at +4 degrees C in vitro. I. Cell shape and total adenylate concentration as determinant factors for posttransfusion survival. *Vox Sang* 1985;48(5):257–268.
12. Haradin AR, Weed RI, Reed CF. Changes in physical properties of stored erythrocytes relationship to survival in vivo. *Transfusion* 1969;9(5):229–237.
13. Roussel C, Dussiot M, Marin M, et al. Spherocytic shift of red blood cells during storage provides a quantitative whole cell-based marker of the storage lesion. *Transfusion* 2017;57(4):1007–1018.
14. Hod EA, Zhang N, Sokol SA, et al. Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation. *Blood* 2010;115(21):4284–4292.

15. Theurl I, Hilgendorf I, Nairz M, et al. On-demand erythrocyte disposal and iron recycling requires transient macrophages in the liver. *Nat Med* 2016;22(8):945–951.
16. Youssef LA, Rebbaa A, Pampou S, et al. Increased erythrophagocytosis induces ferroptosis in red pulp macrophages in a mouse model of transfusion. *Blood* 2018;131(23):2581–2593.
17. Hataba Y, Kirino Y, Suzuki T. Scanning electron microscopic study of the red pulp of mouse spleen. *J Electron Microsc (Tokyo)* 1981;30(1):46–56.
18. MacDonald IC, Schmidt EE, Groom AC. The high splenic hematocrit: a rheological consequence of red cell flow through the reticular meshwork. *Microvasc Res* 1991;42(1):60–76.
19. Waugh RE, Narla M, Jackson CW, Mueller TJ, Suzuki T, Dale GL. Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age. *Blood* 1992;79(5):1351–1358.
20. Fischer D, Büsow J, Meybohm P, Zacharowski K, Jennewein C. Novel method to leukoreduce murine blood for transfusion: how to reduce animal usage. *Transfusion* 2016;56(1):146–152.
21. Waugh RE, Sarelius IH. Effects of lost surface area on red blood cells and red blood cell survival in mice. *Am J Physiol* 1996;271(6 Pt 1):C1847-1852.
22. Douglas NM, Anstey NM, Buffet PA, et al. The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J* 2012;11:135.
23. Hudson KE, de Wolski K, Kapp LM, Richards AL, Schniederjan MJ, Zimring JC. Antibodies to Senescent Antigen and C3 Are Not Required for Normal Red Blood Cell Lifespan in a Murine Model. *Front Immunol* 2017;8:1425.
24. Wojczyk BS, Kim N, Bandyopadhyay S, et al. Macrophages clear refrigerator storage-damaged red blood cells and subsequently secrete cytokines in vivo, but not in vitro, in a murine model. *Transfusion* 2014;54(12):3186–3197.
25. Roussel C, Monnier S, Dussiot M, et al. Fluorescence Exclusion: A Simple Method to Assess Projected Surface, Volume and Morphology of Red Blood Cells Stored in Blood Bank. *Front Med (Lausanne)* 2018;5:164.
26. Hod EA, Arinsburg SA, Francis RO, Hendrickson JE, Zimring JC, Spitalnik SL. Use of mouse models to study the mechanisms and consequences of RBC clearance. *Vox Sang* 2010;99(2):99–111.
27. Zimring JC, Spitalnik SL. On the appropriate use and interpretation of animal models in transfusion medicine research. *Transfusion* 2013;53(10):2334–2339.
28. Roussel C, Buffet PA, Amireault P. Measuring Post-transfusion Recovery and Survival of Red Blood Cells: Strengths and Weaknesses of Chromium-51 Labeling and Alternative Methods. *Front Med (Lausanne)* 2018;5:130.

