

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

L'INFECTION PERSISTANTE PAR LE PARASITE CUTANE LEISHMANIA MAJOR FAVORISE LA MYELOPOÏÈSE ADAPTATIVE

Par

Fabio Luiz Bandeira Ferreira

Mémoire pour l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)
En Virologie et Immunologie

Jury d'évaluation

Examineur externe

Tatiana Scorza
Université de Québec à Montréal

Examineur interne

Maritza Jaramillo
INRS-Institute Armand Frappier Santé
Biotechnologie

Directeur de recherche

Krista Heinonen
INRS-Institute Armand Frappier Santé
Biotechnologie

REMERCIEMENTS

Pour commencer je voudrais d'abord remercier ma fille Sophia qui est mon soutien, ma force, la personne la plus spéciale de ma vie et qui est toujours à mes côtés, sans son affection et sa présence dans ma vie rien ne serait possible car tout ce que je c'est aussi penser à elle et à son bien-être. Deuxièmement, je voudrais remercier ma directrice de recherche, la professeure Krista Heinonen, de m'avoir acceptée d'abord comme stagiaire puis comme étudiant à la maîtrise. Son caractère, son intelligence et ses enseignements ont été extrêmement importants pour la réalisation de cette maîtrise. Merci beaucoup pour votre dévouement et votre empathie tout au long de ce processus. Je tiens également à remercier le professeur Albert Descoteaux et Olivier Séguin pour tout le soutien, l'enseignement et le partenariat en analyse parasitaire.

Un gros merci à toute ma famille qui est au Brésil et surtout ma mère Márcia pour tout le soutien depuis que j'ai décidé de venir au Canada. Sans ses enseignements et sa force, rien ne serait possible. Un merci tout spécial à mon père Luiz (in memoriam) qui m'a appris à faire preuve d'empathie, à être intégrale et que l'éducation est libertaire. Votre caractère et votre honnêteté sont des marques que je porte dans mon âme.

Je tiens à remercier tous les amis que j'ai fait à l'Institut Armand Frappier, sans oublier mon laboratoire. Depuis plus de deux ans, ils sont tous ma famille ici au Canada. Merci pour tous les bons moments, les conseils et l'amitié que je porterai avec moi jusqu'à la fin de mes jours.

Pour finir, Je remercie les membres du jury d'évaluation pour leur disponibilité dans l'encadrement de la révision et la correction de ce mémoire.

RÉSUMÉ

L'inflammation peut induire l'activation des cellules souches hématopoïétiques et des cellules progénitrices dans la moelle osseuse, conduisant à une hématopoïèse d'urgence. Lors de l'inflammation chronique, cette activation peut entraîner une déplétion des cellules souches hématopoïétiques, une insuffisance de la moelle osseuse et le développement de problèmes cliniques. En utilisant deux souches de *Leishmania major*, une transitoire et autre persistante, nos résultats suggèrent que l'afflux accru de cellules myéloïdes vers le site de la lésion persistante est soutenu par une augmentation des cellules progénitrices multipotentes à polarisation myéloïde dans la moelle osseuse et la rate chez les souris infectées par la souche persistante. Chez les dernières, une augmentation des monocytes et des cellules myéloïdes dérivés des monocytes de la rate, ainsi qu'une réponse d'interféron atténuée a été constatée, par rapport à la souche transitoire, tandis que les deux souches induisaient une hausse rapide des cytokines myélopoïétiques, telles qu'IL-1 β et GM-CSF. En conclusion, ces résultats démontrent que la présence de l'agent pathogène dans la moelle osseuse n'est pas nécessaire pour l'induction d'une myélopoïèse adaptée à l'infection, et que le parasite cutané est suffisant pour influencer la fonction des cellules progénitrices.

Mots clés : Cellule souche/progénitrice hématopoïétique, *Leishmania major*, leishmaniose cutanée, myélopoïèse, inflammation

ABSTRACT

The Inflammation can induce activation of hematopoietic stem cells and progenitor cells in the bone marrow, leading to emergency hematopoiesis. In chronic inflammation, this activation can lead to depletion of hematopoietic stem cells, bone marrow failure, and the development of clinical problems. Using two strains of *Leishmania major*, one transient and the other persistent, our results suggest that the increased influx of myeloid cells to the site of persistent injury was supported by an increase in myeloid-p multipotent progenitor cells in the bone marrow and spleen in mice infected with the persistent strain. An increase in monocytes and myeloid cells derived from monocytes in spleen, as well as an attenuated interferon response in mice infected with the persistent strain compared to the transient strain were observed, while both strains induced a rapid upregulation of myelopoietic cytokines, such as IL-1 β and GM-CSF. In conclusion, these results demonstrate that the presence of the pathogen in the bone marrow is not necessary for the induction of a myelopoiesis adapted to the infection and that the cutaneous parasite is sufficient to influence the function of the progenitor cells.

Key words: Hematopoietic stem/progenitor cell, *Leishmania major*, cutaneous leishmaniasis, myelopoiesis, inflammation

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES TABLEAUX	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	14
1 INTRODUCTION	3
1.1 CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES	3
1.1.1 <i>Structure hiérarchique du système hématopoïétique</i>	4
1.1.2 <i>Le rôle des cytokines et des chimiokines dans le microenvironnement de la CSH</i>	7
1.1.3 <i>Effets de l'inflammation sur les cellules souches hématopoïétiques (CSH)</i>	10
1.2 LA MYÉLOPOÏÈSE DANS LE CONTEXTE DE L'INFECTION BACTÉRIEN ET PARASITAIRE.....	13
1.3 LA LEISHMANIOSE.....	18
1.3.1 <i>La Leishmaniose cutanée (LC)</i>	21
1.3.2 <i>Le cycle parasitaire</i>	23
1.3.3 <i>La réponse immunitaire cutanée</i>	25
1.3.4 <i>Leishmania major : souche transitoire vs souche persistente</i>	27
1.3.5 <i>La Leishmaniose et l'hématopoïèse</i>	29
2 PROBLEMATIQUE ET OBJECTIVES	34
3 ARTICLE	36
3.1 RÉSUMÉ	37
3.2 INTRODUCTION	38
3.3 MATERIALS AND METHODS.....	40
3.3.1 <i>Experimental animals and parasites</i>	40
3.3.2 <i>Ethics statement</i>	40
3.3.3 <i>Processing of ear tissues and evaluation of parasite burden</i>	40
3.3.4 <i>Flow Cytometry</i>	41
3.3.5 <i>Bone marrow cytokine/chemokine analysis</i>	41
3.3.6 <i>Statistical analysis</i>	42
3.4 RESULTS	42
3.4.1 <i>Myeloid cells recruited to the skin lesions at late time points during persistent Leishmania major infection adopt a regulatory phenotype</i>	42

3.4.2	<i>Myeloid-biased multipotent progenitor cells accumulate in BM and spleen in mice infected with the non-healing strain of L. major</i>	44
3.4.3	<i>Persistent cutaneous leishmaniasis promotes the accumulation of stem-like megakaryocyte progenitors</i>	46
3.4.4	<i>BM soluble cytokine/chemokine profiles suggest absence of specific pro-inflammatory responses in persistent infection</i>	50
3.5	DISCUSSION.....	51
3.6	CONFLICT OF INTEREST	55
3.7	FUNDING.....	55
3.8	ACKNOWLEDGMENTS	55
3.9	SUPPELMENTAL INFORMATION.....	56
4	DISCUSSION	65
5	CONCLUSION	73
6	ANNEXE I	75
7	BIBLIOGRAPHIE	76

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1. LES LT-HSC SONT AU SOMMET DE LA HIÉRARCHIE HÉMATOPOÏÉTIQUE..	6
FIGURE 1.2. LA MYÉLOPOÏÈSE D'URGENCE.....	16
FIGURE 1.3. LÉSION DE LEISHMANIOSE CUTANÉE (LC).....	22
FIGURE 1.4. CYCLE D'INFECTION PAR <i>LEISHMANIA</i> SPP.	24
FIGURE 3.1. <i>LM</i> Sd AND <i>LM</i> FN INFECTIONS IN C57BL/6 MICE.	43
FIGURE 3.2. MYELOID CELL ACCUMULATION AT THE SITE OF INFECTION IN CUTANEOUS LEISHMANIASIS.	44
FIGURE 3.3. INDUCTION OF MYELOID-BIASED MULTIPOTENT PROGENITORS IS ASSOCIATED WITH AN ACCUMULATION OF MYELOID CELLS DURING PERSISTENT INFECTION WITH <i>L. MAJOR</i>	46
FIGURE 3.4. ACCUMULATION OF PLATELET-BIASED MULTIPOTENT PROGENITORS IN BONE MARROW AND SPLEEN IN <i>LM</i> Sd- INFECTED MICE.	48
FIGURE 3.5. LONG-TERM HSCs DISPLAY BIPHASIC KINETICS IN BONE MARROW AND SPLEEN OF <i>LM</i> Sd-INFECTED MICE.	49
FIGURE 3.6. BONE MARROW INFLAMMATORY CYTOKINE/CHEMOKINE PROFILES INDICATE EARLY ACTIVATION AND SUBSEQUENT SUPPRESSION OF INFLAMMATORY RESPONSES IN NON-HEALING <i>L. MAJOR</i> INFECTION.	51
FIGURE S3.1. FLOW CYTOMETRY GATING STRATEGY AND REPRESENTATIVE RESULTS IN THE INFECTED EAR DERMIS.....	59
FIGURE S3.2. FLOW CYTOMETRY GATING STRATEGY AND REPRESENTATIVE RESULTS FOR BM STEM/PROGENITOR CELL SUBSETS.....	60
FIGURE S3.3. FLOW CYTOMETRY GATING STRATEGY AND REPRESENTATIVE RESULTS FOR MYELOID CELLS IN BM AND SPLEEN.....	61
FIGURE S3.4. FLOW CYTOMETRY GATING STRATEGY AND REPRESENTATIVE RESULTS FOR RED BLOOD CELLS AND PLATELETS.....	62
FIGURE S3.5. LYMPHOCYTES IN BONE MARROW.....	63
FIGURE S3.6. CELL CULTURE COMPARING INFECTED GROUPS (<i>LM</i> FN OR <i>LM</i> Sd) TO NAIVE CONTROL MICE....	64

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1. LES PRINCIPALES CYTOKINES AGISSANT SUR LA CELLULE SOUCHE HÉMATOPOÏÉTIQUE	9
TABLEAU 1.2. LES PRINCIPALES ESPÈCES DE LEISHMANIES RESPONSABLES DE MALADIES HUMAINES.	19
TABLE S3.1. LIST OF ANTIBODIES USED FOR FLOW CYTOMETRY.....	56
TABLE S3.2. LIST OF CYTOKINES AND CHEMOKINES IN THE MULTIPLEX ASSAY.....	58

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BFU-E: unité formatrice d'éclatement érythroïde / *Burst-forming unit-erythroid*

C-CFU: cellule unitaire formant colonie / *colony-forming unit cell*

c-Kit/CD117: le proto-oncogène c-Kit ou le cluster de différenciation 117

c-MPL: récepteur de la thrombopoïétine / *Thrombopoietin receptor*

CCL2: C-C motif chimiokine ligand 2 / *C-C motif chemokine ligand 2*

CCR2: C-C Motif Chemokine Receiver 2 / *C-C Motif Chemokine Receptor 2*

CD: cellules dendritiques

CD11b: cluster de la molécule de différenciation 11B

CD34: cluster de différenciation 34

CE: cellules endothéliales

CSM: cellules stromales mésenchymateuses

CXCL 8: C-X-C motif chimiokine ligand 8 / *C-X-C motif chemokine ligand 8*

EMP: progéniteurs érythro-myéloïdes / *Erythro-myeloid progenitors*

FLT3: tyrosine kinase de type fms 3 / *fms-like tyrosine kinase 3*

G-CSF: facteur de stimulation des colonies granulocytes ou *granulocyte-clony stimulating*

CFU-GM: unité de formation de colonies de granulocytes-macrophages / *granulocyte-macrophage colony-forming unit*

GM-CSF: facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages / *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

GMP: progéniteurs granulocytes-monocytes / *granulocyte-monocyte progenitors*

Gr-1: Ly6G / Ly6C antigen

HSPC: cellules souches et progénitrices hématopoïétiques ou *hematopoietic stem and progenitors cells*

IFN γ : Interféron gamma

IL-1: interleukine-1

iNOS: oxyde nitrique synthase inductible / inducible nitric oxide synthase

LC: leishmaniose cutanée

Lin-: lignage négatif / lineage Negative

LmFd: Leishmania major Friedlin

LMPP: lymphoid-primed multipotent progenitors

LmSd: Leishmania major Seidman

LPS: lipopolysaccharide bactérien

LSK : Lin-Sca-1+c-Kit+

LT-HSC : CSH à long-terme ou long-term HSC

LV: leishmaniose viscérale

MCL : leishmaniose mucocutanée

MCP1: protéine chimio attractive monocytaire 1

MDM : macrophages dérivés de monocytes

MDSC: cellule suppressive dérivée de myéloïde / myeloid-derived suppressor cell

MEP: progéniteurs mégacaryocytes-érythrocytes

MIP-1 α : protéine inflammatoire des macrophages-1 α

MO: moelle osseuse

MPP: progéniteurs multipotents / multipotent progenitors

MSC: cellules stromales / souches mésenchymateuses ou mesenchymal stem / stromal cells

NET: neutrophil extracellular traps

NK: natural killers

NO : nitric oxide

OB: ostéoblastes

OMS: Organisation mondiale de la santé

PAMP: Modèles moléculaires associés aux agents pathogènes / Pathogen-associated molecular patterns

PCR: réaction en chaîne par polymérase / polymerase chain reaction

PLT: plaquettes

ROS: espèces réactives de l'oxygène / reactive oxygen species

SCA-1/LY6A/E: stem-cell antigen 1

SCF: facteur de cellule souche / Stem cell factor

Sc-RNA-seq : Séquençage d'ARN unicellulaire/ Single cell RNA sequencing

SLAM: molécule d'activation lymphocytaire de signalisation / signaling lymphocytic activation molecule

ST-HSC: CSH à court-terme / short-term HSC

TCF/LEF: T-cell factor / Lymphoid-enhancer-binding factor

TF: facteurs de transcription / transcription factor

TGF- β : facteur de croissance transformant bêta ou transforming growth factor beta

Th1: cellules T auxiliaires de type 1 / T helper type 1 cells

Th2: cellules T auxiliaires de type 2 / T helper type 2 cells

Thy-1.1: membre glycoprotéique lié au GPI / GPI linked glycoprotein member

TLR: récepteur Toll-like,

TNF- α : facteur de nécrose tumorale α

TPO: thrombopoïétine

VCAM-1: protéine d'adhésion cellulaire vasculaire 1 / vascular cell adhesion protein 1

1 INTRODUCTION

1.1 Cellules Souches Hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont les architectes de l'hématopoïèse définitive, c'est-à-dire de la production de cellules sanguines qui se produit en continu, au cours de la vie d'un organisme. Chaque CSH est programmée pour permettre une production efficace des composants sanguins cellulaires avec un but manifeste qui a été façonné par l'évolution: des globules rouges qui permettent un transport efficace de l'oxygène, des mégacaryocytes et leur progéniture plaquettaire qui interagissent avec les vaisseaux sanguins et les facteurs de coagulation solubles pour réguler coagulation, des cellules du système immunitaire inné et acquis qui agissent contre les attaques microbiennes (Ng and Alexander 2017). Le microenvironnement de la moelle osseuse (MO) avec son anatomie spécialisée et son système vasculaire interconnecté fournit un sanctuaire où les CSH résident, sont maintenues et se différencient en plusieurs lignées sanguines. La niche de la MO est un microenvironnement critique qui régule de nombreuses activités des cellules souches, y compris l'auto-renouvellement, la mobilisation, la greffe et la différenciation cellulaire (Yu and Scadden 2016).

Les CSH sont, en effet, des précurseurs qui ont une capacité d'auto-renouvellement et la capacité de régénérer tous les différents types de cellules qui composent le système hématopoïétique (Bonnet 2002, McCulloch and Till 2005). Historiquement, les CSH de souris ont été identifiées rétrospectivement en utilisant des tests clonaux *in vivo* dans lesquels des cellules marquées (par exemple, génétiquement marquées avec des gènes rapporteurs) ont été évaluées pour le potentiel de reconstitution fonctionnelle de l'hématopoïèse après injection dans des hôtes conditionnés, avec une capacité d'auto-renouvellement et une capacité permanente de reconstitution des systèmes myéloïde et lymphoïde (Abramson, Miller et al. 1977, Capel, Hawley et al. 1990, Jordan and Lemischka 1990).

L'identification et la caractérisation des CSH ont nécessité des stratégies pour isoler ces cellules rares de la MO des nombreux composants cellulaires. Des tests d'unités de repeuplement compétitives fonctionnelles ont estimé la fréquence de ces cellules rares à une cellule sur 10 000 dans la MO (Szilvassy, Humphries et al. 1990). Toute l'activité des CSH dans la MO de souris adulte est contenue dans une population de cellules caractérisée par l'expression du récepteur tyrosine kinase c-Kit (le récepteur du facteur de cellule souche), l'antigène des cellules souches-1 (Sca-1, Ly-6A/E) et aucune ou de faibles niveaux d'expression de nombreux antigènes de surface cellulaire trouvés sur des cellules différenciées appartenant

à diverses lignées (appelées *lineage* négative ou Lin-) (Shizuru, Negrin et al. 2005). En plus de ces récepteurs, les CSH de souris expriment de manière variable la sialomucine CD34, selon le stade de développement et l'état du cycle cellulaire, des récepteurs tyrosine kinases; le CD150, membre fondateur de la famille des récepteurs SLAM, le récepteur de la thrombopoïétine (TPO), c-Mpl, est également exprimé sur ~ 70% des CSH de souris c-Kit + Lin-Sca-1 + (Solar, Kerr et al. 1998, Ogawa, Tajima et al. 2001, Yilmaz, Kiel et al. 2006). Les CSH murines sont enrichies en une population qui n'exprime pas de marqueurs de cellules hématopoïétiques matures (c'est-à-dire qu'elles sont lignées-), expriment Sca1 et c-kit, mais sont dépourvues d'expression de FLT3 (FLT3- lin- Sca1+ kit+ ou cellules FLT3-LSK). De cette façon, les cellules LSK-, sont une population cellulaire qui a été décrite dans la MO avec un phénotype lin- Sca1+ comparable mais dépourvu de l'expression de c-kit (cellules lin- Sca1+ kit- ou LSK-). Les cellules LSK- peuvent être générées à partir de cellules transplantées *in vivo* et exprimer le marqueur pan hématopoïétique CD45, suggérant qu'il s'agit de cellules hématopoïétiques. Curieusement, les cellules LSK- sont rares dans le foie du fœtus et s'accumulent avec l'âge dans la MO (Kumar, Fossati et al. 2008). Les CSH contenues dans la population de cellules LSK- sont responsables de la production de types variables de lignées de cellules sanguines matures. Cependant, on sait peu sur si et comment les cellules LSK- sont fonctionnellement régulées par d'autres lignées cellulaires qui sont dérivées de cellules LSK- et expriment des marqueurs de surface cellulaire similaires. Phénotypiquement, les LSK- n'ont pas les marqueurs de lignée (Lin) exprimés sur les cellules myéloïdes et lymphoïdes matures (Peng, Chen et al. 2012).