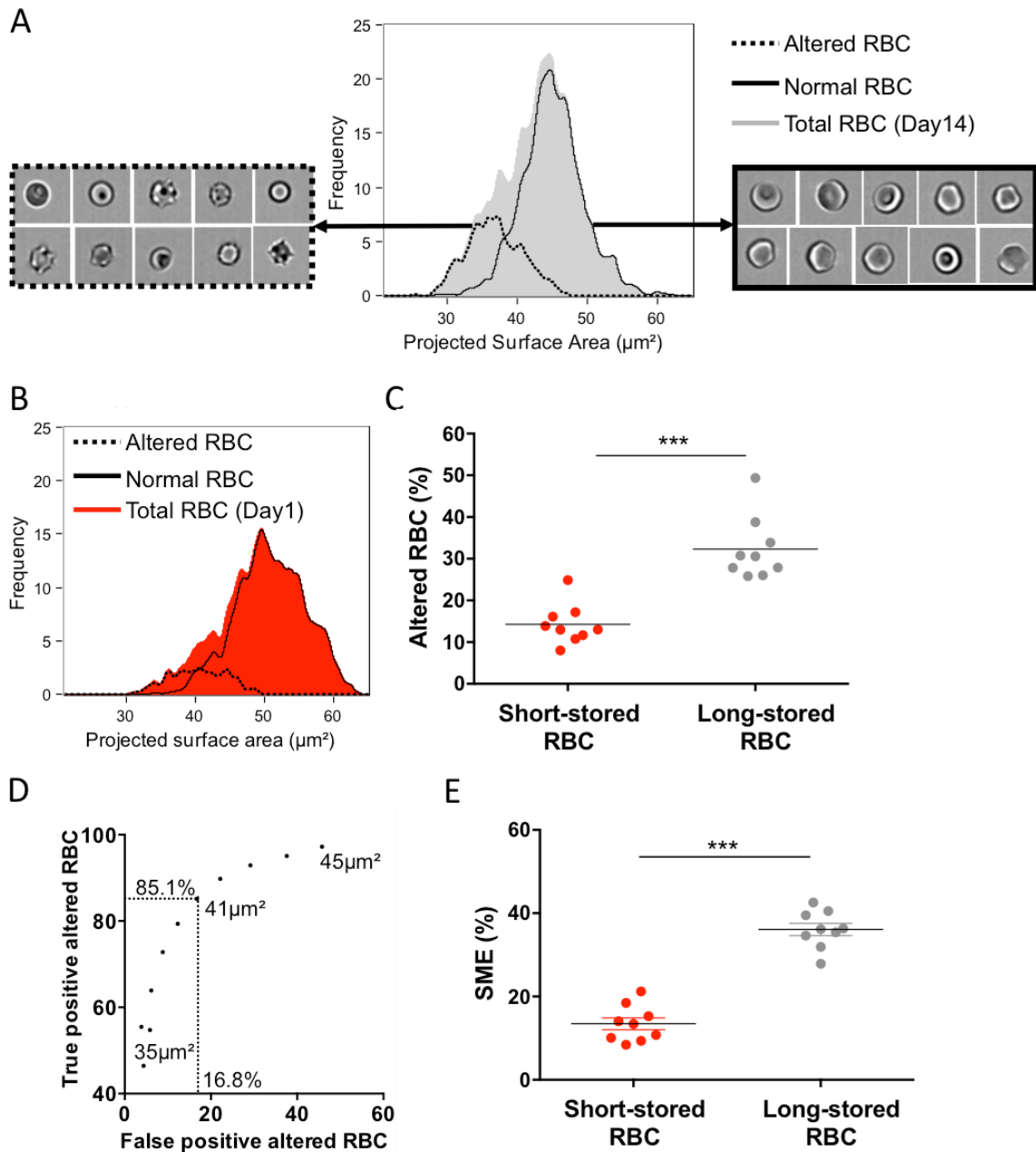
29. Youssef LA, Spitalnik SL. Transfusion-related immunomodulation: a reappraisal. *Curr Opin Hematol* 2017;24(6):551–557.