1.1.1 Structure hiérarchique du système hématopoïétique

Les scientifiques ont pensé que la population de CSH dans la MO était homogène et dormante au sommet de la hiérarchie de l'hématopoïèse. Ce concept est resté longtemps, mais des études avec des CSH ont montré que cette vision n'était pas soutenue en raison de la nécessité d'une production cellulaire continue et d'une réponse cellulaire au cours d'un processus infectieux (Yokota 2019).

Le système sanguin des mammifères contient plus de dix types de cellules matures distinctes, des globules rouges (érythrocytes), des mégacaryocytes / plaquettes, des cellules myéloïdes (monocytes / macrophages et granulocytes), des mastocytes, des lymphocytes T et B, des cellules tueuses naturelles (NK) et cellules dendritiques (CD) (**figure 1.1**). Le concept selon lequel ces divers types de cellules dérivent tous d'une cellule mère commune (les CSH) est intrigant et indique que les CSH possèdent un potentiel de différenciation remarquable.

Depuis ces études initiales, les CSH de souris ont été plus largement purifiées en identifiant puis en utilisant des marqueurs supplémentaires de surface cellulaire pour les distinguer des autres cellules de la MO (Seita and Weissman 2010, Yokota 2019).

Spangrude *et al.* ont reporté en 1994, une population isolée dans la MO comprenant au moins 3 populations multipotentes: les CSH à long-terme (LT-HSC), les CSH à court-terme (ST-HSC) et les progéniteurs multipotents (MPP, une population de cellules qui a perdu la capacité d'auto- renouvellement). Dans ce modèle classique, les CSH peuvent être divisées en deux sous-populations selon leur expression CD34 : CD34⁻ / LT-HSC et CD34⁺ / ST-HSC. Les LT-HSC sont une population rare et quiescente dans la MO et ont une capacité de reconstitution complète à long terme (> 3 ~ 4 mois), tandis que les ST-HSC n'ont qu'une capacité de reconstitution à court terme (généralement <1 mois). Les LT-HSC se différencient en ST-HSC, et par la suite, les ST-HSC se différencient en MPP, qui n'ont pas de capacité d'auto-renouvellement détectable (Morrison and Weissman 1994, Seita and Weissman 2010, Cheng, Zheng et al. 2020).

La première division de la CSH se produit entre les progéniteurs myéloïdes communs (CMP, à potentiel myéloïde, érythroïde et mégacaryocytaire) et les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP, à potentiel lymphoïde uniquement), qui sont dérivés des MPP. Le deuxième point de ramification au niveau des CMP sépare les progéniteurs bipotents de granulocytes-macrophages (GMP) et de mégacaryocytes-érythrocytes. Les CLP forment en outre des cellules T, B, NK et dendritiques, tandis que les GMP se différencient en granulocytes et monocytes, et les MPE génèrent des mégacaryocytes et érythrocytes. Toutes ces populations forment un modèle de hiérarchie équilibré en forme d'arbre, dans lequel les facteurs de transcription clés et les cytokines conduisent précisément à la différenciation des CSH par étapes en cellules sanguines matures (Seita and Weissman 2010, Cheng, Zheng et al. 2020).

La niche des CSH chez la souris joue un rôle clé dans la division cellulaire et a été partiellement caractérisée. Des cellules stromales de la MO soutiennent l'auto- renouvellement des CSH et la maturation myélo-lymphoïde. Par ailleurs, des populations enrichies en CSH ont été localisées près de l'endoste et près des vaisseaux sanguins de la MO. Ces recherches prouvent que les interactions entre les récepteurs et ligands des CSH et de cellules de la niche sont essentielles pour le maintien du système hématopoïétique (Calvi, Adam et al. 2003, Zhang, Niu et al. 2003).

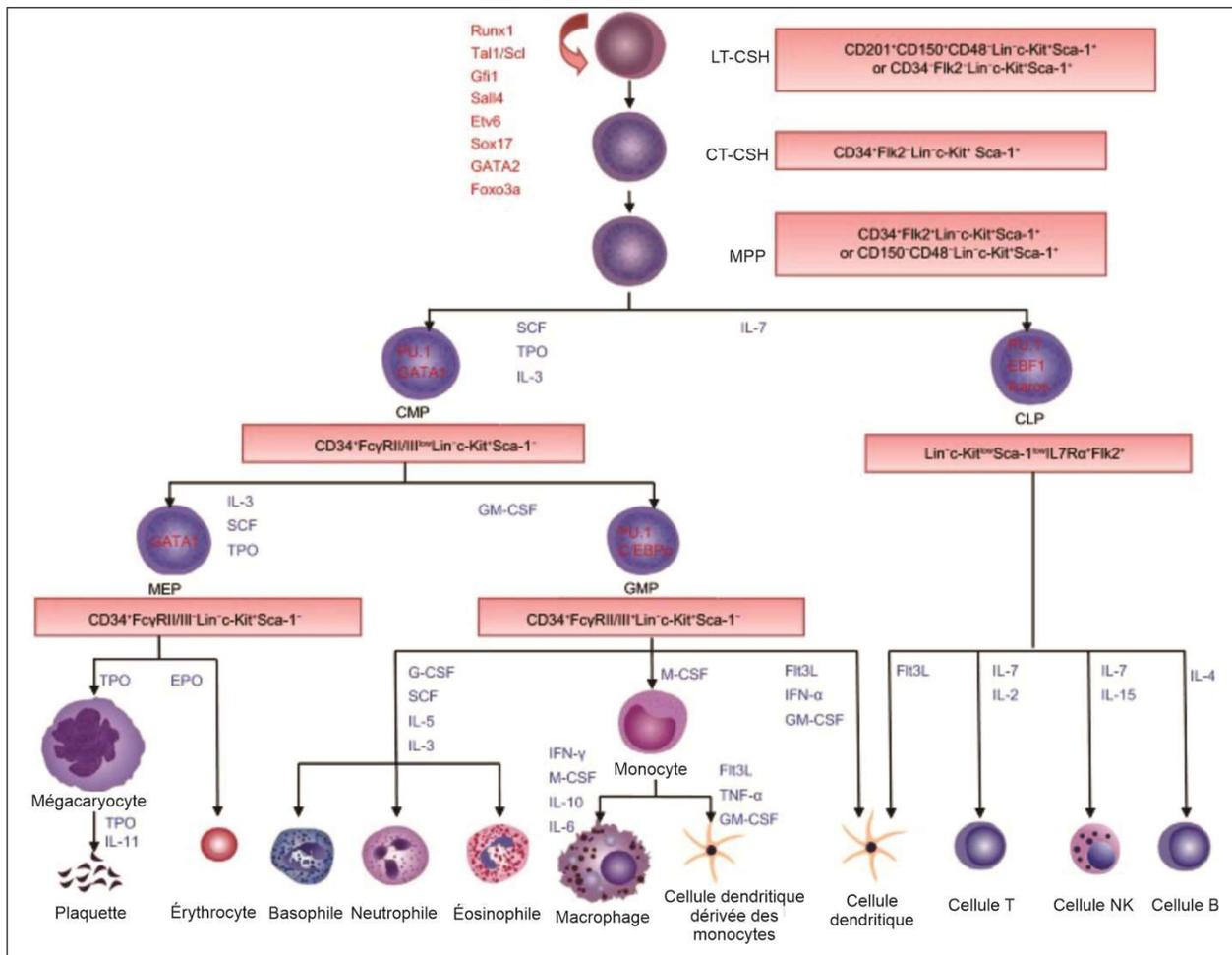


Figure 1.1. Les LT-HSC sont au sommet de la hiérarchie hématopoïétique. Les LT-HSC se différencient en ST-HSC, puis en MPP avec une capacité d'auto-renouvellement réduite. En aval des MPP, une séparation stricte entre les branches myéloïde(CMP) et lymphoïde (CLP). Les CLP donnent naissance à des lymphocytes et à des cellules dendritiques. Les MEPs se différencient en mégacaryocytes/plaquettes et érythrocytes. Les GMP produisent des granulocytes, des macrophages et des cellules dendritiques. (Cheng, Zheng et al. 2020).

1.1.2 Le rôle des cytokines et des chimiokines dans le microenvironnement de la CSH

Nombreuses cytokines (**Tableau 1.1**) et leurs récepteurs ont été étudiées, mais peu de récepteurs/ligands ont avérés jouer des rôles essentiels dans la fonction des CSH. Deux des paires récepteur/ligand qui sont critiques pour CSH sont SCF /c-Kit et TPO / c-Mpl. Des études utilisant des CSH de souris isolées prospectivement ont montré que le c-Kit et le c-Mpl sont tous deux exprimés sur un CSH hautement purifiée et que l'élimination génétique de TPO ou de c-Mpl conduit à une réduction de CSH. Conformément à ces données, les cytokines SCF et TPO peuvent à la fois soutenir la survie et la prolifération des CSH de souris purifiées et testées en culture sans sérum au niveau de la cellule unique. En fait, de nombreux scientifiques pensent que la signalisation TPO des CSH se produit via une association de c-Mpl qui agit comme un inhibiteur de nombreuses voies de signalisation des cytokines, y compris SCF, EPO (Erythropoïétin), IL-3, IL-7 ainsi que TPO. De plus, les CLS possèdent d'importants récepteurs de cytokines qui jouent un rôle clé dans l'hématopoïèse, comme le récepteur de granulocytes (G)-CSF (R), le récepteur EPO (EPOR) et le récepteur TPO (c-MPL) (Adolfsson, Borge et al. 2001, Buza-Vidas, Antonchuk et al. 2006, Robb 2007, Seita and Weissman 2010).

Les actions cellulaires des *cellules souches et progénitrices hématopoïétiques* (HSPC) sont contrôlées à la fois par des facteurs cellulaires intrinsèques tels que les réseaux de régulation transcriptionnelle, ainsi que par des facteurs cellulaires extrinsèques tels que les facteurs de croissance, les cytokines, les chimiokines et les microvésicules (MV) comme le G-CSF, le CXCL12 et le facteur de croissance transformant- β (TGF- β). Au cours de la vie embryonnaire, foetale et adulte, l'hématopoïèse dépend d'un microenvironnement constitué des composants solubles et des interactions cellule-cellule. Ce microenvironnement est connu sous le nom de niche hématopoïétique, qui est principalement composé des cellules dérivées d'un progéniteur commun d'origine mésenchymateuse qui ajustent la quiescence et l'activation stable des HSPC. Les cellules souches (y compris les HSPC ou *Mesenchymal stem cells* (MSC) assurent la régénération des tissus tout au long de la vie. La recherche a indiqué que les cytokines et les facteurs de croissance des MSC exercent leurs effets avantageux sur les cellules cibles pour stimuler la réparation et la régénération des tissus, y compris la modulation de la réponse immunitaire, la survie cellulaire, l'apoptose, le métabolisme, la prolifération, la différenciation, l'hématopoïèse, l'angiogenèse, la myogenèse, le remodelage, la cicatrisation des plaies, croissance des cheveux, neuroprotection, développement collatéral et protection rénale (Wilson and Trumpp 2006, Orkin and Zon 2008, de Kruijf, Fibbe et al. 2020).

La niche est elle-même régulée par des cellules d'origine hématopoïétiques telles que les macrophages et les *mégacaryocytes*. Les macrophages soutiennent indirectement les CSH en influençant l'activité d'autres cellules de niche non hématopoïétiques. Plusieurs populations de macrophages ont été identifiées dans la MO sur la base de leur expression, de leur emplacement et de leurs fonctions antigéniques de surface. Les macrophages du tissu ostéal (ostéomac) sont cLy6G + F4 / 80 + et régulent la fonction des ostéoblastes en formant une canopée sur les ostéoblastes de la muqueuse osseuse dont la fonction est la formation d'ostéocytes, cellules importantes pour la formation et l'absorption de la MO (Chang, Raggatt et al. 2008, McCabe and MacNamara 2016).

Les macrophages CD169 + ont été identifiés comme des cellules critiques de soutien de la niche stromale qui régulent indirectement à la fois le cycle des CSH et la taille du pool. L'épuisement des ostéomacs ou des macrophages CD169 + est associé à un nombre accru de CSH circulants. Dans la MO, les mégacaryocytes sont souvent étroitement associés à l'endothélium sinusoidal en étendant des protubérances cytoplasmiques dans les sinusoides. Plusieurs facteurs dérivés du mégacaryocyte soutiennent le maintien de la CSH, notamment CXCL4 (ou facteur plaquettaire 4), le facteur de croissance transformant bêta-1 (TGF- β 1) et TPO. L'épuisement des mégacaryocytes causé par une réduction des taux de TGF- β 1 biologiquement actif dans la MO, entraîne une prolifération accrue des CSH et l'activation des CSH quiescents (Bruns, Lucas et al. 2014, McCabe, Zhang et al. 2015).

En bref, à l'état d'équilibre, la mobilisation des HSPC de la niche de la MO est induite par le G-CSF. Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) et les cellules endothéliales (CE) expriment des chimiokines et de molécules d'adhésion qui retiennent les cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (HSPC) dans la niche de la MO. Les ostéoblastes (OB) sécrètent des inhibiteurs de protéases qui inhibent l'activité protéolytique des protéases dérivées des neutrophiles. Après l'administration de G-CSF, les neutrophiles de la MO augmentent en nombre, amorçant la libération d'enzymes protéolytiques tels que CXCL12, SCF et VCAM-1, qui clivent et inactivent les chimiokines et les facteurs d'adhésion. Les ostéomacs sont épuisés, ce qui coïncide avec une déplétion des ostéoblastes et une sécrétion réduite d'inhibiteurs de protéases, tels que l'alpha-1-antitrypsine. Ceci est associé à une baisse de CXCL12, SCF et VCAM-1, qui sont nécessaires pour maintenir et conserver les HSPC dans leurs niches de la MO. Une activité nerveuse sympathique accrue conduit à une régulation négative de CXCL12, SCF et VCAM-1 par les cellules stromales. Ensemble, ces processus aboutissent à une mobilisation de HSPC vers le sang périphérique (deKruif, Fibbe et al. 2020).

Tableau 1.1. les Principales cytokines agissant sur la Cellule Souche Hématopoïétique.

Principales cytokines agissant sur la cellule souche hématopoïétique dans son état basal, induisant l'hématopoïèse (Metcalfe 2008, Seita and Weissman 2010).

Cytokine	Fonction dans l'hématopoïèse
Érythropoïétine (EPO)	Production de globules rouges
Flt-3	Stimulation des cellules souches et dendritiques en développement
Facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF)	Stimulation d'un ensemble diversifié de colonies de granulocytes-macrophages
Facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF)	Stimulation des colonies granulocytaires
Interleukine-2 (IL-2)	Prolifération des lymphocytes T
Interleukine-3 (IL-3)	Formation de colonies de granulocytes, de macrophages, d'éosinophiles, de mégacaryocytes et d'érythroïdes
Interleukine-5 (IL-5)	Différenciation des cellules B et régulation des éosinophiles
Interleukine-6 (IL-6)	Différenciation des cellules B
Interleukine-7 (IL-7)	Induction des lymphocytes T
Interleukine-11 (IL-11)	Stimulation des mégacaryocytes et des lignées cellulaires de plasmocytomes
Facteur inhibiteur de la leucémie (LIF)	Différenciation et suppression de la clonogénicité des cellules leucémiques
Facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF)	Stimulation des colonies de macrophages
Facteur de cellules souches (SCF)	Prolifération des mastocytes et des cellules souches
Thrombopoïétine (TPO)	Régulation de la production de plaquettes ; stimulation des mégacaryocytes avec IL-3 et SCF

1.1.3 Effets de l'inflammation sur les cellules souches hématopoïétiques (CSH)

Comme décrit précédemment, les CSH sont responsables de la production à vie de cellules sanguines. En même temps, elles doivent répondre rapidement à des besoins aigus tels que ceux reliés à une infection ou une blessure. Un intérêt significatif a émergé sur la façon dont l'inflammation régule le devenir des CSH et comment elle affecte la fonctionnalité à long terme des CSH et le système sanguin dans son ensemble. Les LT-HSC maintiennent la production hématopoïétique tout au long de la vie d'un être humain. Cependant, avec l'âge, l'équilibre est perturbé et les LT-HSC peuvent produire plus de cellules myéloïdes, ce qui entraîne de mauvaises réponses immunitaires à une infection et augmente le risque de développement de leucémies myéloïdes. Les LT-HSC jeunes et âgées répondent différemment au stress inflammatoire, étant inefficaces dans la production de cellules myéloïdes et dans la régulation d'un processus inflammatoire ou infectieux (Mann, Mehta et al. 2018).

Toutes les lignées sanguines participent à l'initiation et à la résolution des événements inflammatoires, et pour cette raison, les réponses inflammatoires sont souvent accompagnées de modifications du système sanguin, y compris une surproduction de cellules myéloïdes et, dans certains cas, de plaquettes (Pascutti, Erkelens et al. 2016, Pietras 2017). Ces populations de courte durée jouent un rôle important de « premiers répondants » dans la défense de l'hôte et leur remplacement continu par les progéniteurs hématopoïétiques est critique pendant les réponses inflammatoires. On sait depuis des décennies que les cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine (IL) -1, le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), les interférons (IFN) et d'autres signaux de danger tels que des dommages et/ou des schémas moléculaires associés à des agents pathogènes peuvent augmenter ou, dans certains cas, supprimer la production cellulaire de la MO normales et leucémiques. Ainsi, les CSH sont à la base d'un système sanguin hautement dynamique, et leur biologie peut être directement affectée par la signalisation inflammatoire (Pietras 2017).

Dans des conditions normales, les CSH sont quiescents mais elles peuvent entrer rapidement dans le cycle cellulaire et se différencier, souvent préférentiellement le long de la lignée myéloïde, en réponse à une infection ou à une blessure (Manz and Boettcher 2014). Il est bien connu que les cellules immunitaires matures et les CSH peuvent être activées soit par activation directe des récepteurs de reconnaissance des pathogènes (PAMP) tels que les récepteurs de type Toll (TLR), soit via des signaux de cytokine pro-inflammatoires (Kawai and Akira 2011, Boettcher and Manz 2017). Au cours de la réponse immunitaire, une gamme

des cytokines pro-inflammatoires est produite en réponse au pathogène de sorte que ces cytokines deviennent une ligne de communication critique par laquelle la présence d'un danger est relayée aux CSH et aux progéniteurs, conduisant à la production de cellules spécifiques qui agiront en réponse à la menace. Alors que l'intégration de tels signaux avec la sortie hématopoïétique peut favoriser une défense efficace de l'hôte dans des conditions aiguës, une exposition prolongée peut être préjudiciable à la fonction HSC. En effet, l'épuisement hématopoïétique associé à la surproduction de cytokines pro-inflammatoires est souvent une caractéristique des maladies inflammatoires chroniques, des hémopathies malignes et des syndromes d'insuffisance médullaire (Anand, Chodda et al. 1998, Ishihara and Hirano 2002, Mirantes, Passegué et al. 2014).

Les interférons (IFN) jouent un rôle important dans la stimulation des CSH. Les IFN sont une famille de plus de 13 cytokines produites en réponse à des agents pathogènes intracellulaires, classées en fonction des caractéristiques biochimiques. Les IFN de type I (IFN-I) comprennent plusieurs espèces d'IFN α et un seul IFN β , et sont largement exprimés par de nombreux types de cellules. Inversement, l'expression de l'IFN de type II unique (IFN-II), IFN γ , est principalement limitée aux cellules NK et T (Mirantes, Passegué et al. 2014). Des études *in vivo* chez la souris ont démontré la capacité paradoxale des IFN à induire directement la prolifération des CSH en réponse à une stimulation aiguë (Essers, Offner et al. 2009, Baldrige, King et al. 2010). Néanmoins, la culture *in vitro* des CSH purifiées amène à des effets antiprolifératifs attendus suggérant que les IFN activent la prolifération des CSH par des moyens autres que l'engagement direct de la machinerie du cycle cellulaire (de Bruin, Demirel et al. 2013). Il est intéressant de noter que la prolifération induite par l'IFN est un événement aigu et bref. En effet, les CSH rentrent rapidement dans un état de repos même lors d'une exposition chronique à l'IFN-I qui est associée à la restauration de gènes renforçant la quiescence, impliquant l'action d'un mécanisme de « freinage » cellulaire. Il est important de mentionner qu'un certain nombre d'études ont démontré que les IFN induisent une expansion du compartiment LSK qui a été interprétée comme une expansion des progéniteurs multipotents en aval des CSH, et cette activation constante des CSH par l'IFN peut également conduire à l'épuisement des CSH et provoquer une insuffisance médullaire (Zhang, Jones et al. 2013, Pietras, Lakshminarasimhan et al. 2014) (Morales-Mantilla and King 2018).

Le TNF- α est impliqué dans une grande variété des processus comme la mort des cellules tumorales (apoptose) et dans plusieurs actions pro-inflammatoires. En plus, cette cytokine joue un rôle important dans la prolifération et de la différenciation cellulaire. Une étude a évalué l'effet

de l'administration *in vivo* de TNF- α sur les CSH. Les chercheurs ont montré que à court terme (trois doses) le TNF entraînait la suppression des CSH cycliques et diminuait leur capacité de repeuplement à long terme (Pronk, Veiby et al. 2011). Cependant, un autre groupe a montré que la production de TNF- α par les cellules CD8⁺ dérivées de la MO baisse l'apoptose des CSH et facilite la greffe hématopoïétique après transplantation chez des receveurs de greffe allogénique et syngénique (Rezzoug, Huang et al. 2008).

Compte tenu de ces résultats discordants, il est clair que les effets du TNF- α sur les CSH sont complexes. Il semble probable que la réponse CSH à la signalisation du TNF dépendrait de la dose et de la durée de l'exposition au TNF- α et de l'environnement local dans lequel résident les CSH, et il peut y avoir des différences dépendantes de l'âge. Cela dit, dans des conditions basales, il semble que la signalisation du TNF régule négativement l'activité de repeuplement de CSH (Schuettpelez and Link 2013).

Le facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF) est une cytokine produite par plusieurs types de cellules stromales et hématopoïétiques de la MO, en réponse à des signaux inflammatoires; ces taux systémiques sont augmentés en réponse à de nombreux types d'infection. Le G-CSF est la principale cytokine régulatrice de la production de neutrophiles en stimulant leur production et libération à partir de la MO. En plus de son rôle dans la granulopoïèse, le G-CSF régule également la fonction des CSH. Le G-CSF est un puissant agent de mobilisation, une propriété qu'il partage avec d'autres cytokines inflammatoires, notamment l'IL-6, l'IL-3, l'IL-12 et le GM-CSF. Certaines études ont montré que le G-CSF induit la mobilisation des cellules souches / progénitrices hématopoïétiques (HSPC) principalement en modifiant le microenvironnement de la MO. Malgré la mobilisation de certaines CSH dans le sang et la rate, l'administration de G-CSF *in vivo*, entraîne une augmentation absolue des CSH phénotypiques (cellules CD150⁺ CD48⁻ LSK) dans la MO (Thomas, Liu et al. 2002, Grassinger, Williams et al. 2012, Schuettpelez and Link 2013).

Certaines autres cytokines, telles que l'IL-6 agissent sur de nombreux types de cellules, y compris les cellules précurseurs hématopoïétiques. L'IL-6 a été impliquée en tant qu'activateur critique de la myélopoïèse en réponse à une infection pathogène et à des troubles inflammatoires chroniques. L'IL-6 inhibe également la lymphopoïèse, suggérant qu'elle régule le choix de la lignée chez les progéniteurs non engagés (Ishihara and Hirano 2002, Maeda, Baba et al. 2005). L'IL-6 c'est un régulateur clé de la production de la lignée hématopoïétique dans le contexte de l'inflammation. Le récepteur de l'IL-6 (IL-6R) est systématiquement exprimé de manière robuste par les MPP, mais pas par les CSH; la stimulation *in vitro* de MPP purifiés avec de l'IL-6 favorise

la production de cellules myéloïdes tout en abrogeant la production de la lignée lymphoïde (Reynaud, Pietras et al. 2011) (Schürch, Riether et al. 2014). Cette recherche suggère que les MPP représentent une population progénitrice très active dont la formation de cellules issues de cette lignée peut être reprogrammée en réponse à la stimulation de signaux inflammatoires tels que l'IL-6 (Mirantes, Passegué et al. 2014). En plus de l'IL-6, d'autres cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-1 et l'IL-17, activent également la myélopoïèse et assurent la production de cellules de défense en réponse aux infections et aux maladies inflammatoires (Nagareddy, Kraakman et al. 2014).

En résumé, les cytokines, en particulier les cytokines inflammatoires, jouent un rôle majeur dans l'expansion des CSH. Dans des conditions homéostatiques, ce système est régulé par des signaux de niche et des niveaux basaux de cytokines pro-inflammatoires, ce qui maintient un équilibre entre la dormance de la CSH et l'amorçage de la lignée. D'autre part, en réponse à des signaux pro-inflammatoires ou pendant la régénération hématopoïétique, le compartiment CSH subit des changements de destin distincts, y compris la prolifération transitoire, l'expansion de MPP1 et l'activation de programmes instructifs spécifiques à la lignée dans des sous-ensembles de CSH. Ceux-ci incluent l'amorçage des mégacaryocytes (Meg) à partir des cellules CD41 + après exposition à l'IFN, au TNF et à l'IL-1. Ces CSH, à leur tour, conduisent à l'expansion de MPP2 biaisé Meg / E et MPP3 biaisé myéloïde, entraînant probablement une production rapide de plaquettes et de la population myéloïde. Pendant ce temps, la production lymphoïde est supprimée via une reprogrammation inflammatoire de MPP4, ce qui entraîne une production myéloïde supplémentaire (Pietras 2017).

1.2 La Myélopoïèse dans le contexte de l'infection bactérien et parasitaire

Le système immunitaire inné est la première ligne de défense de l'hôte contre les agents pathogènes. Dans le cas de la lutte contre un agent infectieux, de nombreuses cellules sont produites, ainsi que plusieurs médiateurs biochimiques dont la fonction est de limiter ou d'éliminer les agents pathogènes et, surtout, prévenir les infections systémiques. La mobilisation des cellules immunitaires à partir de la MO, en particulier celle des neutrophiles, et leur accumulation sur le site de l'infection sont cruciales pour contenir le pathogène (Mitroulis, Kalafatiet al. 2018). Dans ce contexte de défense, la partie du développement et de la différenciation hématopoïétique qui mène aux principaux types de cellules qui jouent un rôle important dans l'infection tel quel les granulocytes, les monocytes et les cellules dendritiques est appelé myélopoïèse adaptée (Schultze, Mass et al. 2019).

Dans des conditions normales, la production myéloïde a pour fonction de maintenir l'homéostasie, c'est à dire, des centaines de millions de neutrophiles et les monocytes sont générés par myélopoïèse afin de remplacer les cellules qui meurent d'apoptose naturelle. Cependant, la production élevée de globules blancs, y compris la monocytose et la neutrophilie, couramment observés dans la présence d'une infection et/ou d'une inflammation, les mécanismes moléculaires qui modulent la myélopoïèse dans diverses conditions physiopathologiques commencent à peine à être compris (Manz and Boettcher 2014, Boettcher and Manz 2016).

Tout le début de la production myéloïde se situe dans la CSH, de sorte que l'incapacité des progéniteurs dérivés de la CSH à s'adapter au besoin accru de cellules matures dans la périphérie peut mettre la vie en danger, comme indiqué par l'effet néfaste de la myélosuppression induite par la chimiothérapie dans le contexte de l'infection systémique. Plusieurs études démontrent un rôle important non seulement des progéniteurs myéloïdes engagés, mais également les CSH dans un processus que s'appelle myélopoïèse d'urgence, qu'est la génération massive de cellules myéloïdes au détriment des lymphocytes dans le cadre d'une inflammation ou d'une infection. À cet égard, les produits dérivés de pathogènes activent la différenciation CSH vers la lignée myéloïde, soit directement ou indirectement, en induisant la production de médiateurs inflammatoires (par exemple, cytokines et facteurs de croissance) par les cellules hématopoïétiques et les populations non hématopoïétiques. Les médiateurs inflammatoires à l'origine de la myélopoïèse adaptée à la demande ciblent non seulement les CSH, mais également les populations de cellules de soutien des CSH, dans la niche hématopoïétique, le microenvironnement où résident les CSH (Mitroulis, Kalafati et al. 2018, Schultze, Mass et al. 2019). Lors d'une infection et avec le besoin de cellules d'origine myéloïde pour contrôler l'infection, les CSH sortent de leur état dormant et passent dans un état prolifératif. Dans ce contexte, plusieurs cytokines, facteurs de croissance et produits dérivés de pathogènes, par exemple, les ligands du récepteur *Toll-like* (TLR), y compris le lipopolysaccharide bactérien (LPS) ou les lipoprotéines, peuvent activer les CSH, modifiant ainsi leur programme transcriptionnel (Essers, Offner et al. 2009, Trumpp, Essers et al. 2010). L'activation des progéniteurs hématopoïétiques conduit à une production accrue de progéniteur de granulocytes/macrophages (GMP), qui se développent ensuite en nombre, forment des grappes et se différencient davantage en neutrophiles, facilitant la myélopoïèse d'urgence (Mitroulis, Kalafati et al. 2018).

Comme décrit dans le chapitre précédent, l'infection/inflammation systémique entraîne une forte augmentation des taux de facteurs de croissance qui favorisent la myélopoïèse. En cas de réponse infectieuse et inflammatoire à une bactérie, le G-CSF agit directement sur les CMP et les GMP, les instruisant vers la granulopoïèse, mais dans le cas des CSH, il régule le cycle cellulaire et entraîne leur mobilisation de manière indirecte, en affectant le micro environnements de la MO (Selig and Nothdurft 1995, Schuettpelez, Borgerding et al. 2014). L'IL-6 est une cytokine multifonctionnelle qui joue un rôle critique dans le système immunitaire ainsi que la myélopoïèse. C'est un régulateur primaire de l'inflammation aiguë et chronique. L'IL-6 est sécrétée par les cellules T et les macrophages en réponse à une infection, un traumatisme, des brûlures et d'autres lésions tissulaires, entraînant une inflammation. L'IL-6 est responsable de la stimulation de la synthèse des protéines en phase aiguë ainsi que de la production de neutrophiles dans la MO (Chiba, Mizoguchi et al. 2018).

Récemment, une étude a montré que la cytokine pro-inflammatoire *Interféron gamma* (INF γ), produit par cellules T et cellules NK, est impliquée dans l'orchestration de la myélopoïèse induite par l'inflammation. Utilisant plusieurs modèles de souris et des tests in vitro, la recherche a montré que l'INF γ induit, de façon préférentielle, la différenciation des monocytes par rapport aux neutrophiles au niveau des progéniteurs myéloïdes. L'infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire, par exemple, induit une monopoïèse chez les souris de type *Wild type*, mais entraîne une augmentation de la production de neutrophiles chez les souris INF γ $-/-$ (de Bruin, Libregts et al. 2012). De plus, l'INF γ induit un état pro-apoptotique antiprolifératif qui empêche les hôtes d'être infectés. Ces résultats établissent un rôle critique pour l'INF γ dans la direction du développement des monocytes contre les neutrophiles pendant l'activation immunitaire (Chiba, Mizoguchi et al. 2018). Les PAMPs peuvent activer directement les CSH par le biais de récepteurs de reconnaissance de formes, en particulier les TLR car les CSH expriment plusieurs TLR. L'activation in vitro de la CSH murins avec des ligands TLR4 ou TLR2 (tels que des molécules avec des fragments diacylé et triacylglycérol, des protéines et des polysaccharides comme LPS, par exemple), respectivement, favorise la prolifération cellulaire et la différenciation en lignée myéloïde d'une manière dépendante de la différenciation myéloïde 88 (MyD88) -dépendante (Nagai, Garrett et al. 2006, Mitroulis, Kalafati et al. 2018).

Lors d'une infection bactérienne systémique (**Figure 1.2**), par exemple, le renouvellement des cellules myéloïdes est considérablement augmenté en raison de la lutte contre les agents pathogènes, et tout ce processus peut causer des dommages à l'hôte car il implique la libération d'enzymes lytiques, de cytokines qui peuvent agir pour contrôler la

coagulation et même des cellules telles que les neutrophiles, les monocytes et les plaquettes. L'hématopoïèse vise à augmenter drastiquement principalement le rendement des neutrophiles (granulopoïèse d'urgence) et/ou de la monocytose (monopoïèse d'urgence), qui jouent un rôle important dans la lutte contre l'agent bactérien (Boettcher and Manz 2017).

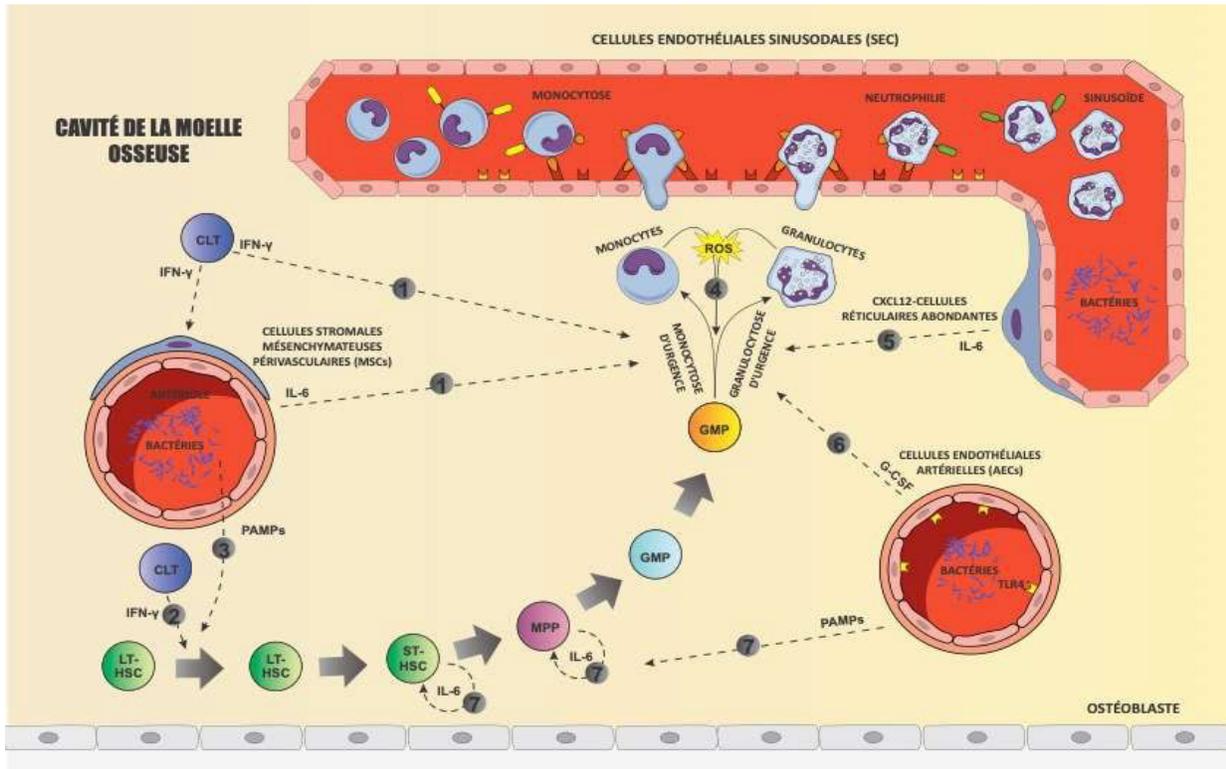


Figure 1.2. La myélopoïèse d'urgence. Il existe de multiples voies distinctes et très probablement complémentaires et celles-ci régissent la manière dont les signaux dérivés du pathogène sont détectés et traduits en hématopoïèse d'urgence. L'IFN γ libéré par les lymphocytes T cytotoxiques CD8 $^+$, L'IL-6 secrétés par les cellules stromales, le GMP, le G-CSF, les PAMPs, le LPS, le CXCL12 et le ROS, ce sont des cytokines et chimiokines qui jouent un rôle important dans la myélopoïèse d'urgence (Boettcher and Manz 2017).