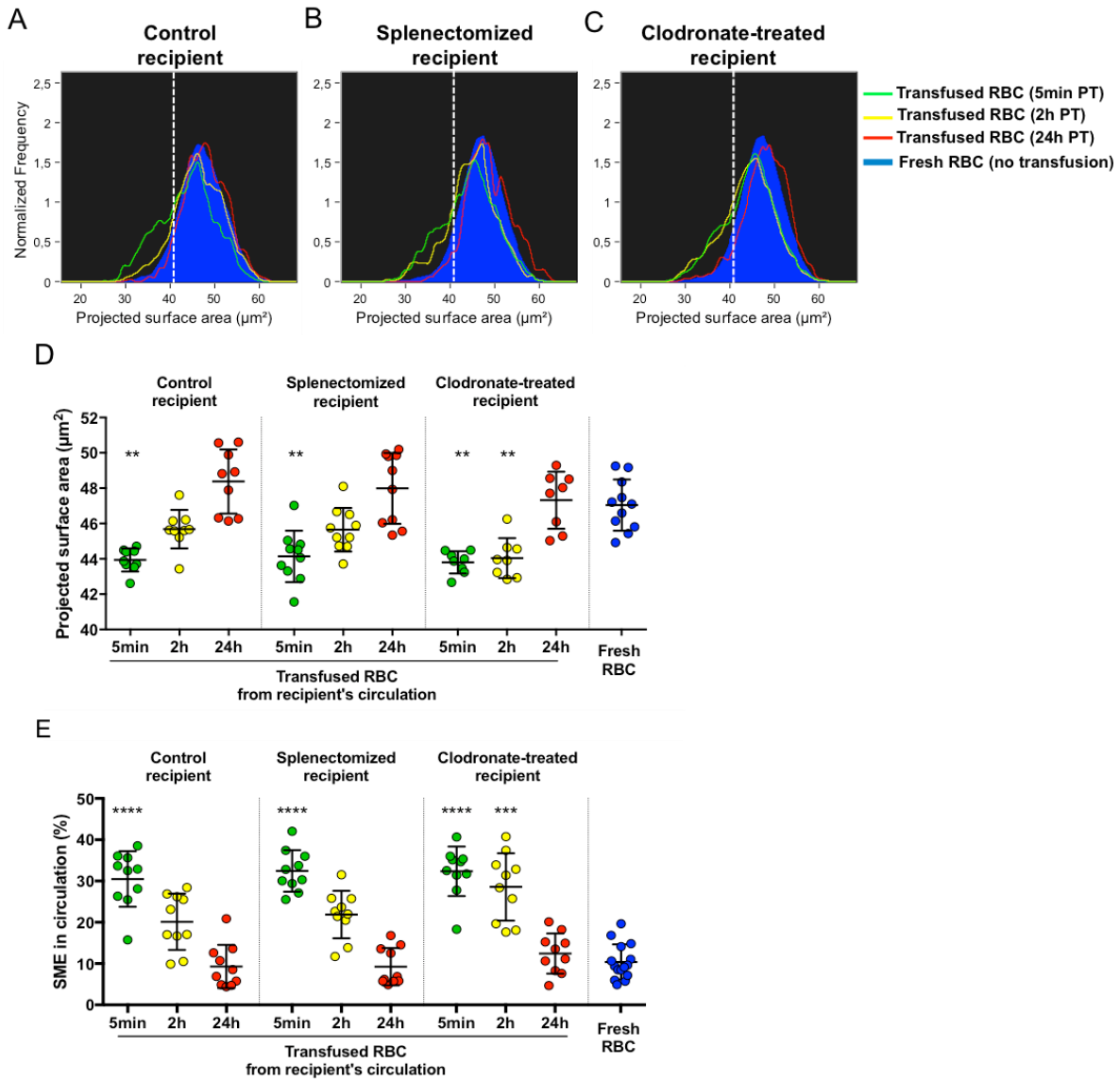
**Figure 1: Evaluation of the 24h transfusion recovery of stored RBC in different recipient mouse models.** (A) To evaluate the impact of storage on the capacity of RBC to circulate after transfusion, RBC stored for 1 day (short-stored, in red) or 14 days (long-stored, in grey) were transfused to a normal recipient mouse. (B) To evaluate the impact of the recipient's functional state on the capacity of RBC to circulate after transfusion, RBC stored for 14 days were transfused either to control (circles, full line), splenectomized (squares, dashed line) or clodronate-treated (triangles, dotted line) mouse recipients. 200µl of CFSE-labeled RBC were transfused and their proportion in circulation was evaluated at 5min, 2h and 24 h after transfusion. n = a minimum of 7 mice/group. Data are presented as mean ± SEM. In A, a Bonferroni's test was used to compare, at each time point, the recovery of short-stored vs long-stored RBC. In B, a Dunnett's test was used to compare, at each time point, the recovery of splenectomized or clodronate-treated recipients vs control recipients. \*p<0,05; \*\*\*p<0,001



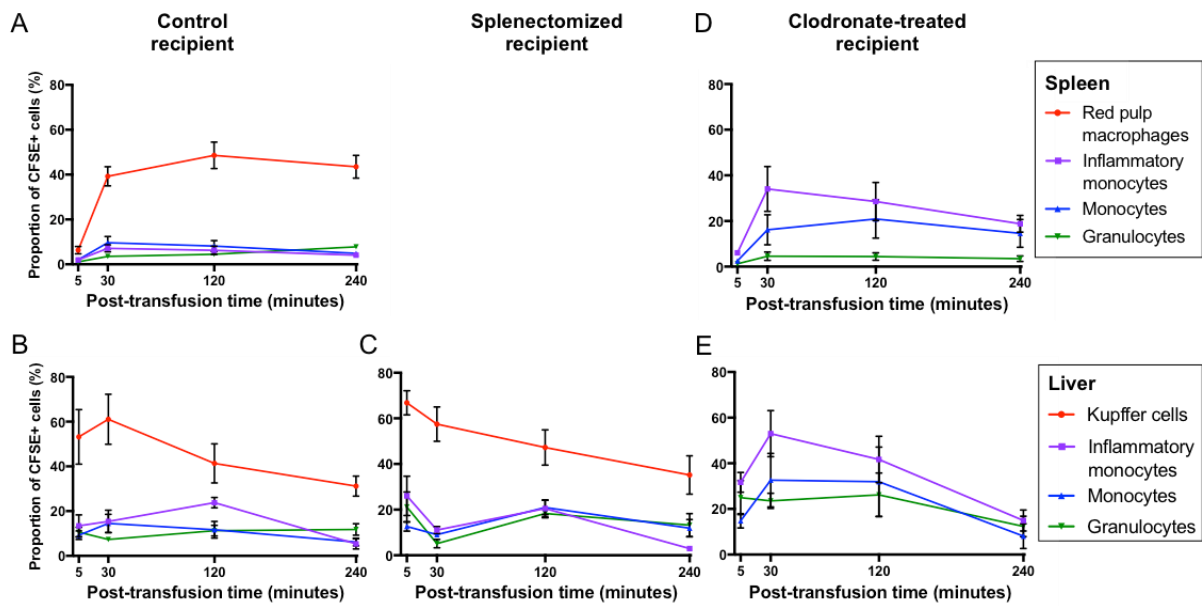
**Figure 2: Evaluation of the projected surface area of long-stored mouse RBC by imaging flow cytometry.** (A) Projected surface area on normalized frequency plots for fresh RBC (black line) and short-stored (1 day, red line) show similar distribution. In (B), long-stored RBC (14 days, grey line) have a reduced projected surface area when compared to short-stored RBC (red line). (C) Quantification of projected surface area for front views of focused RBC shows a significant decrease in long-stored RBC.  $n =$  a minimum of 9 samples/group. In C, data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*\*\*\* $P < 0,0001$  by Tukey's multiple comparison test.