Les infections parasitaires sont également liées à des changements importants dans la lignée myéloïde. Les populations de cellules myéloïdes matures, telles que les macrophages dans divers états d'activation, sont capables d'afficher des caractéristiques immunosuppressives et, par conséquent, jouent un rôle important dans l'équilibre critique entre l'élimination du parasite et la pathogénicité pour les tissus hôtes (Noël, Raes et al. 2004, Van Ginderachter, Beschin et al. 2010). Plusieurs espèces de parasites ont développé des stratégies efficaces pour augmenter la génération de cellules myéloïdes. Dans la MO de souris, le parasite protozoaire intracellulaire *Leishmania donovani* infecte spécifiquement les cellules stromales de type macrophage, ce qui entraîne une production accrue du facteur de croissance hématopoïétique GM-CSF par ces cellules et une augmentation subséquente de la formation de CFU-GM. De plus, la myélopoïèse

extramédullaire est augmentée de 20 à 30 fois dans la rate à des moments ultérieurs de l'infection à *L. donovani* chez les souris BALB/c sensibles, en raison d'une combinaison d'expansion sélective des progéniteurs GM-CFU et de leur prolifération active (Cotterell, Engwerda et al. 2000, Cotterell, Engwerda et al. 2000).

Un autre cas de modulation de la myélopoïèse par des parasites est le cas de *Schistosoma mansoni* qui augmente le nombre de GM-CFU de la MO pendant la phase d'infection aiguë - en corrélation avec l'augmentation des niveaux de M-CSF (ou CSF-1) et d'IL-3 - qui reviennent ensuite à des niveaux normaux au cours de la phase chronique (Clark, Chen et al. 1988, Khalil, Luz et al. 1996). De plus, la présence de niveaux élevés de GM-CFU dans les granulomes hépatiques (plus élevés que dans les fémurs) pendant la phase chronique d'infection, localement pris en charge par le GM-CSF et les protéoglycanes associés à la membrane cellulaire. Par conséquent, pour maintenir une production élevée de cellules myéloïdes, la myélopoïèse est progressivement transférée de la MO aux granulomes au cours de l'infection causée par *Schistosoma mansoni* (Dutra, Rossi et al. 1997). Une autre constatation importante au cours de l'infection à *Schistosoma mansoni* est que la myélopoïèse extramédullaire dans la rate et le foie augmente progressivement tout au long de l'infection (Dutra, El-Cheikh et al. 1998). Une expansion très similaire des cellules spléniques CD11b⁺ Gr-1⁺ est perceptible chez la souris lors d'une infection par d'autres protozoaires, y compris *Trypanosoma brucei* (Guilliams, Movahedi et al. 2009), *Trypanosoma cruzi* (Goñi, Alcaide et al. 2002) et *Plasmodium chabaudi*, ces découvertes fournissent une preuve supplémentaire des mécanismes développés par certains parasites pour biaiser le système hématopoïétique vers la myélopoïèse (Sponaas, Freitas do Rosario et al. 2009).

En général, concernant la myélopoïèse due à une infection parasitaire, à la suite d'une infection aiguë par des parasites, le système immunitaire de l'hôte est confronté à de grandes quantités de motifs moléculaires associés à des agents pathogènes, notamment des ligands TLR, conduisant à l'activation des cellules immunitaires innées et à la production de cytokines inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-1. En combinaison avec la production accrue induite par le parasite de facteurs de croissance myélopoïétiques (tels que GM-CSF, M-CSF, IL-3, etc.), qui induisent un taux accru de myélopoïèse médullaire et extramédullaire, de puissantes *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) sont induites. Les facteurs de l'hôte et des molécules spécifiques du parasite peuvent contribuer à l'accumulation de MDSC. Par la suite, les MDSC sont attirées vers le site d'infection, au moins partiellement sous l'influence des produits excréteurs/sécréteurs du parasite, tels que les oligosaccharides. Cette séquence initiale d'événements immunitaires innés devrait être relativement similaire pour les protozoaires et les

helminthes (Van Ginderachter, Beschin et al. 2010, Schmid, Zimara et al. 2014).

L'immunité adaptative des cellules T ayant lieu dans la phase d'infection aiguë des protozoaires et, dans une moindre mesure, également des helminthes, est de type Th1. La cytokine Th1 IFN γ peut participer à l'induction de MDSC, mais elle est particulièrement importante pour l'activation du potentiel suppresseur de MDSC en induisant la protéine iNOS et une production élevée de NO (MDSC type M1), qui exerce une activité antiproliférative des cellules T. Les conséquences de la suppression induite par la MDSC au cours d'une infection aiguë sont un équilibre entre les effets destructeurs et protecteurs de l'hôte. Les MDSC peuvent inhiber l'immunité protectrice Th1, aggravant potentiellement la maladie, mais d'un autre côté, ces cellules peuvent limiter l'immunopathogénicité associée à l'inflammation et augmenter la survie. Les helminthes, mais aussi certains protozoaires, déforment progressivement l'immunité des lymphocytes T vers une réponse Th2 polarisée lors d'une infection chronique, ainsi que l'apparition de MDSC de type M2. Ces MDSC peuvent stimuler l'adoption d'un profil Th2 sur des cellules T naïves, suggérant que les MDSC sont non seulement immunosuppressives mais aussi immunorégulatrices. Leur capacité suppressive dépend de molécules associées à M2 telles que l'arginase I et le récepteur activé par les proliférateurs de peroxydases γ (PPAR- γ), et pourrait à nouveau inhiber l'immunité protectrice Th2, mais également empêcher la pathogénicité associée à Th2 (Brys, Beschin et al. 2005, Van Ginderachter, Beschin et al. 2010).

1.3 La Leishmaniose

Les parasites du genre *Leishmania* sont des pathogènes intracellulaires obligatoires qui envahissent les cellules hôtes phagocytaires. Environ 30 espèces différentes de phlébotomes peuvent transmettre par leurs piqûres ces parasites de manière anthroponotique (l'infection dans lesquelles l'humain est l'unique réservoir du parasite) ou zoonotique (dont la transmission franchit la barrière d'espèce entre l'humain et un animal).

La leishmaniose affecte les personnes pauvres vivant autour du bassin méditerranéen, en Afrique de l'Est, dans les Amériques et en Asie du Sud-Est, de sorte que la maladie est liée à la pauvreté, aux conditions sociales et est classifiée comme une maladie négligée. Les régions touchées sont souvent éloignées et instables, avec des ressources limitées. La leishmaniose a été signalée, après le paludisme, comme l'une des maladies parasitaires les plus dangereuses. Selon l'OMS, la leishmaniose est l'une des sept maladies tropicales les plus importantes et elle représente un grave problème de santé mondiale. Les caractéristiques cliniques comprennent un large éventail de manifestations tel que la fièvre, l'anémie, l'émaciation, l'hépatosplénomégalie et de suppression de l'immunité, avec différents degrés de gravité et qui dépendent de l'espèce

de *Leishmania* impliquée et de la réponse immunitaire de l'hôte (Ghorbaniand Farhoudi 2018).

Plus de 20 espèces de *Leishmania* sont responsables du développement des trois formes principales de la maladie, parmi eux, 8 sont les plus courants (**tableau 1.2**) :

1) **La leishmaniose viscérale (LV)**, également connue sous le nom de kala-azar. C'est la forme plus grave et mortelle si elle n'est pas traitée. Elle se caractérise par des accès irréguliers de fièvre, une perte de poids, une hypertrophie de la rate et du foie et une anémie.

2) **La leishmaniose cutanée (LC)**, la forme la plus courante de leishmaniose, qui provoque des lésions cutanées, principalement des ulcères, sur les parties exposées du corps, laissant des cicatrices à vie et une invalidité grave ou une stigmatisation.

3) **La leishmaniose mucocutanée**, entraînant une destruction partielle ou totale des muqueuses du nez, de la bouche et de la gorge qui, comme la leishmaniose cutanée, laisse également des cicatrices provoquant un handicap ou une stigmatisation sévère (Torres-Guerrero, Quintanilla-Cedillo et al. 2017, Ghorbaniand Farhoudi 2018).

Tableau 1.2. Les principales espèces de leishmanies responsables de maladies humaines.

Espèces de leishmania	Forme de maladie chez l'homme	Hôtes de réservoir	Vecteurs
<i>L. aethiopicat</i>	Leishmaniose cutanée localisée Leishmaniose cutanée diffuse	Hyrax des roches	<i>Phlebotomus longipes</i> <i>P. pedifer</i>
<i>L. major†</i>	Leishmaniose cutanée localisée	Rongeurs	<i>P. papatassi</i> , <i>P. duboscqi</i>
<i>L. mexicana*</i>	Leishmaniose cutanée localisée	Rongeurs forestiers	<i>Lutzomyia olmeca</i>
<i>L. amazonensis*</i>	Leishmaniose cutanée localisée	Rongeurs forestiers	<i>L. flaviscutellata</i>
<i>L. braziliensis*</i>	Leishmaniose cutanée localisée Leishmaniose mucocutanée	Rongeurs forestiers Animaux péri-domestiques	<i>Psychodopygus</i> <i>Lutzomyia spp.</i>
<i>L. peruviana*</i>	Leishmaniose cutanée localisée	Chien	<i>L. verrucarum</i> , <i>L. pvmenis</i>
<i>L. infantum†*</i>	Leishmaniose viscérale Leishmaniose cutanée localisée	Chiens, chats, renards, chacals	<i>P. perniciosus</i> , <i>P. arias</i>
<i>L. donovani†</i>	Leishmaniose viscérale	Anthroponose humaine Rongeurs Soudan Canins	<i>Phlebotomus argentipes</i> <i>P. orientalis</i> , <i>P. martini</i>

†Espèces du vieux monde, *Espèces du nouveau monde (Claborn 2010, Alemayehu and Alemayehu 2017, Torres-Guerrero, Quintanilla-Cedillo et al. 2017)

Le diagnostic de la leishmaniose combine des signes cliniques avec des tests parasitologiques ou sérologiques (tels que des tests de diagnostic rapide). , dans la leishmaniose cutanée et mucocutanée, les tests sérologiques ont une valeur limitée et l'évaluation clinique avec des tests parasitologiques confirme le diagnostic. En ce qui concerne le traitement, la

thérapie dépend de plusieurs facteurs, tels que le type de maladie, les pathologies concomitantes, les espèces de parasites et la situation géographique. De nombreux médicaments aux propriétés diverses ont leurs propres avantages et limites. Les médicaments de première intention comprennent l'antimoine pentavalent (Sb5 +), qui a longtemps été à la base de la chimiothérapie anti-leishmania. Cependant, l'augmentation de la résistance au médicament a limité ses avantages. Des médicaments de deuxième intention, tels que la pentamidine et l'amphotéricine, sont également utilisés pour traiter cette infection. Cependant, une résistance et une toxicité émergentes ont arrêté l'utilisation de la pentamidine, tandis que l'amphotéricine B peut induire une toxicité aiguë et nécessite une hospitalisation. De plus, l'administration d'amphotéricine B a des coûts élevés. La leishmaniose est une maladie traitable et guérissable, nécessitant donc d'un système immunocompétent car les médicaments ne permettent pas d'éliminer le parasite du corps, d'où le risque de rechute en cas d'immunosuppression. Tous les patients atteints de leishmaniose nécessitent un traitement rapide et complet (Sundar and Rai 2002, Ghorbani and Farhoudi 2018).

Les données épidémiologiques montrent que la plupart des cas de LV surviennent au Brésil, en Afrique de l'Est et en Inde. Il est estimé que 50 000 à 90 000 nouveaux cas de LV surviennent dans le monde chaque année, avec seulement entre 25 et 45% signalés à l'OMS. Elle reste l'une des principales maladies parasitaires avec un potentiel d'épidémie et de mortalité. En 2018, plus de 95% des nouveaux cas signalés à l'OMS sont survenus dans 10 pays: Brésil, Chine, Éthiopie, Inde, Iraq, Kenya, Népal, Somalie, Soudan du Sud et Soudan. Pour la LC, la forme d'infection la plus courante, environ 95% des cas surviennent dans les Amériques, dans le bassin méditerranéen, au Moyen-Orient et en Asie centrale. En 2018, plus de 85% des nouveaux cas de LC sont survenus dans 10 pays: Afghanistan, Algérie, Bolivie, Brésil, Colombie, Iran (République islamique d'), Irak, Pakistan, République arabe syrienne et Tunisie. Il est estimé qu'entre 600 000 et 1 million de nouveaux cas surviennent chaque année dans le monde. Concernant la leishmaniose mucocutanée, plus de 90% des cas surviennent en Bolivie, au Brésil, en Éthiopie et au Pérou (OMS, 2020).

1.3.1 La Leishmaniose cutanée (LC)

La LC est forme la plus courante de leishmaniose, un type dans une catégorie plus large de leishmaniose tégumentaire. De façon général, au cours d'une LC non compliquée, les parasites restent localisés dans les tissus cutanés et conduisent à des ulcères cutanés chroniques à guérison lente. Les lésions de LC sont indolores et peuvent disparaître sans traitement. Cependant, dans le cas d'une guérison lente que peut prendre plusieurs mois, la maladie peut laisser des cicatrices défigurantes (Pearson and Sousa 1996). Il existe une variété considérable des manifestations de la maladie au-delà de la simple identité de l'espèce. Même au sein d'une espèce, il a été difficile de discerner les déterminants qui conduisent à différentes manifestations de la maladie. Ce que l'on sait, c'est que les déterminants génétiques parasitaires ainsi que les séquences génomiques des différentes souches au sein des espèces responsables des différentes formes de la maladie diffèrent en termes d'infection, de réponse immunitaire et de traitement. Ces variations génomiques entre les espèces de *Leishmania* (*L. mexicana* U1103; *L. infantum* JPCM5; *L. braziliensis* M2904; *L. major* LV39; *L. mexicana* M379; *L. donovani* BPK206/0; *L. donovani* LV9) sont dues à des différences dans le nombre de copies des gènes et des événements de duplication chromosomique au moment de la reproduction parasitaire (Rogers, Hilley et al. 2011).

Plusieurs facteurs sont liés au développement de la maladie. La réponse immunitaire de l'hôte joue un rôle clé dans la présentation clinique de la leishmaniose. Les sujets présentant des réponses immunitaires contre l'antigène de *Leishmania*, lorsqu'ils sont infectés par *L. amazonensis*, développent le plus souvent une LC. En revanche, les patients présentant une altération de la réponse des lymphocytes T développent souvent un syndrome anergique appelé leishmaniose cutanée diffuse, caractérisé par de multiples lésions nodulaires pleines de parasites. Ce que l'on sait en fait, c'est que la réponse immunitaire de l'hôte déterminée génétiquement ou le microbiome du vecteur et de l'hôte et les composants du vecteur contribuent tous au développement de la lésion et la guérison de la maladie. En ce moment, ce n'est pas bien définie qui motive ces différences dans les résultats cliniques (Castellucci, Jamieson et al. 2012, Scorza, Carvalho et al. 2017).

Les parasites responsables de la LC établissent une infection intracellulaire des macrophages, la principale cellule hôte, qui héberge la plupart des parasites pendant le processus infectieux. Cependant, des autres cellules tel quel les neutrophiles, les monocytes et les cellules dendritiques peuvent également être infectées par *Leishmania*. Ces événements locaux conduisent finalement à la présentation des antigènes de *Leishmania* aux lymphocytes T pour

initier une réponse immunitaire. Les lésions sont causées par une forte réponse immunitaire au site de l'infection (**Figure 1.3**). De façon générale, les lésions solitaires sont typiques, mais plusieurs lésions peuvent se produire pendant le processus infectieux. Tout commence par une petite papule rouge, qui s'élargit progressivement jusqu'à 2 cm de diamètre avec une ulcération centrale est typique que peuvent être humides et exsudent du pus ou secs avec une croûte. La maladie est considérée comme très importante par l'OMS et nécessite beaucoup de soins. Dans certains cas une maladie chronique peut survenir et il existe un risque de dissémination chez les patients immunodéprimés (Scorza, Carvalho et al. 2017, Torres-Guerrero, Quintanilla-Cedillo et al. 2017, OMS, 2020).

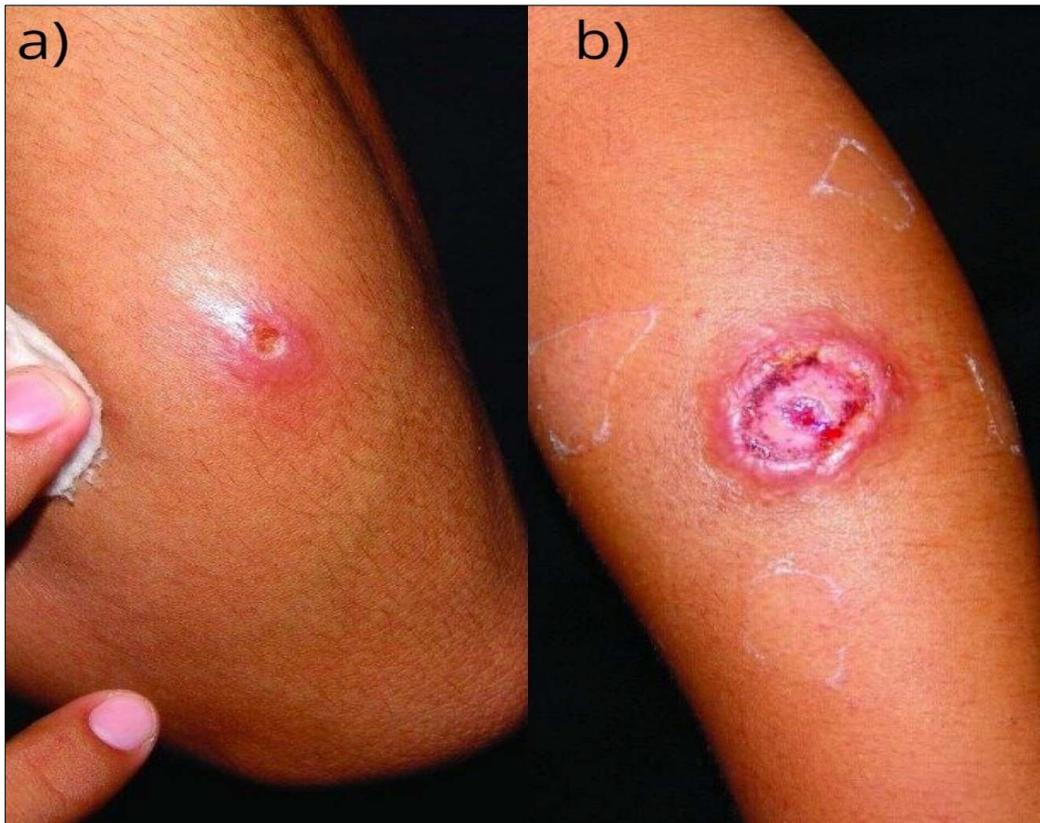


Figure 1.3. Lésion de leishmaniose cutanée (LC). a) Ulcère précoce sur l'avant-bras avec croûte mélicérique. b) Ulcère du membre supérieur avec croûtes et bordures surélevées (Torres-Guerrero, Quintanilla-Cedillo et al. 2017).

1.3.2 Le cycle parasitaire

Le cycle de vie de la *Leishmania* dans le vecteur phlébotome ou chez l'hôte humain, est illustré à la Figure 1.4. L'établissement de l'infection primaire et le développement de la maladie clinique dépendent des facteurs du parasite, de l'hôte et du vecteur dose ou voie d'inoculation, ainsi que le maintien des macrophages dans un état inerte et désactivé. Lorsqu'ils piquent leurs hôtes, les phlébotomes infectés régurgitent les leishmanies promastigotes dans la peau, les parasites envahissent ou sont phagocytés par des cellules phagocytaires locales ou recrutées, principalement des macrophages mais les monocytes, les cellules dendritiques et les neutrophiles peuvent également être infectés. Dans les phagolysosomes des macrophages résidents, les promastigotes deviennent des amastigotes. Dans ce moment, les amastigotes se répliquent par mitose et peuvent ensuite infecter les cellules, soit localement, soit dans des tissus distants. Lorsqu'ils se nourrissent de sang sur un hôte infecté, les phlébotomes naïfs sont infectés par des amastigotes, qui se transforment en promastigotes dans l'intestin du phlébotome. Les parasites donc migrent ensuite vers la trompe du phlébotome complétant ainsi le cycle de vie de la leishmanie (Torres-Guerrero, Quintanilla- Cedillo et al. 2017).

La pathogenèse suit un ensemble complexe d'interactions entre de nombreux facteurs déclenchés par les réponses immunitaires innées et acquises de l'hôte (par exemple, macrophages, neutrophiles, cellules NK, cellules dendritiques). Ces réponses inflammatoires peuvent entraîner une infection asymptomatique ou sous-clinique, une LC transitoire ou une leishmaniose chronique. La guérison clinique s'ensuit lorsque les macrophages deviennent activés à un état leishmanicide (Cotterell, Engwerda et al. 2000, Dayakar, Chandrasekaran et al.2019).

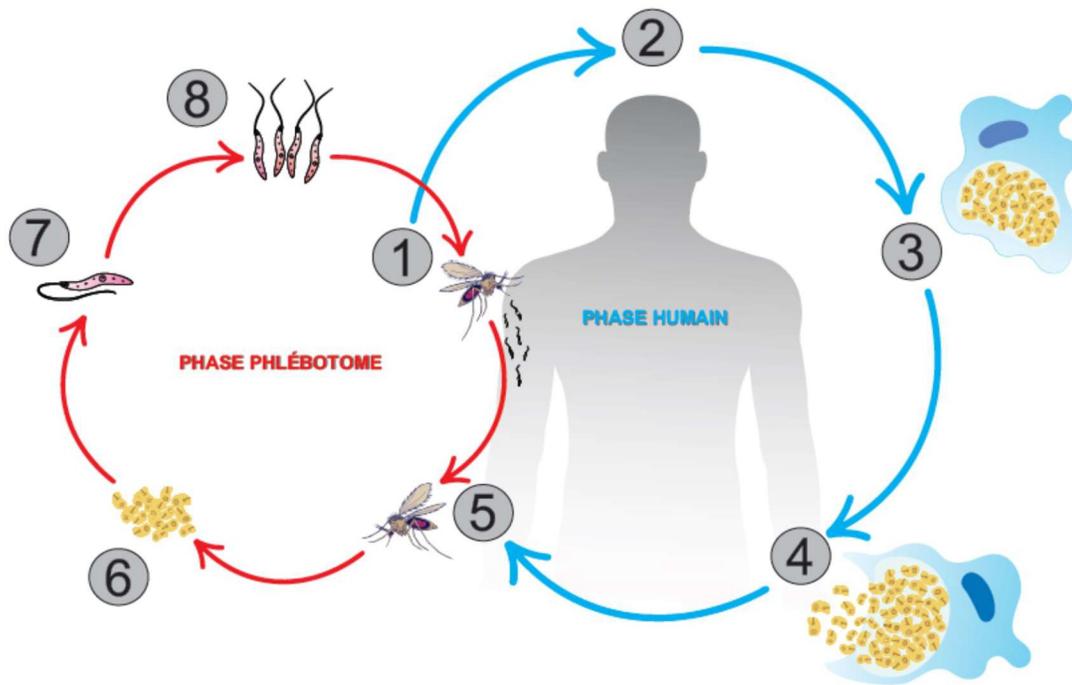


Figure 1.4. Cycle d'infection par *Leishmania* spp. La figure montre les étapes du processus d'infection parasitaire chez l'humain et dans le vecteur : 1- le phlébotome prend un repas de sang et régurgite les promastigotes dans la peau ; 2- les promastigotes sont phagocytés par les macrophages ; 3- les promastigotes se transforment en amastigotes à l'intérieur des macrophages ; 4- les amastigotes se multiplient dans les cellules (y compris les macrophages) de divers tissus ; 5- le phlébotome prend un repas de sang ; 6- ingestion de cellule parasitée ; 7- les amastigotes se transforment en stade promastigote dans l'intestin ; 8- division dans l'intestin et migration vers la proboscide.

1.3.3 La réponse immunitaire cutanée

Il est important de comprendre les réponses immunitaires contre la leishmaniose afin de promouvoir des thérapies pour guérir la maladie. De nombreuses études ont été menées pour identifier des mécanismes de résistance de la leishmaniose, mais ceux dernières n'ont pas été encore complètement élucidés. La réponse immunitaire contre la leishmaniose cutanée résulte d'un changement de l'immunité cellulaire adaptative par de T Helper 1 (Th1) vers T Helper 2 (Th2), avec des augmentations dans la production de certaines cytokines importantes pour l'activation cellulaire, telles que l'interleukine-4 (IL-4) et d'IL-6 et par TNF α , IFN γ , IL-10, IL-12 (ainsi que d'autres cytokines produites dans la réponse immunitaire), en plus de la production de NO, ont un rôle clé dans la destruction et la prévention de la prolifération du parasite dans la cellule (Torres-Guerrero, Quintanilla-Cedillo et al. 2017).

La réponse immunitaire peut varier en fonction de chaque forme clinique. L'immunité humorale n'est pas déclenchée dans la LC. Ce qui est observé est une production d'IL-4 dans les premières semaines après le début de la maladie. Une résolution plus rapide des lésions est médiée par la production d'IFN γ par les lymphocytes T CD8. Dans le cas de *L. major*, les cellules NK jouent un rôle dans l'initiation de la différenciation des lymphocytes T CD4 et dans le contrôle de la réponse initiale et la réponse immunitaire de « résistance » est principalement médiée par une réponse Th1, avec activation des macrophages, dans lequel la production d'IFN γ prédomine et empêche la recrudescence et le développement de formes cliniques chroniques (Scorza, Carvalho et al. 2017). Un autre point important à mentionner est que l'IFN γ attire également des monocytes qui pourraient éventuellement servir de niche répliatif pour le parasite (Bogdan 2020).

En bref, le contrôle de la réplication de *Leishmania* est associé au développement de lymphocytes T spécifiques produisant le TNF α et l'IFN γ . D'autre part, la progression de la maladie a été associée à une réponse de type Th2 et à une plus grande production d'IL-4, d'IL-5, de *transforming growth factor* β (TGF β) et d'IL-10. La LC active chez l'humain a été associée à une réponse immunitaire vigoureuse, qui peut aller d'une réponse immunitaire majoritairement de type 1 à une réponse mixte de type 1 et de type 2 (Scorza, Carvalho et al. 2017, Torres-Guerrero, Quintanilla-Cedillo et al. 2017).

Les gènes codant pour les médiateurs innés de la peau avec la lésion comprennent l'IL-1 β , l'IL-8, la protéine chimio attractive monocyttaire 1 (MCP1) et l'iNOS. Les chimio attractants des lymphocytes T, la chimiokine (motif C-X-C) ligand 9 (CXCL9) et CXCL10, sont les deux gènes les plus régulés à la hausse dans les lésions LC par rapport à la peau saine dans une

étude (Novais, Carvalho et al. 2015, Scott and Novais 2016). Les neutrophiles jouent un rôle important dans l'infection car, en plus d'agir comme cellules hôtes du parasite (Ribeiro-Gomes and Sacks 2012), ils favorisent également une augmentation du recrutement des CD dépendant du ligand 3 CC-chimiokine (CCL3), et l'expression de marqueurs apoptotiques sur les neutrophiles, favorisant leur phagocytose des parasites, préférentielle par les CD. La diminution consécutive de l'activation des DC réduit la réponse de type Th1 et inhibe la présentation croisée pour l'activation des lymphocytes T CD8 + (Scott and Novais 2016). L'activité de l'arginase, une enzyme exprimée à la fois par les macrophages alternatifs et par les neutrophiles, est également significativement régulée à la hausse dans les lésions LC. Dans le cas de *L. brasiliensis*, après avoir rencontré des parasites, les macrophages dérivés de monocytes (MDM) augmentent l'expression de CXCL8, CCL2 et CXCL9 *in vitro*, des chimiokines qui recrutent des neutrophiles, des monocytes et des cellules T activées, respectivement. Tout ce processus de formation de cytokines peut exacerber et contribuer à la formation de lésions causée par une forte réponse avec une production accrue de chimiokines et une production élevée d'anion superoxyde dans le but d'éliminer le parasite (Giudice, Vendrame et al. 2012).

La réponse immunitaire classique dans la LC commence par les neutrophiles, où tôt après l'infection par les parasites, libèrent les *neutrophil extracellular traps* (NETs) et tuent les promastigotes (NETosis). Les neutrophiles vivants ou nécrotiques peuvent également activer les macrophages infectés et induire le contrôle des parasites de manière dépendante des ROS. Après leur apoptose dans la peau, les neutrophiles suppriment l'activation des CD et des macrophages, ce qui entraîne une croissance parasitaire et une activation inefficace des cellules Th1 et des cellules T CD8 +. Les monocytes sont également recrutés à partir du sang vers les lésions de *Leishmania* d'une manière dépendante du récepteur CC-chimiokine 2 (CCR2). Contrairement aux neutrophiles, les monocytes sont efficaces pour tuer les parasites *Leishmania* en produisant des ROS. Les monocytes se différencient également en CD, migrent vers les ganglions lymphatiques et favorisent la différenciation des cellules Th1 en produisant de l'interleukine-12 (IL-12). Les Lymphocytes T CD4 Th1 migrent ensuite vers la peau et éliminent les parasites en induisant la production de NO (Scott and Novais 2016).

En raison de ce type de réponse immunitaire, on peut dire que le comportement de la leishmaniose est similaire à celui de la lèpre de telle sorte que LC représente le pôle hyperergique dans lequel les patients ont une réponse cellulaire intense, et à l'autre extrémité du spectre est LC diffuse avec une évolution progressive et généralement une issue fatale. Ces deux extrêmes

du spectre donnent respectivement une réponse positive et négative au test cutané de la leishmania (réaction intradermique du Monténégro) (Torres-Guerrero, Quintanilla-Cedillo et al. 2017).

Dans les modèles murins, comme dans la maladie humaine, les manifestations cliniques chez la souris varient après l'infection par différentes espèces de *Leishmania*. Différentes souches de souris présentent des variations génétiquement programmées de la gravité de l'infection. En particulier, le modèle murin de l'infection à *L. major* a été largement utilisé pour étudier la LC. Les souris BALB / c sont très sensibles à l'infection à *L. major*, développant une réponse des lymphocytes T CD4 + de type Th2, de grandes lésions ulcéreuses locales et éventuellement une dissémination viscérale des parasites. En revanche, les souris C57BL/6, CBA et C3H sont relativement résistantes à *L. major*, la souche la plus répandue, développant une réponse immunitaire cellulaire de type Th1 et de petites lésions qui finissent par se guérir sans dissémination (Scott, Natovitz et al. 1988, Scorza, Carvalho et al. 2017).

Les cellules de type Th1 spécifiques de l'antigène expriment l'IFN γ au contact des cellules présentant l'antigène, qui à leur tour active les défenses microbicides des macrophages infectés pour tuer les parasites intracellulaires. Semblable à l'humain, la pathologie au cours de la LC murine est causée par des dommages à médiation immunitaire. Les souris C57BL/6 déficientes en cellules T CD4 + présentent une pathologie cutanée minimale malgré une charge parasitaire élevée dans l'oreille. De plus, pendant les infections murines à *L. major* et *L. infantum*, il y a une période prolongée de réplication silencieuse du parasite pendant les premières semaines de l'infection, au cours de laquelle aucune pathologie n'est observée. Après environ quatre semaines, l'infiltration des cellules immunitaires coïncide avec le début des changements pathologiques (Belkaid, Mendez et al. 2000, Scott and Novais 2016, Scorza, Carvalho et al. 2017).

1.3.4 ***Leishmania major* : souche transitoire vs souche persistente**

Comme décrit dans la section précédente, l'infection à *L. major* provoque d'importantes lésions ulcéreuses. Les lésions formées par l'infection montrent des charges parasitaires modérées dans les biopsies du bord de l'ulcère et les lésions ont tendance à s'auto-guérir en 2 à 6 mois (Sacks and Noben-Trauth 2002). L'infection récidivante est une forme rare et chronique de leishmaniose tégumentaire qui peut survenir après une primo-infection à *L. major*. La maladie se manifeste à des périodes variables après la résolution d'une infection primaire à LC, parfois plusieurs années plus tard. Pour des raisons peu claires, les lésions naissantes se réactivent

généralement autour de la frontière ou à proximité des cicatrices de lésions de *Leishmania* précédemment cicatrisées. Les lésions sont généralement indolores et contiennent des infiltrats inflammatoires granulomateux mais ne s'ulcèrent pas. Les amastigotes sont rarement observés au sein des lésions par microscopie et les espèces parasitaires infectieuses ne peuvent être confirmées que par PCR. À l'instar d'autres manifestations récurrentes ou disséminées, cette forme de leishmaniose peut être difficile à traiter (Scorza, Carvalho et al. 2017).

De nombreuses études ont été menées pour comprendre l'infection par *L. major* et surtout ses mécanismes de résistance. En laboratoire, la plupart des génotypes de souris contrôlent également l'infection à *L. major*, qui est généralement initiée par l'inoculation à l'aiguille d'un grand nombre de parasites dans des sites sous-cutanés, tels que le coussinet plantaire l'oreille ou la base de la queue. Cependant, certaines souches - telles que les souris BALB/c - ne parviennent pas à contrôler l'infection et développent des lésions non cicatrisantes et disséminées, associées à une réponse Th2 prédominante et une maladie systémique. Les chercheurs croient que ces souris sont un modèle de formes persistantes de la maladie humaine - comme le kala-azar ou la leishmaniose cutanée diffuse - qui sont associées à une infection par d'autres espèces de *Leishmania* (Sacks and Noben-Trauth 2002).

Pour une meilleure compréhension des mécanismes de chronicité des infections à *L. major* chez l'humain, des études récentes ont utilisé deux souches : *L. major* Seidman (*LmSd*) associée aux formes chroniques de leishmaniose (souche persistente) et *L. major* Friedlin (*LmFd*) associée aux formes autocicatrisantes (souche transitoire). En utilisant une infection à faible dose avec une souche de *LmSd* isolée d'un patient présentant des lésions cutanées chroniques, les souris B/6, malgré une forte réponse Th1, ne parviennent pas non plus à guérir leurs lésions cutanées ou à contrôler efficacement la charge parasitaire tissulaire (Charmoy, Hurrell et al. 2016).

Bien que la production élevée d'IL-10 par les cellules T favorise l'infection dans ce modèle, cela ne semble pas être une condition suffisante pour l'évolution du phénotype non cicatrisant puisque les souris déficientes en IL-10 ou les souris traitées avec l'anticorps anti-IL-10R ont encore des parasites persistants qui, en l'absence de régulation de l'IL-10, produisent une pathologie encore plus sévère du site cutané. Cette étude a identifié que l'IL-1 β dépendant de l'inflammasome Nlrp3 et le recrutement persistant des neutrophiles vers le site inflammatoire, seraient les composants essentiels de la non-guérison (Charmoy, Hurrell et al. 2016).

Concernant la migration cellulaire vers le site d'infection, les travaux ont montré une forte augmentation de la population myéloïde (CD11b+). Cette population a été classée sur la base de

leur expression de Ly6C et Ly6G, comme suit : Ly6C^{int} Ly6G⁺ (neutrophiles) ; Ly6C-Ly6G⁻ (macrophages cutanés et CD principalement résidents) ; Ly6C^{hi}Ly6G⁻ et Ly6C^{int}Ly6G⁻ (proportions variables de monocytes inflammatoires et de macrophages et CD dérivés de monocytes). À partir de 4 semaines après l'inoculation de LmSD, une expansion des cellules CD11b⁺ a lieu, qui n'est pas observée dans les oreilles de souris infectées par *LmFn*. Les neutrophiles représentaient principalement la différence dans l'infiltrat de cellules CD11b⁺ à 4 semaines et continuent à être recrutés tout au long de la phase chronique dans les oreilles infectées par *LmSd*, alors qu'ils restaient une population mineure de cellules inflammatoires dans le site *LmFn*. Les populations de Ly6C^{hi}, Ly6C^{int} et Ly6C-CD11b⁺ ont également augmentées de manière significative dans les oreilles infectées par *LmSd* jusqu'à la semaine 7 (Charmoy, Hurrell et al. 2016).