**Figure 3: Identification and quantification of a subpopulation of morphologically-altered RBC with reduced projected surface area in long-stored RBC.** Analysis of brightfield images of (A) long-stored RBC and (B) short-stored RBC, obtained by imaging flow cytometry, show that morphologically-altered cells (dotted black line) have a reduced projected surface area when compared to RBC of normal morphology (black line). Morphologically-altered cells were defined as echinocytes III, spherocytocytes, spherostomatocytes and spherocytes while normal cells comprise discocytes, echinocytes I and echinocytes II. (C) Quantification of morphologically-altered cells in short-stored and long-stored RBC show that they accumulate during storage. (D) ROC curve for the automatic detection of morphologically-altered cells using the projected surface area parameter identifies  $41\mu\text{m}^2$  as an appropriate gating strategy. (E) Quantification of storage-induced micro-erythrocytes (SME) in short-stored and long-stored RBC show that they accumulate during storage.  $n =$  a minimum of 9 samples/group. In C and E, data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*\*\* $P < 0,001$  by student T test.

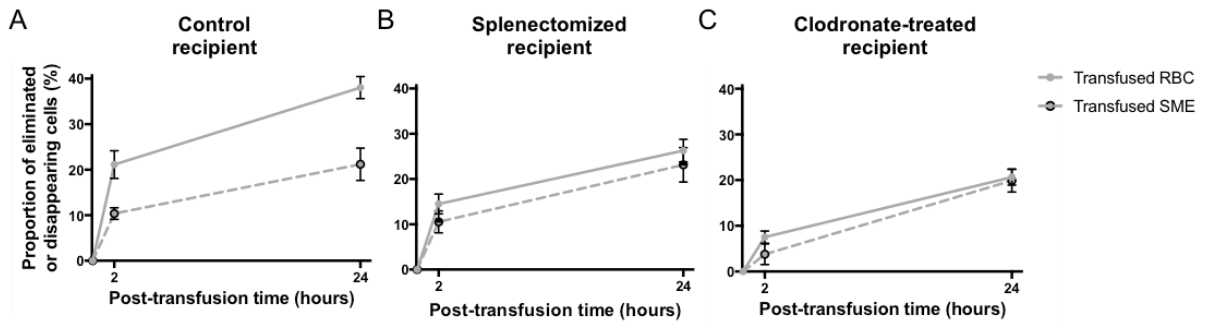


**Figure 4: Characterization of the transfused RBC morphology in the circulation of different recipient mouse models.** (A) Control, (B) splenectomized or (C) clodronate-treated recipient mice were transfused with 200 $\mu\text{l}$  of CFSE-labeled long-stored RBC. Projected surface area on normalized frequency plots of transfused RBC at 5 min (green line), 2h (yellow line) and 24h (red line) after transfusion or control RBC from an untransfused mouse (blue) are shown. Dashed white vertical lines define gating of the storage-induced micro-erythrocytes (SME) subpopulation. (D) Mean projected area of the transfused RBC present in the recipient circulation show that RBC projected surface area is normalized in the hours following transfusion. (E) Quantification of SME present in the recipient circulation show that RBC morphology is normalized in the hours following transfusion.  $n =$  a minimum of 9 mice/group. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. In D and E, \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$  when compared to the “Fresh RBC” condition by a Kruskal-Wallis test.