Les populations des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ dans le site de l'infection ont également été évaluées et ils ont identifié que le nombre de lymphocytes T CD4⁺ présents dans le site a commencé à augmenter 4 semaines après l'infection par les deux souches. Cependant, un nombre significativement plus élevé de lymphocytes T CD4⁺ a été observé à tous les moments ultérieurs dans les oreilles infectées par *LmSd* et est resté élevé (environ 15 000 cellules / oreille) tout au long de la phase chronique. Les CD8⁺ T ont commencé à augmenter à partir de la semaine 5 après l'infection et ont de nouveau été trouvés en plus grand nombre à tous les moments ultérieurs dans les oreilles infectées par *LmSd*, stabilisés à env. 5000 cellules / oreille pendant la phase chronique (Charmoy, Hurrell et al. 2016). Ces résultats révèlent que, entre autres facteurs, le mécanisme de résistance de *L. major* est lié à une production élevée de cellules de la lignée myéloïde qui migrent vers le site de l'infection, de sorte que la compréhension de tout ce processus depuis le début de la production cellulaire est d'une importance capitale pour la caractérisation de la réponse immunitaire cellulaire, pour comprendre les mécanismes de résistance ainsi que révéler de nouvelles cibles potentielles pour les thérapies immunitaires pour favoriser la guérison de la leishmaniose cutanée chez l'homme.

1.3.5 La Leishmaniose et l'hématopoïèse

Les altérations de l'hématopoïèse sont courantes dans les maladies infectieuses par des pathogènes viraux, bactériens et protozoaires. L'hématopoïèse est supprimée, par exemple, lors d'une infection expérimentale par le cytomégalovirus murin, le virus de la leucémie murine et *Salmonella typhimurium* (Busch, Mutter et al. 1991, Peterson, Madonna et al. 1992, Hamburger

and Chen 1993). En outre, une augmentation de l'hématopoïèse a également été notée dans le paludisme expérimental et la schistosomiase (Asami, Ohashi et al. 1992, Dutra, Rossi et al. 1997). Dans le cas de la leishmaniose, plusieurs études montrent une activation de l'hématopoïèse, en particulier dans le cas de LV, causée par *Leishmania donovani* (Abidin, Hammami et al. 2017, Hammami, Abidin et al. 2017, Pinto, Brown et al. 2017). La LV, considérée comme une infection chronique, peut conduire à une insuffisance médullaire acquise, où les HSPC et le stroma de la MO ne sont plus en mesure de soutenir l'homéostasie sanguine. Les mécanismes liés à cette insuffisance médullaire sont mal connus, mais la pathologie suggère clairement que l'infection parasitaire modifie profondément l'hématopoïèse normale : la LV est généralement associée à hépatosplénomégalie, l'hématopoïèse extramédullaire, pancytopenie et immunosuppression (Cotterell, Engwerda et al. 2000, Kaye and Scott 2011, Matnani and Ganapathi 2016).

Dans le stroma de la MO, les CSH et les cellules progénitrices sont associées à un réseau de cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques. Ces éléments stromaux peuvent réguler l'organisation spatiale discrète des cellules progénitrices *in vivo*, de sorte que la régulation de l'activité progénitrice dépend également des cytokines et des composants de la matrice extracellulaire sécrétés par le stroma et les modifications de l'activité stromale se produisent dans la leishmaniose. Nombreuses cytokines avec une activité hématopoïétique reconnue produites dans une réponse immunitaire à une infection par LV par exemple, comme le GM-CSF, le G-CSF, le facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF), l'IL-3, IL-1, IL-7, ligand Flt-3, facteur de cellules souches (SCF), le (TNF- α), le (TGF- β) et protéine inflammatoire des macrophages-1 α (MIP-1 α), sont responsables de ces modifications et de la production de lignées cellulaires spécifiques qui vont combattre l'infection qui peuvent être à la fois aux stades aigu et chronique (Cotterell, Engwerda et al. 2000, Cotterell, Engwerda et al. 2000).

Les CSH sont activées en réponse au stress causé par l'infection par *L. donovani* qui adaptent la production des cellules impliquées dans la lutte contre le parasite dans la MO. *L. donovani* induit une expansion des CSH et stimule leur différenciation vers des progéniteurs myéloïdes non classiques avec un phénotype régulateur, ainsi, l'hématopoïèse contribue à la pathogénèse de la LV de sorte qu'une diminution de l'expansion des CHS entraîne une diminution de la charge parasitaire. Par ailleurs, les monocytes dérivés en présence de facteurs solubles de l'environnement de MO infectée sont plus permissifs à l'infection par *Leishmania* (Abidin, Hammami et al. 2017). Les macrophages sont les cellules cibles de la *leishmania* mais d'autres cellules telles que les monocytes, les CD et les neutrophiles participent à la réponse immunitaire de sorte que la myélopoïèse est fortement activée dans l'infection. L'étude de Cotterell et al, qui a analysé les altérations de l'activité hématopoïétique observées chez les souris BALB/c infectées par *L. donovani* a révélé que les monocytes dérivés de la MO sont essentiels pour une clairance efficace des parasites et sont susceptibles d'être activés à un état leishmanicide par l'environnement à prédominance de cytokines Th1 (IFN γ , IL-12 (p70), TNF- α par exemple). Les parasites sont initialement contenus dans la rate et la MO, avec une réplication limitée au cours des 28 premiers jours de l'infection. Cependant, après cette période, les parasites se multiplient et maintiennent par la suite une infection persistante (Cotterell, Engwerda et al. 2000).

L'analyse de l'activité des cellules progénitrices hématopoïétiques dans la rate et la MO à ce moment critique de l'infection indique une augmentation marquée du nombre de cellules progénitrices et de l'activité proliférative. Dans la rate, cet état favorise la myélopoïèse, en ce que le nombre d'unités formant une colonie - granulocytes, monocytes (CFU-GM) a augmenté de 20 à 30 fois, comparé à des augmentations de 5 à 10 fois du nombre de rafales formant unité-érythrocyte (BFU-E) et une unité formant une colonie-granulocyte, érythrocyte, monocyte, mégacaryocyte (CFU-GEMM). Le début de l'activité hématopoïétique et l'expansion du parasite dans la rate et la MO suggèrent que les 2 événements peuvent être liés. La même étude a montré que les macrophages stromaux sont une cible pour l'infection à *L. donovani in vivo* et *in vitro*, et qu'en conséquence de l'induction sélective de la production de GM-CSF et de TNF- α , les macrophages stromaux infectés soutiennent préférentiellement des niveaux accrus de myélopoïèse (Cotterell, Engwerda et al. 2000, Cotterell, Engwerda et al. 2000).

Des modifications de l'érythropoïèse ont également été observées dans des études récentes sur la LV. Une étude réalisée avec des souris C57BL/6 pour explorer la base de l'anémie à la suite d'une infection par *L. donovani*, a montré que quelques jours après l'infection, les

souris présentent une dysérythropoïèse médullaire, avec une réduction des érythroblastes TER119 + CD71 - / +. La réduction de l'érythropoïèse médullaire coïncide avec la perte des macrophages stromaux de la MO et avec une réduction des cellules stromales exprimant CXCL12 médiée par la réponse à l'infection par des cellules TCD4 + (Preham, Pinho et al. 2018). Une autre étude utilisant un modèle d'infection par *L. infantum in vitro* a reporté que le parasite modifie le profil phénotypique de la descendance hématopoïétique; en modifiant l'expression des marqueurs de surface des cellules différenciées de sorte que les cellules de MO encore indifférenciées sont capables de phagocyter la *L. infantum* et de répondre à l'infection par la production de cytokines en induisant un profil différencié d'hématopoïèse, favorisant la prolifération des cellules de la lignée érythroïde et modifiant les profils phénotypiques de leur descendance (Carvalho-Gontijo, Moreira et al. 2018). Un autre point important à propos de l'érythropoïèse est que le parasite utilise le métabolisme du fer afin de surmonter les défenses liées au fer de l'hôte, conduisant à une anémie (Niu, Li et al. 2016, Laranjeira-Silva, Hamza et al. 2020).

Les cellules T peuvent également être trouvées dans la MO. Des études récentes ont indiqué des altérations des lymphocytes T de la MO chez des patients souffrant de syndromes d'échec et dans des modèles expérimentaux d'anémie aplasique (Dufour, Corcione et al. 2003, Lin, Karwan et al. 2014). L'infection à *L. donovani* chez la souris, entraîne les LT-HSC en prolifération active au détriment des cellules en quiescence, conduisant à un épuisement fonctionnel. L'augmentation des cellules T CD4 + productrices d'IFN γ avec une fonction effectrice résidente dans la MO des souris infectées, serait responsable de l'épuisement de CSH de sorte que des modifications du nombre de T CD4 + et une augmentation des cytokines inflammatoires en réponse à une infection par *L. donovani*, peuvent provoquer une altération de longue durée de la fonction hématopoïétique pendant l'infection (Pinto, Brown et al. 2017).

En ce qui concerne la LC, les effets sur la MO et dans l'hématopoïèse sont peu connus. Une étude publiée en 1986 qui utilisait des souris BALB/c qui sont très sensibles à l'infection à *L. major* par rapport aux souris C57BL / 6 (résistantes) a révélé que, que l'infection par *L. major* est associée à une forte augmentation de la myélopoïèse avec augmentation accrue du nombre de cellules précurseurs de la lignée myéloïde chez la souris BALB/c hautement sensible en unité formant colonie en culture (CFU-C) dans la rate et la MO (Mirkovich, Galelli et al. 1986). Une autre étude qui a analysé la production d'IL-3 et la myélopoïèse dans la rate chez les souris BALB/c, a montré une corrélation directe entre la sensibilité à l'infection à *L. major* et la capacité des lymphocytes T spléniques de souris infectées à produire un niveau continu élevé d'IL-3 de

sorte que la myélopoïèse accrue pendant les derniers stades de l'infection viscéralisante avec *L. major* chez les souris BALB/c a été suggérée pour fournir des «cibles sûres» pour la réplication du parasite et être principalement une conséquence de l'augmentation de la production d'IL-3 par les cellules Th2 (Lelchuk, Graveley et al. 1988).

On sait peu de choses sur les effets de l'infection causée par la LC sur les CSH et sur la réponse hématopoïétique à l'infection en général. Dans le cas d'une infection chronique, l'ensemble du processus de réponse immunitaire peut agir directement sur les CSH et, par conséquent, sur la production de cellules sanguines, de sorte que la compréhension des effets d'une infection chronique par la leishmaniose cutanée devient une cible importante pour comprendre la réponse immunitaire à la maladie, le parasite, l'activation du CSH par les cytokines inflammatoires chroniques et les effets que cette stimulation peut avoir sur l'hématopoïèse. Comprendre l'ensemble de ce processus complexe ouvre des perspectives même pour de nouvelles thérapies pharmacologiques ou immunologiques.

2 PROBLEMATIQUE ET OBJECTIVES

La leishmaniose, causée par différentes espèces de *Leishmania*, est l'une des six maladies déclarées prioritaires par l'OMS. De manière générale, plusieurs études ont été menées pour mieux comprendre la réponse immunitaire au parasite afin de favoriser le développement de nouveaux médicaments qui agissent pour contrôler et éradiquer la maladie dans le monde (OMS, 2020).

De nombreuses études ont été menées pour comprendre la réponse immunitaire à la LV, qui est la forme la plus sévère de la maladie, de sorte que la compréhension des effets sur les CSH et la réponse immunitaire nous fournissent des données importantes sur la relation hôte-pathogène et sur les possibilités ouvertes de thérapies qui peuvent aider à réduire les cas de décès, étant donné que la LV est généralement fatale si elle n'est pas traitée. En revanche, dans le cas de la LC, les effets sur la CSH sont peu connus car la plupart des études prennent en compte la réponse immunitaire *in situ*. Non des moindres, la LC provoque des blessures qui peuvent devenir chroniques, bien que non mortelle, la maladie peut entraîner un handicap et laisser des cicatrices permanentes qui conduisent à la stigmatisation et aux préjugés sociaux.

La présente étude est exploratoire, et vise à comprendre les mécanismes immunitaires de la réponse contre une infection par *Leishmania major* dans un modèle murin, en vérifiant la cinétique des CSH et la production des cellules myéloïdes que générées dans la MO, ainsi que la production de cellules myéloïdes qui sont liées à la persistance de la maladie dans des modèles murins, ainsi que élucider le mécanisme d'action des cytokines et chimiokines inflammatoires qui font partie de ce processus. Dans un modèle d'infection à *Leishmania donovani* (LV), l'activation des CSH favorise l'infection par l'augmentation de la production de monocytes inflammatoires, cibles privilégiées du parasite (Abidin, Hammami et al. 2017). Nous avons donc émis l'hypothèse que *L. major*, pourrai également activer les CSH, précurseurs et cellules myéloïdes pour favoriser la réplication du parasite. Notre objectif général est de mieux comprendre les effets des infections chroniques sur les CSH, ainsi que la myélopoïèse d'urgence, en utilisant trois objectifs spécifiques :

- 1) Évaluer l'activation des CSH lors d'une infection par *L. major* chez la souris;
- 2) Identifier les cellules immunitaires impliquées dans le processus d'activation;
- 3) Obtenir des données et des indices qui montrent que la présence du parasite dans la MO est nécessaire pour une myélopoïèse adaptative.

Pour répondre à nos objectifs, nous avons utilisé le modèle d'infection intradermique des oreilles de souris C57Bl/6 avec deux souches différentes de *L. major* : *L. major* Friedlin et *L. major* Seidman. La première est associée à une cicatrisation spontanée chez les souris C57Bl/6, tandis que la deuxième provoque des lésions persistantes.

Pour l'identification du profil cellulaire impliqué dans la réponse immunitaire, nous avons utilisé la cytométrie en flux pour quantifier les populations cellulaires et nous avons analysé la MO, la rate et la peau de l'oreille infectée à différents moments après l'infection (1, 7, 14 et 56 jours). La formation de colonies myéloïdes à partir de précurseurs de la MO a été suivie pour évaluer l'activité myélopoïétique, tandis que la charge parasitaire dans les oreilles et dans la MO a été déterminée à l'aide du test de dilution limite. Des surnageant de cellules de la MO ont été prélevés sur des souris naïves et infectées par *L. major* et analysés par dosage multiplex pour quantifier les cytokines et les chimiokines. Des souris mâles et femelles, en équilibre par sexe, ont été utilisées pour les analyses.

3 ARTICLE

Titre en français : L'infection persistante par le parasite cutané *Leishmania major* favorise la myélopoïèse adaptative

Auteurs: Fabio Luiz Bandeira Ferreira^{1,2}, Olivier Séguin¹, Albert Descoteaux¹, Krista Heinonen^{1,2*}

Affiliation des auteurs : ¹Institut national de la recherche scientifique, Centre Armand Frappier Santé Biotechnologie, Laval, QC, Canada; ²Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines – Fondation Courtois (CERMO-FC), Montréal, QC, Canada.

Contribution des auteurs :

FLBF : Analyse formelle, Investigation, Visualisation, Rédaction -

original

OS : Analyse formelle, Investigation

AD : Conceptualisation, Ressources, Rédaction – révision & édition

KMH : Conceptualisation, Acquisition de financement, Supervision, Visualisation, Rédaction –révision & édition

Titre du journal : Microorganisms (soumis le 31 Décembre 2021 / accepté le 26 Février 2022 /publié le 28 Février 2022)

3.1 Résumé

Les cellules souches/progénitrices hématopoïétiques (HSPC) sont responsables de la génération de la plupart des cellules immunitaires tout au long de la vie de l'organisme. L'inflammation peut activer les HSPC de la moelle osseuse, entraînant une myélopoïèse accrue pour remplacer les cellules, telles que les neutrophiles, qui sont attirées par les tissus enflammés. Nous avons précédemment montré que l'activation de HSPC favorise la persistance et l'expansion du parasite dans la leishmaniose viscérale expérimentale grâce à la production accrue de monocytes permissifs. Cependant, il n'est pas clair si la présence du parasite dans la moelle osseuse était nécessaire pour une myélopoïèse adaptée à l'infection. Nous avons donc émis l'hypothèse que les formes persistantes de *Leishmania major* (leishmaniose cutanée) pourraient également activer les HSPC et les précurseurs myéloïdes dans le modèle murin C57Bl/6 d'infection intradermique de l'oreille. L'afflux accru de cellules myéloïdes vers le site de la lésion correspondait à une augmentation des HSPC à polarisation myéloïde dans la moelle osseuse et la rate chez les souris infectées par une souche persistante de *L. major*, ainsi qu'à une augmentation des monocytes et des cellules myéloïdes dérivées de monocytes de la rate chez les souris infectées par une souche persistante de *L. major*. L'analyse de l'environnement des cytokines et des chimiokines de la moelle osseuse a révélé une réponse atténuée à l'interféron de type I et de type II chez les souris infectées par la souche persistante par rapport à la souche avec guérison spontanée, tandis que les deux souches induisaient une régulation positive rapide des cytokines myélopoïétiques, telles que l'IL-1 β et GM-CSF. Ces résultats démontrent que la présence de l'agent pathogène dans la moelle osseuse n'est pas nécessaire à l'induction d'une myélopoïèse adaptée à l'infection et soulignent l'importance de prendre en compte les altérations de la production de la moelle osseuse lors de l'analyse in vivo des interactions hôte-pathogène.

Mots clés: Cellule souche/progénitrice hématopoïétique, *Leishmania major*, leishmaniose cutanée, myélopoïèse, inflammation

3.2 Introduction

Hematopoietic stem cells (HSC) are the architects of definitive hematopoiesis, that is, the production of blood cells that occurs continuously throughout the life of an organism. While long-term repopulating HSCs remain mostly dormant, more mature multipotent progenitor cells (MPP) proliferate and ultimately give rise to terminally differentiated mature blood cells: red blood cells that allow efficient transport of oxygen; megakaryocytes and their platelet offspring that interact with the blood vessels and soluble factors to regulate coagulation; and white blood cells of the innate and acquired immune system that defend the organism against pathogens (Hofer and Rodewald 2018, Laurenti and Gottgens 2018). Hematopoiesis occurs in the adult bone marrow (BM) where HSCs reside within a specialized microenvironment, or niche. The BM niche is essential for the regulation of many stem cell activities, including self-renewal, mobilization, and lineage differentiation (Asada, Takeishi et al. 2017, Takizawa and Manz 2017, Batsivari, Haltalli et al. 2020).