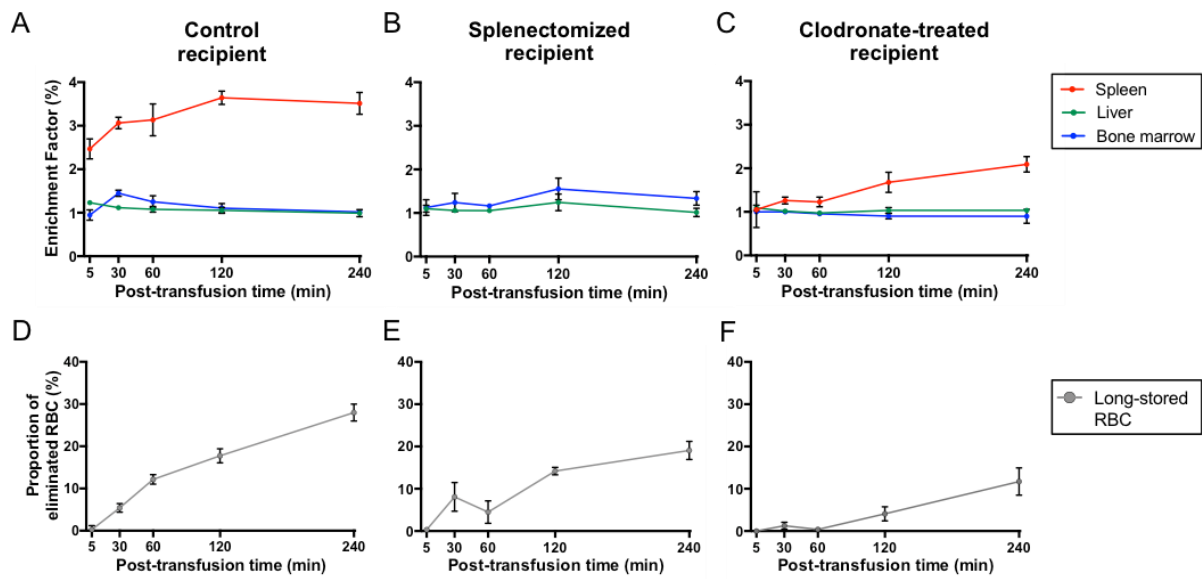


**Figure 5: Evaluation of the post-transfusion erythrophagocytosis of long-stored mouse RBC in the spleen and liver of different recipient mouse models.** RBC stored for 14 days were transfused either to control (left panels), splenectomized (middle panel) or clodronate-treated (right panels) mouse recipients. Erythrophagocytosis of long-stored RBC was evaluated at 5, 30, 120 and 240min after transfusion by quantifying the proportion of CFSE<sup>+</sup> macrophages (red lines), monocytes (blue lines), inflammatory monocytes (purple lines) and granulocytes (green lines) in the (A) spleen and (B) liver of control, (C) splenectomized or (D, E) clodronate-treated mouse recipients. n = a minimum of 3 mice/time point. Data are presented as mean  $\pm$  SEM.



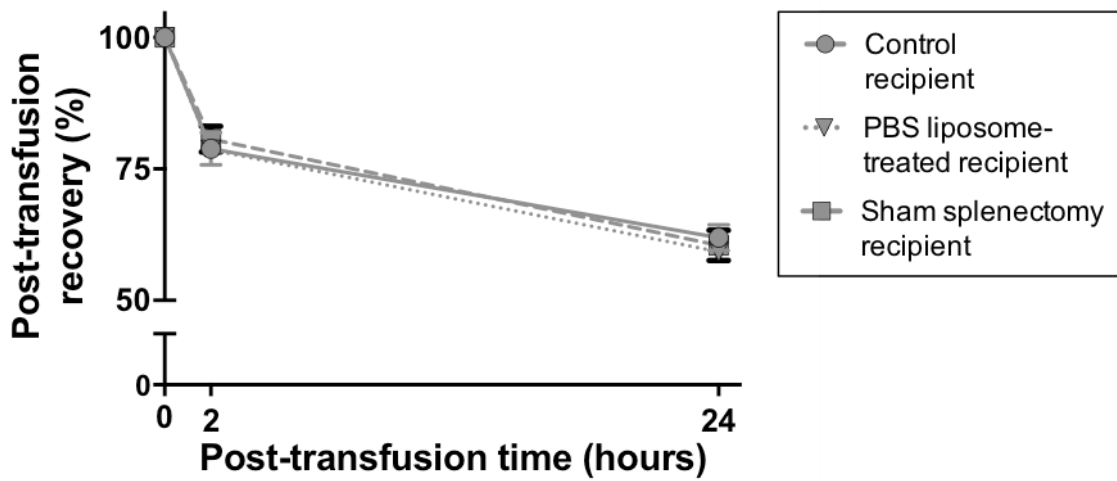


**Figure 6: Comparison of the post-transfusion kinetics of long-stored RBC and storage-induced micro-erythrocytes in different recipient mouse models.** RBC stored for 14 days were transfused either to (A) control, (B) splenectomized or (C) clodronate-treated recipient mice. 200 $\mu$ l of CFSE-labeled RBC were transfused and the proportion of eliminated transfused RBC was evaluated at 5min, 2h and 24h after transfusion by flow cytometry (full line). In parallel, the proportion of storage-induced micro-erythrocytes (SME) disappearing from the circulation was evaluated by imaging flow cytometry, in the same recipients, to illustrate the similarity between the kinetics (dashed line). n = a minimum of 7 mice/group. Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