Blood cell production is well balanced in the absence of external stressors, with the various subsets of MPP each contributing to the BM output. However, this equilibrium shifts toward myelopoiesis during infection, either in response to pro-inflammatory cytokines or directly via the recognition of pathogen-associated molecular patterns by the progenitor cells (Essers, Offner et al. 2009, Pietras, Mirantes-Barbeito et al. 2016, Boettcher and Manz 2017, Capitano 2019, Chavakis, Mitroulis et al. 2019, Schultze, Mass et al. 2019). This BM response to inflammation, also known as emergency myelopoiesis, involves transient proliferation and expansion of MPP and short-term HSC populations. More specifically, myeloid-biased MPP subpopulations, such as MPP2 (biased toward platelet and red blood cell differentiation) and MPP3, tend to increase in size, while lymphoid production is suppressed and the number of Flt3⁺ lymphoid-biased MPPs goes down. In the case of systemic bacterial infections or the administration of lipopolysaccharide, inflammation-adapted myelopoiesis tends toward granulocyte differentiation in response to the secretion of Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) by BM endothelial cells (Boettcher, Gerosa et al. 2014, Boettcher and Manz 2017). However, its role in parasitic infections remains less clear.

Visceral leishmaniasis caused by the parasites *Leishmania donovani* and *L. infantum* is a chronic infection, associated with hematological changes, such as anemia and pancytopenia, that indicate impaired BM function. BM is also a well-established site of parasite expansion. Recruitment of CD4⁺ T cells to the BM resulted in increased HSC proliferation and functional exhaustion (Pinto, Brown et al. 2017) as well as suppression of erythropoiesis in the mouse model

of visceral leishmaniasis (Preham, Pinho et al. 2018). We have also shown that *L. donovani* promotes the production of monocytes and monocyte-derived myeloid cells that not only suppress T cell responses but are also more permissive to infection, thus promoting parasite expansion (Abidin, Hammami et al. 2017, Hammami, Abidin et al. 2017). Monocytes have been long since proposed to act as safe targets for *Leishmania* (Mirkovich, Galelli et al. 1986), and the ability of the parasite to not only stimulate monocyte recruitment and production but also to promote the differentiation of cells with impaired microbicidal function (Abidin, Hammami et al. 2017, Hammami, Abidin et al. 2017) further supports this idea.

Generating safe harbors for replication is likely not restricted to visceral leishmaniasis, but may also occur in cutaneous leishmaniasis (Mirkovich, Galelli et al. 1986). *L. major*, one of the predominant species causing cutaneous leishmaniasis, most often results in a transient skin lesion that heals within 2-8 months (Burza, Croft et al. 2018). However, some patients have persistent, non-healing lesions with severe inflammation and scarring. The mechanisms underlying immune resistance in persistent *L. major* infection are still incompletely understood. It is possible to address this issue by comparing the response to two different strains of *L. major* in C57BL/6 mice: *L. major* Seidman (*LmSd*) strain that causes non-healing and disseminating lesions; and *L. major* Friedlin (*LmFn*) strain that causes self-healing lesions after intradermal injection. Both strains evoke a strong CD4⁺ Th1 response in the skin lesion, but the non-healing strain also promotes a strong migration of cells of myeloid origin to the lesion (Charmoy, Hurrell et al. 2016, Lee, Charmoy et al. 2018).

Based on the association of myeloid recruitment with the establishment of persistent lesions, we thus hypothesized that infection-adapted myelopoiesis could play a role also in cutaneous leishmaniasis. We found that infection of C57BL/6 mice with the non-healing strain resulted in the expansion of MPPs in BM and spleen and promoted the increase of myeloid cell numbers not only in the skin lesion but also in the spleen. Numbers of BM CD19⁺ B lymphocytes were decreased in mice infected with either strain. Interestingly, the BM cytokine responses were stronger in mice infected with the self-healing strain, and this was especially apparent at the later time points, where interferon-responsive chemokines were significantly decreased in mice with persistent lesions. Put together, our results demonstrate that the presence of the pathogen in the BM is not necessary for the induction of infection-adapted myelopoiesis, but that a persistent infection with a cutaneous pathogen can also influence BM function

3.3 Materials and Methods

3.3.1 Experimental animals and parasites

All experimental mice were wild-type littermates from our breeding colonies on C57BL/6 background and maintained under specific pathogen-free conditions in ventilated racks. Both male and female mice were used for the study with sex- and age-matched controls. For infections, mice were transferred to the biosafety level 2 sector at the animal facility of INRS (Laboratoire national de biologie expérimentale, LNBE). Promastigotes of *L. major* NIH S (MHOM/SN/74/Seidman) and *L. major* (MHOM/IL/80/Friedlin) were cultured at 26°C in *Leishmania* medium (M199 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100 µM hypoxanthine, 10 mM HEPES, 5 µM hemin, 3 µM biopterin, 1 µM biotin, and penicillin-streptomycin). Infectious-stage metacyclic promastigotes were isolated from stationary cultures (5–6 days) by density gradient centrifugation and mice were then inoculated with 1×10^3 metacyclic promastigotes in the ear dermis by intradermal (i.d.) injection in a volume of 20 µl. Lesion progression and weight loss were monitored weekly, and mice were euthanized under CO₂ asphyxiation at indicated time points (**Figure 3.1A**). There were a total of 48 mice infected with *LmSd* (25 males and 23 females), 46 mice infected with *LmFn* (24 males and 22 females), and 20 naïve controls (10 males and 10 females) analyzed at the time points presented in Figures 2-6. Analyses of parasite burden from two additional groups of mice was added for days 42 and 84 to evaluate the establishment of early infection, and to confirm remission of the self-healing parasite, respectively.

3.3.2 Ethics statement

All procedures were in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines and approved by the Comité institutionnel de protection des animaux of the INRS (CIPA # 1706-07).

3.3.3 Processing of ear tissues and evaluation of parasite burden

Infected mouse ears were collected and incubated in 70% ethanol for 10 min. The two sheets of infected ear dermis were separated, deposited in DMEM containing 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 0.2 mg/ml Liberase CI purified enzyme blend (Roche Diagnostics Corp.), and incubated for 1.5 h at 37°C. Digested tissue was processed in a tissue homogenizer (Medimachine; Becton Dickinson) and filtered through a 70 µm cell strainer (Falcon Products).

Parasite titrations were performed using tissue homogenates which were serially diluted in 96-well flat-bottom microtiter plates containing *Leishmania* medium (M199 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100 μ M hypoxanthine, 10 mM HEPES, 5 μ M hemin, 3 μ M biopterin, 1 μ M biotin, and penicillin-streptomycin) and cultured at 26°C. The number of viable parasites in each ear was determined from the highest dilution at which promastigotes could be grown out after 7–10 days of incubation. Data are presented as number of parasites per ear. The same assay was performed on freshly harvested BM from infected mice with no parasite growth observed even after 14 days of incubation.

3.3.4 Flow Cytometry

BM, spleen, and cells recovered from the ear dermis from infected and naïve mice were analyzed by flow cytometry. BM was harvested by flushing tibiae and femora in phosphate-buffered saline (PBS) solution and the cells were then passed through a 25-gauge needle to obtain a single cell suspension. Spleens were manually dissociated in PBS. Ear tissue homogenates, prepared as previously described, were filtered in 5mL round bottom polystyrene FACS tubes with 35 μ m nylon mesh-screen filter before flow cytometry staining. PBS was supplemented with 0.1% bovine serum albumin (BSA) and 0.5mM ethylene-diaminetetra-acetic acid (EDTA) for flow cytometry staining, and non-specific staining was blocked using unlabeled anti-CD16/CD32 antibody (Fc block). Antibody combinations were modified from previously published studies, including by our group (Socolovsky, Nam et al. 2001, Rose, Misharin et al. 2012, Pietras, Reynaud et al. 2015, Abidin, Hammami et al. 2017). Please see **Table S3.1** for a complete list of antibodies. Cells were fixed with 2%PFA in PBS prior to acquisition of samples using a 4-laser LSR Fortessa (BD Biosciences, Mountain View, CA). Data were analyzed using FACS DiVa software (version 8.1).

3.3.5 Bone marrow cytokine/chemokine analysis

Bone marrow cell supernatants were collected from naïve, *L. major* Seidman- and *L. major* Friedlin infected mice on day 1 and eight weeks (56 days) post-infection by harvesting cells from both hind legs by flushing with 2 ml PBS, followed by centrifugation. The supernatants (diluted bone marrow plasma) were transferred in clean tubes, identified and aliquoted, and then kept frozen until analysis. Cytokine and chemokine concentrations were determined by the Mouse Cytokine 44-Plex Discovery Assay (Eve Technologies, Calgary, AB) from duplicate analysis of eight mice per group (4 males and 4 females). Please see **Table S3.2** for a complete list of

cytokines and chemokines in the assay. Heat map was generated for the mean values for each condition, paired and adjusted by sex, using the Heatmapper online tool (Babicki, Arndt et al. 2016).

3.3.6 Statistical analysis

Statistical significance was determined using unpaired ANOVA (for multiple comparisons) or two tailed student's t test and the GraphPad Prism software (v.7).

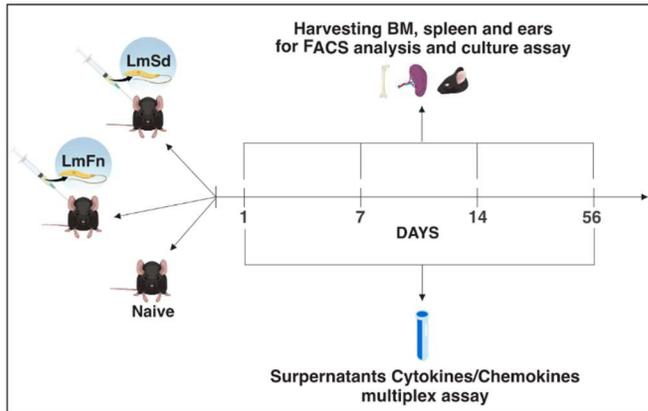
3.4 Results

3.4.1 Myeloid cells recruited to the skin lesions at late time points during persistent *Leishmania major* infection adopt a regulatory phenotype

The development of non-healing skin lesions in C57BL/6 mice infected with the *LmSd* strain has been associated with enhanced recruitment of myeloid cells to the dermis (Charmoy, Hurrell et al. 2016), which lead us to hypothesize that persistent cutaneous leishmaniasis would induce an adaptive response in the BM, similar to what we and others have previously reported in experimental visceral leishmaniasis (Abidin, Hammami et al. 2017, Pinto, Brown et al. 2017). To test our hypothesis, we used the mouse model of intradermal infection in the ear and inoculated male and female mice on C57BL/6 background with 1×10^3 metacyclic *L. major* promastigotes of the non-healing *LmSd* strain or the self-healing *LmFn* strain (**Figure 3.1**). Parasite burden in the ear and in the BM was determined by limiting dilution for each time point. The number of parasites was below detection limit at the early time points in the ear (1, 7, and 14 days post-infection (p.i.), and more importantly, no viable parasites were observed at any time point in the BM even after 14 days of incubation. Parasites from both strains were able to establish an initial infection as seen by comparable parasite load on day 42 (or 6 weeks p.i. **Figure 3.1B**). While the non-healing infection continued to progress through the later time points, parasite burden for the self-healing *LmFn* strain was on decline by day 56 (or 8 weeks p.i.), and there were no detectable parasites remaining by day 84 (or 12 weeks p.i.; **Figure 3.1B**). While the lesions caused by *LmFn* were visible at 6 weeks p.i., they remained constrained in size and were cleared by late time points as expected (data not shown). In contrast, lesions from mice infected with *LmSd* started to show ulceration and spread by day 84 p.i. (data not shown). These results follow closely what has been previously published by the Sacks group (Charmoy, Hurrell et al. 2016) and thus validated our model. We thus decided to focus our study on the early time points (first two weeks) as well as the 8-week time point when the parasite was still detectable but on the

decline in the self-healing lesions.

(A)



(B)

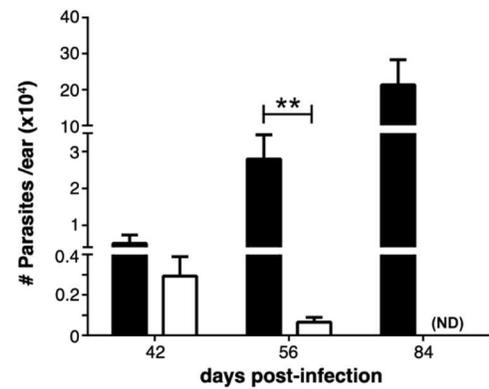


Figure 3.1. *LmSd* and *LmFn* infections in C57BL/6 mice. C57BL/6 mice were inoculated in the ear dermis with 1×10^3 *LmFn* and *LmSd* metacyclic promastigotes. (A) Bone marrow, spleen and infected ears were analyzed at 1, 7, 14 and 56 days. FACS analysis and culture for parasite burden were performed during all times-points. Cytokine and chemokine analyze were performed on day 1 and day 56 by multiplex assay. (B) Parasite burden in the infected ears as determined by limiting dilution analysis (LDA) over the course of infection. No growth of parasites in culture was detected at earlier time points. The day 42 time point was added to evaluate the establishment of early infection, and a day 84 time-point has been added to confirm remission of the self-healing parasite. Parasite burden show the mean \pm SEM: n=3, n=10 and n=3 mice per group (*LmFn* vs *LmSd*) at 42, 56 and 84 days respectively, * $p < 0.05$ comparing infection with *LmFn* and *LmSd*. The results are pooled from at least 3 independent experiments.

To confirm the accumulation of myeloid cells in the non-healing lesions in our model, we analyzed the leukocyte populations in tissue homogenates prepared from the infected ears at different time points. Myeloid cells were initially identified as CD11b⁺ cells and then further classified based on their expression of Ly6C and Ly6G (**Figure S1A**). In this way, Ly6C^{low} Ly6G⁺ cells represent granulocytes/neutrophils; Ly6C^{hi} Ly6G⁻ cells are mostly inflammatory monocytes; and Ly6C⁻ Ly6G⁻ cells represent mostly monocyte-derived myeloid cells (dendritic cells and macrophages). We observed an increase in all CD11b⁺ cell subsets on day 56 p.i. for both strains as compared to uninfected controls (**Figure 3.2A-3.2C**). There was considerable variability in the number of neutrophils recovered from *LmSd*-infected ears (**Figure 3.2A**); however, these results still dovetail those found in the literature. Moreover, there was a significant increase in the numbers of both monocytes (**Figure 3.2B**) and monocyte-derived myeloid cells (**Figure 3.2C**) in the skin of *LmSd*-infected mice when compared to those infected with *LmFn*. We further evaluated the expression of markers associated with altered myeloid cell function and identified a subset of Ly6C⁻ Ly6G⁻ CD11b⁺ cells on day 56 p.i. that expressed Sca-1 (**Figure 3.2D**). This subset was present in much higher numbers in mice infected with the non-healing *LmSd* strain. These cells also expressed higher levels of the transferrin receptor CD71 than their Sca1⁻ counterparts (**Figure S3.1A**), and they were all MHCII⁺.

We also analyzed lymphocytes in the infected ears on day 56 p.i. and found no significant alteration in CD19⁺ B lymphocyte numbers for either strain (Figure 3.2E). Conversely, there was a strong increase in both CD4⁺ (Figure 3.2F, Figure S1B) and CD8⁺ T lymphocytes (Figure 3.2G, Figure S3.1B) as expected, especially for the persistent *LmSd* strain. Put together, these results further validate our model, demonstrating a significant accumulation of myeloid cells in the infected ear at the late time point.

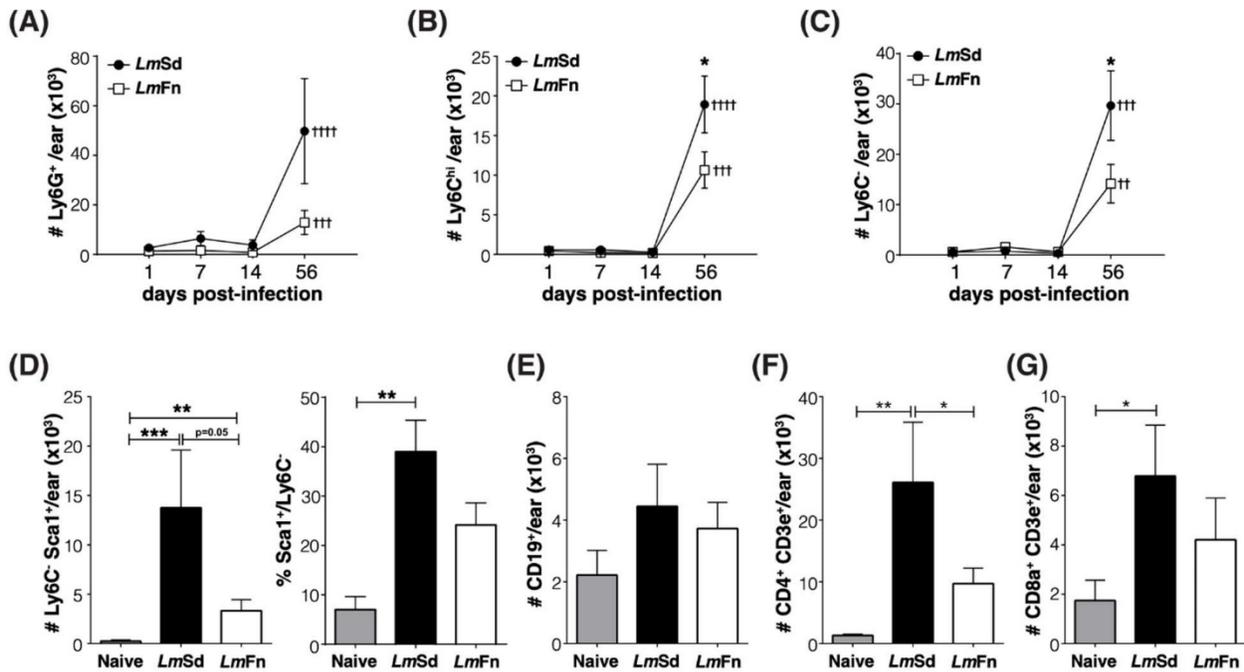


Figure 3.2. Myeloid cell accumulation at the site of infection in cutaneous leishmaniasis. C57BL/6 mice were inoculated in the ear dermis with 1×10^3 *LmFn* or *LmSd* metacyclic promastigotes and ear tissue homogenates were analyzed by flow cytometry at different times post-infection to assess the *in situ* immune response and cell recruitment. Populations of myeloid (CD11b⁺) cells are defined by the following markers: (A) Ly6G⁺ granulocytes; (B) Ly6C^{hi}Ly6G⁻ inflammatory monocytes; and (C) Ly6C⁻Ly6G⁻ resident dermal macrophages and monocyte-derived myeloid cells. (D) Number and percentage of Ly6C⁻Ly6G⁻MHC-II⁺ cells that express Sca-1 antigen on day 56 post-infection. (E) CD19⁺ B lymphocytes, (F) CD4⁺ and (G) CD8⁺ T lymphocytes detected on day 56 post-infection. Graphs represent the mean \pm SEM of n=9, n=7, n=7 and n=15 mice per group (*LmFn* vs *LmSd*) at 1, 7, 14 and 56 days post-infection, respectively. * $P < 0.05$ comparing infection with *LmFn* vs. *LmSd* at a given time point and † $P < 0.05$ comparing infected groups (*LmFn* or *LmSd*) to naïve control mice. The results are compiled from at least 4 independent experiments for each time point. See also Supplementary Figure 1 for flow cytometry gating strategies and representative results.