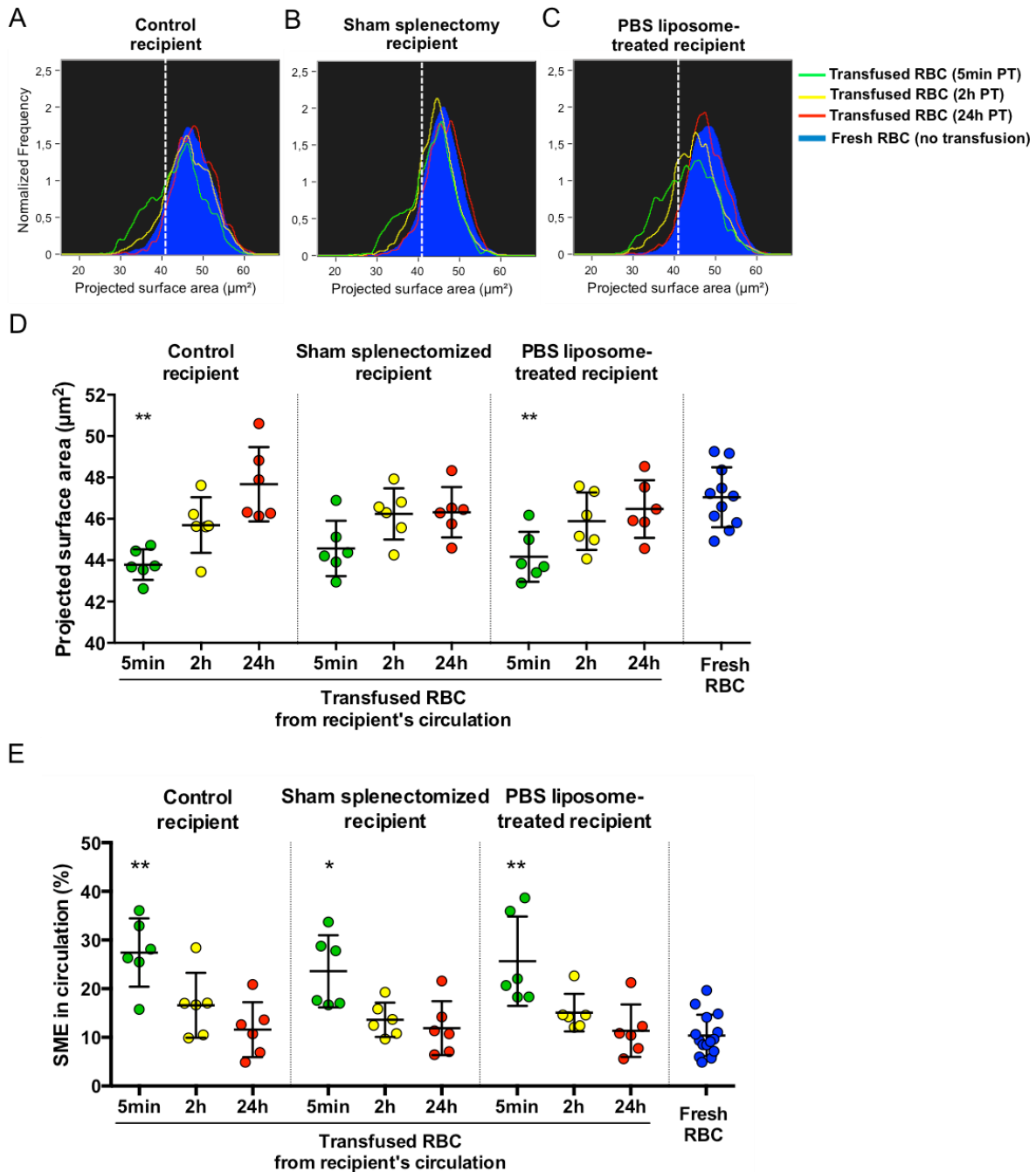


**Figure 7: Evaluation of the post-transfusion retention of long-stored mouse RBC in different recipient mouse models.** Retention of long-stored RBC after transfusion was evaluated using an enrichment factor calculated from the ratio of transfused CFSE<sup>+</sup> RBC present in a sliced organ/CFSE<sup>+</sup> RBC present in venous blood. The enrichment factor was evaluated over a period of 4h, following transfusion, in the spleen (red line), liver (green line) and bone marrow (blue line) of control (A), splenectomized (B) or clodronate-treated recipients (C). In parallel, the proportion of eliminated transfused RBC was evaluated in the same recipients to illustrate the similarity between the kinetics of organ retention and elimination from the circulation (D, E, F). n = a minimum of 3 mice/group. Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

## Recipient effect

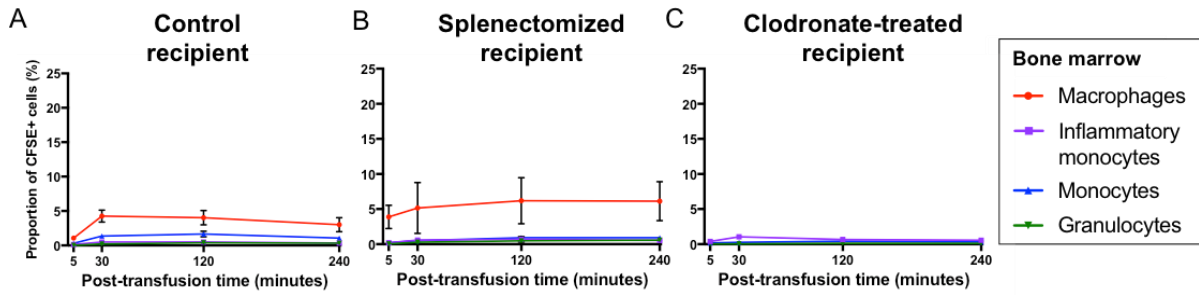


**Supplementary figure 1: Evaluation of the 24h transfusion recovery of long-stored RBC in different control recipient mouse models.** To control the impact of the recipient's treatment on the capacity of RBC to circulate after transfusion, RBC stored for 14 days were transfused either to control (circles, full line), sham splenectomized (squares, dashed line) or PBS liposome-treated (triangles, dotted line) mouse recipients. 200 $\mu$ l of CFSE-labeled RBC were transfused and their proportion in circulation was evaluated at 5min, 2h and 24 h after transfusion. n = a minimum of 7 mice/group. Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

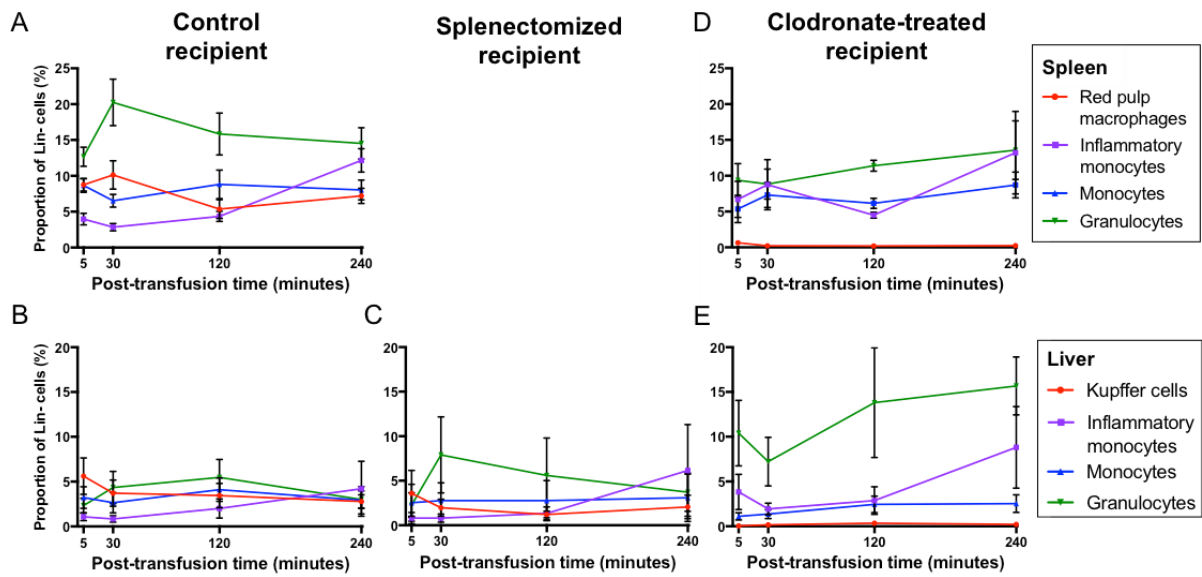


**Supplementary figure 2: Characterization of the transfused RBC morphology in the circulation of different control recipient mouse models.** (A) Control, (B) sham splenectomized or (C) PBS liposome-treated recipient mice were transfused with 200 $\mu\text{l}$  of CFSE-labeled long-stored RBC. Projected surface area on normalized frequency plots of transfused RBC at 5 min (green line), 2h (yellow line) and 24h (red line) after transfusion or control RBC from an untransfused mouse (blue) are shown. Dashed white vertical lines define gating of the storage-induced micro-erythrocytes (SME) subpopulation. (D) Mean projected surface area of the transfused RBC and (E) quantification of SME show that the transfused RBC morphology is similar in sham splenectomized, PBS liposome-treated and control recipients. (E) Quantification of SME present in the recipient circulation show that RBC morphology is normalized in the hours following transfusion.  $n = 6$  mice/group. In D and E, data are presented

as mean  $\pm$  SEM. In D and E, \*P<0,05, \*\*P<0,0 when compared to the “Fresh RBC” condition by a Kruskal-Wallis test.



**Supplementary figure 3: Evaluation of the post-transfusion erythrophagocytosis of long-stored mouse RBC in the bone marrow of different recipient mouse models.** RBC stored for 14 days were transfused either to (A) control, (B) splenectomized or (C) clodronate-treated mouse recipients. Erythrophagocytosis of long-stored RBC was evaluated at 5, 30, 120 and 240min after transfusion by quantifying the proportion of bone marrow CFSE<sup>+</sup> macrophages (red lines), monocytes (blue lines), inflammatory monocytes (purple lines) and granulocytes (green lines). n = a minimum of 3 mice/time point. Data are presented as mean  $\pm$  SEM.



**Supplementary figure 4: Quantification of immune cells in the spleen and liver of different recipient mouse models after transfusion of long-stored mouse RBC.** RBC stored for 14 days were transfused either to control (left panels), splenectomized (middle panel) or clodronate-treated (right panels) mouse recipients. The proportion of macrophages (red lines), monocytes (blue lines), inflammatory monocytes (purple lines) and granulocytes (green lines) in the spleen (upper panels) and liver (lower panels) was evaluated at 5, 30, 120 and 240min after transfusion. n = a minimum of 3 mice/time point. Data are presented as mean  $\pm$  SEM.





## Résumé

L'érythropoïèse est un processus extrêmement prolifératif et finement régulé. Ses acteurs ainsi que ses nombreuses interactions (avec les mécanismes liés à l'inflammation, le fer, l'hypoxie, ...) sont relativement bien définis bien que faisant encore l'objet de nombreux travaux. A l'autre extrémité de la vie du globule rouge (GR), les choses sont moins bien établies. Les principaux acteurs de l'élimination sont connus mais leur participation relative à l'état normal et pathologique reste débattue. De même, le signal établissant le GR sénescence comme devant être éliminé n'a pas été déterminé de manière consensuelle. L'application clinique thérapeutique concernée par l'importance de l'élimination érythrocytaire est la transfusion sanguine dont elle détermine partiellement l'efficacité. Ces considérations et les données de la littérature nous ont mené à formuler le postulat suivant : l'élimination érythrocytaire est négativement régulée en réponse à l'anémie afin de participer au maintien d'un nombre adéquat de GR circulants.

L'objectif de ce travail a été de démontrer la présence d'un mécanisme de régulation de l'élimination érythrocytaire en réponse à l'anémie et d'en caractériser les principaux facteurs. Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'effet de certaines situations pathologiques sur ce mécanisme et enfin d'en déterminer les principaux acteurs cellulaires et moléculaires. Pour le réaliser nous avons utilisé et développé différents modèles murins d'étude de l'élimination érythrocytaire endogène ainsi que dans un contexte transfusionnel.

Nous avons observé une augmentation de la durée de vie des GR endogènes en réponse à l'administration d'agents stimulant l'érythropoïèse (ASE). Ensuite, et dans un modèle de transfusion de GR, nous avons démontré que l'anémie, l'hypoxie et l'administration d'ASE induisent une diminution de l'élimination érythrocytaire. Nous avons démontré que l'érythropoïétine est un facteur nécessaire et suffisant à cette modulation de l'élimination. Elle est indépendante de l'activité érythropoïétique et n'est pas spécifique à l'activité splénique d'élimination érythrocytaire. Nous avons ensuite étudié l'effet de différents niveaux de surcharge en fer et de la carence martiale sur l'élimination, tous diminuant l'élimination. La détermination de la cible moléculaire et cellulaire a été abordée par l'utilisation de modèles murins transgéniques et s'est avérée négative.

Nos résultats confirment, pour la première fois expérimentalement, l'existence d'un mécanisme de régulation de l'élimination érythrocytaire. Ce mécanisme est médié par un nouvel effet homéostatique de l'EPO, la réduction de l'élimination érythrocytaire. L'EPO a donc deux effets indépendants mais à la finalité similaire : maintenir un nombre adéquat de GR en circulation. D'une part, en régulant la production et d'autre part, en modulant l'élimination érythrocytaire tant en situation normale qu'en réponse à une anémie aiguë. Bien que les cibles et mécanismes effecteurs précis de l'EPO restent à identifier, ce travail ouvre la voie à l'étude d'un nouvel aspect de la physiologie érythrocytaire en abordant l'angle de la (dé)régulation de l'élimination érythrocytaire en conditions normales et pathologiques indépendamment de la qualité du GR circulant. La compréhension fine de ce mécanisme et son implication potentielle en pathologie comme en transfusion permettrait également à terme le développement de nouveaux outils thérapeutiques.