3.4.2 Myeloid-biased multipotent progenitor cells accumulate in BM and spleen in mice infected with the non-healing strain of *L. major*

MPPs represent progenitor cells that provide only a transient reconstitution when transferred into an immunocompromised host but that are still able to differentiate into most, if not all, blood cell lineages, albeit at variable efficacy. These cells can be identified within the lineage⁻Sca-1⁺c-Kit⁺ (LSK) hematopoietic stem/progenitor cell population according to their expression

of surface markers CD150, CD48, and CD135/Flt3 (**Figure S3.2A**) (Pietras, Reynaud et al. 2015). The CD48⁺ CD150⁻ CD135⁻ MPP3 subpopulation is the one that is most strongly associated with monocyte and granulocyte fates both at steady state and under regenerative conditions, including during infection-adapted myelopoiesis (Pietras, Reynaud et al. 2015, Pietras, Mirantes-Barbeito et al. 2016, Boettcher and Manz 2017). We were therefore very encouraged to observe an increase in the number of the MPP3 subset in the BM of mice infected with the non-healing *LmSd* strain on day 56 p.i. (**Figure 3.2A**). There was an initial decrease in MPP3 numbers in the BM of infected mice on day 7 p.i., irrespective of parasite strain; however, the increase above baseline was restricted to mice infected with the non-healing strain, suggesting that the long-term stress response was specific for the persistent infection. A similar increase was also observed in the spleen of *LmSd*-infected mice (**Figure 3.3B**).

To better understand whether the putative increase in myeloid differentiation as seen by the increase in myeloid-biased MPP3 numbers would promote the accumulation of myeloid cells at sites other than the infected ears, we analyzed the major myeloid subsets in BM and spleen (**Figure S3.3**). There were no significant differences in the number of Ly6C^{hi} monocytes or Ly6G⁺ granulocytes in the BM between naïve and infected mice, independent of the parasite strain (**Figure S3.3A** and data not shown). However, there was a significant increase in myeloid cells in the spleen of *LmSd*-infected mice on day 56 p.i., with an emphasis on monocytes and monocyte-derived myeloid cells (**Figure 3.3C-3.3F**). Ly6G⁺ granulocytes tended to increase in the spleen of infected mice, irrespective of parasite strain; however, there was considerable mouse-to-mouse variability, and the difference did not meet statistical significance (**Figure 3.3C**). In contrast, there were significant differences between the groups of mice infected with *LmSd* and *LmFn* when it came to Ly6C^{hi} inflammatory monocytes (**Figure 3.3D**) or Ly6C^{low} alternative monocytes (**Figure 3.3E**) with an increase in the number of Ly6C-expressing cells in the spleens of *LmSd*-infected mice as compared to those infected with the self-healing strain or to uninfected controls. There were also more Ly6C⁻ MHCII⁺ monocyte-derived myeloid cells on day 56 p.i. in *LmSd*-infected mice as compared to uninfected controls (**Figure 3.3F**). The increase in myeloid cells in the spleen was at least in part driven by an increase in total spleen cellularity in mice infected with the persistent *LmSd* strain ($2.3 \times 10^8 \pm 0.3 \times 10^8$ for *LmSd* as compared to $1.3 \times 10^8 \pm 0.2 \times 10^8$ for naïve and $1.5 \times 10^8 \pm 0.2 \times 10^8$ for *LmFn*; $P < 0.05$). These results suggest that the increase in MPP3 observed in the BM and spleen of *LmSd*-infected mice on day 56 p.i. results in enhanced myeloid differentiation that can be translated into an accumulation of myeloid progeny not only at the site of infection but also in peripheral organs, such as spleen.

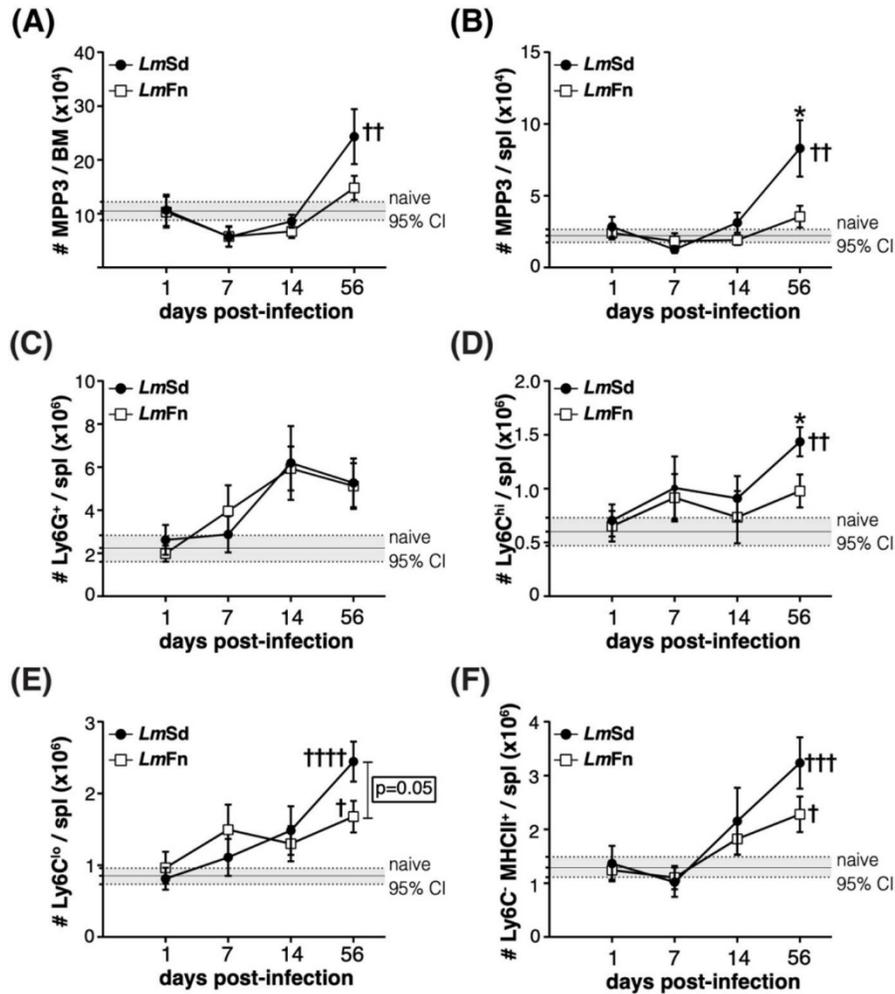


Figure 3.3. Induction of myeloid-biased multipotent progenitors is associated with an accumulation of myeloid cells during persistent infection with *L. major*. C57BL/6 mice were inoculated in the ear dermis with 1×10^3 *LmFn* or *LmSd* metacyclic promastigotes, and bone marrow and spleen samples were analyzed by flow cytometry at the indicated times during infection. The number of cells within the CD48⁺CD150⁺CD135⁺MPP3 subset of hematopoietic progenitor cells in (A) bone marrow and (B) spleen at different times post-infection. The number of (C) Ly6G⁺ granulocytes; (D) Ly6C^{hi}Ly6G⁻ inflammatory monocytes, (E) Ly6C^{lo}Ly6G⁻ alternative monocytes and (F) Ly6C⁺Ly6G⁻MHCII⁺ monocyte-derived myeloid cells in the spleen. Graphs represent the mean \pm SEM of n=13, n=11, n=11 and n=15 mice per group (*LmFn* vs *LmSd*) at 1, 7, 14 and 56 days post-infection, respectively. The grey horizontal line and shaded area represent mean \pm 95% confidence interval for naive control mice (n=16). * $P < 0.05$ comparing infection with *LmFn* vs. *LmSd* at a given time point and † $P < 0.05$ comparing infected groups (*LmFn* or *LmSd*) to naive control mice. The results are compiled from at least 4 independent experiments for each time point. See also Supplementary Figures 2 and 3 for flow cytometry gating strategies and representative results.

3.4.3 Persistent cutaneous leishmaniasis promotes the accumulation of stem-like megakaryocyte progenitors

Another stem/progenitor cell subset that normally expands during the BM response to inflammation is the CD48⁺CD150⁺ MPP2 subpopulation that contributes to the formation of red blood cells and platelets (Haas, Hansson et al. 2015, Pietras, Reynaud et al. 2015). It has also

been shown to contribute to myelopoiesis in response to inflammation. The BM response to the non-healing *L. major* infection was effectively not restricted to the expansion of MPP3 cells, as we could also observe a significant increase in the numbers of cells within the MPP2 subset in the BM on day 56 p.i. (**Figure 3.4A**). Similar to myeloid cells, there was no significant increase in platelet numbers in the BM (**Figure 3.4B**; **Figure S3.4A**), and the numbers of immature erythrocytes tended to decrease (**Figure S3.4A** and data not shown). However, the increase in MPP2 cells in the spleen of *LmSd*-infected mice (**Figure 3.4C**) was associated with an increased number of platelets (**Figure 3.4D**), suggesting that platelet production could also be enhanced in response to infection with *L. major*. There was also an increase in proportion of immature CD71⁺ erythrocytes in the spleen of infected mice (**Figure S3.4B**), and this increase tended to be more significant in mice infected with *LmSd*.

The MPP4 subset of CD150⁻ CD48⁺ CD135⁺ LSKs are also known as lymphoid-primed MPPs due to their enhanced potential for efficient differentiation into lymphocytes (Adolfsson, Mansson et al. 2005). However, their frequency and function often decline in conditions of chronic inflammation (Pietras, Reynaud et al. 2015, Abidin, Hammami et al. 2017). The MPP4 subset tended to decrease at the early time points (day 7 and day 14), especially in mice infected with the self-healing strain (**Figure S3.2**, **Figure S3.5A**). MPP4 numbers mostly recovered by day 56 p.i., although there were quite large variations between individual animals. Despite the recovery of MPP4 numbers, there was a decrease in the numbers of CD19⁺ lymphocytes in the BM of infected mice as compared to naïve controls, independently of the type of lesion (**Figure S3.5B**, **S3.5D**). Moreover, the proportion of IgM⁻ B lymphocyte precursors as compared to IgD⁺ recirculating mature cells tended to decrease in mice infected with *LmSd*, further suggesting a decrease in B lymphopoiesis. There was no difference in CD4⁺ lymphocyte numbers in the BM (**Figure S3.5C**, **S3.5D**); however, the number of CD8⁺ lymphocytes was specifically decreased in the BM of *LmSd*-infected mice (**Figure S3.5C**, **S3.5D**).

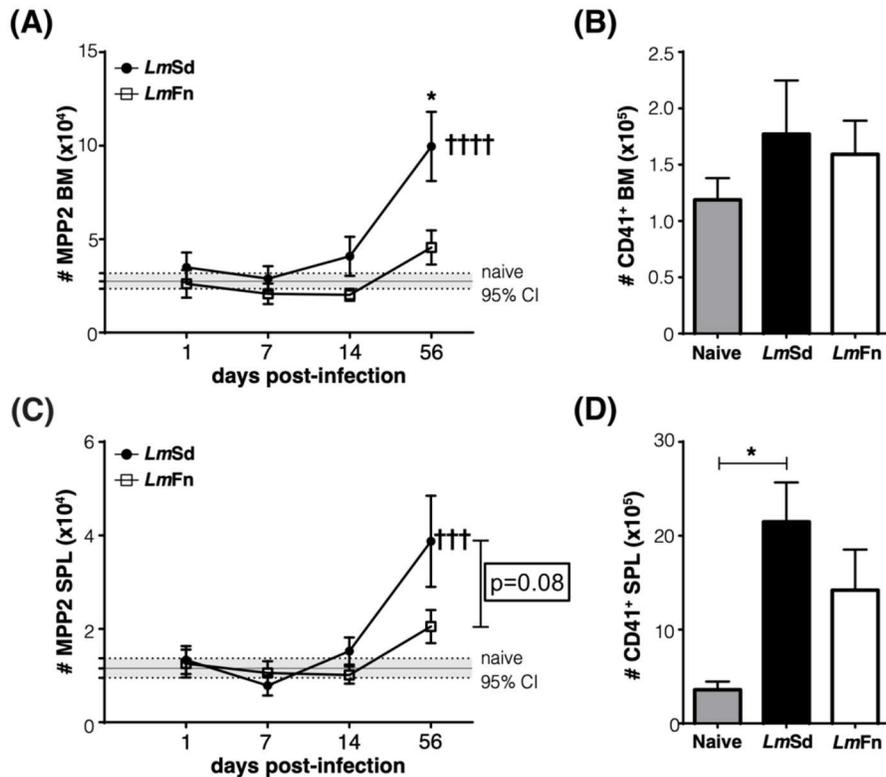


Figure 3.4. Accumulation of platelet-biased multipotent progenitors in bone marrow and spleen in *LmSd*-infected mice. C57BL/6 mice were inoculated in the ear dermis with 1×10^3 *LmFn* or *LmSd* metacyclic promastigotes, and bone marrow and spleen samples were analyzed by flow cytometry at the indicated times during infection. (A) The number of cells within the CD48⁺CD150⁺CD135⁻ MPP2 subset of hematopoietic progenitor cells in the bone marrow at different times post-infection. (B) Analysis of the number of CD45⁻CD41⁺ platelets in the bone marrow on day 56 post-infection. (C) Number of MPP2 cells in the spleen at different times post-infections. (D) Analysis of the number of CD45⁻CD41⁺ platelets in the spleen on day 56 post-infection. Graphs represent the mean \pm SEM of $n=13$, $n=11$, $n=11$ and $n=15$ mice per group (*LmFn* vs *LmSd*) at 1, 7, 14 and 56 days post-infection, respectively, for MPP2 analysis; and $n=7$ mice per group for platelet analysis. The grey horizontal line and shaded area in panels (A) and (C) represent mean \pm 95% confidence interval for naïve control mice. * $P < 0.05$ comparing infection with *LmFn* vs. *LmSd* at a given time point and † $P < 0.05$ comparing infected groups (*LmFn* or *LmSd*) to naïve control mice. The results are compiled from at least 4 independent experiments for each time point. See also Supplementary Figures 2 and 4 for flow cytometry gating strategies and representative results.

Lastly, we wanted to evaluate if the most immature stem/progenitor cell subsets were also affected by the persistent infection. The CD48⁻CD150⁺ LSK subpopulation is enriched in long-term HSCs at steady state (Kiel, Yilmaz et al. 2005), and comprises activated downstream progenitor cells in conditions of inflammation (Pietras, Lakshminarasimhan et al. 2014, Haas, Hansson et al. 2015, Pietras, Reynaud et al. 2015). Similar to the different MPP subpopulations (Figure 3.3A, 3.4A; Figure S3.2), the number of cells corresponding to the HSC phenotype was increased in the BM of mice infected with the non-healing *LmSd* strain on day 56 p.i. (Figure

3.5A). This was true also in the spleen (**Figure 3.5B**). Unexpectedly, we also observed a decrease in HSC numbers on day 7 p.i. in both organs and for mice infected with both strains of *L. major* (**Figure 3.5A, 3.5B**), similar to our results for the MPP3 subset in the BM (**Figure 3.3A**). Collectively these results suggest an inflammatory response in the BM that occurs early on in *L. major*-infected mice irrespective of parasite strain, similar to what normally occurs in acute infections (Boettcher, Gerosa et al. 2014, Matatall, Shen et al. 2014, Boettcher and Manz 2017, Hirche, Frenz et al. 2017). However, while the BM returns more or less to normal in mice infected with the self-healing strain by day 56 p.i., the non-healing strain provokes a second phase of BM response that corresponds to the accumulation of myeloid cells, especially monocytes and monocyte-derived cells, at the site of infection but also in peripheral organs, such as spleen.

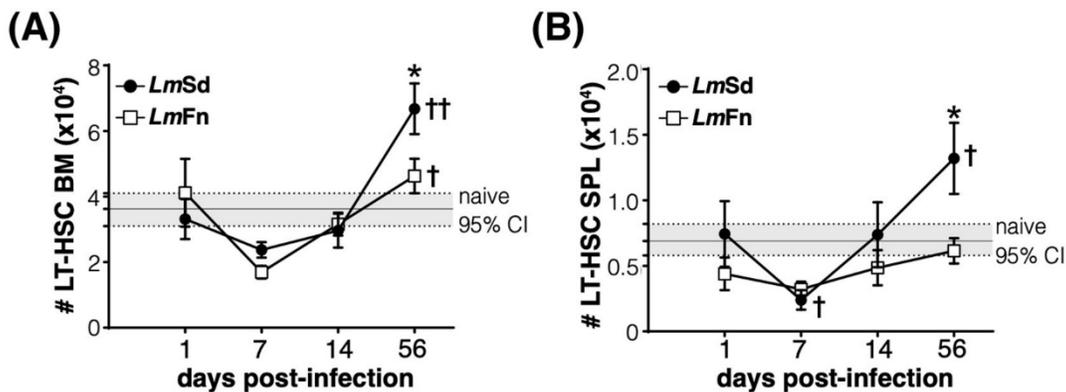


Figure 3.5. Long-term HSCs display biphasic kinetics in bone marrow and spleen of *LmSd*-infected mice. C57BL/6 mice were inoculated in the ear dermis with 1×10^3 *LmFn* or *LmSd* metacyclic promastigotes, and bone marrow and spleen samples were analyzed by flow cytometry at the indicated times during infection. Number of cells expressing LT-HSC markers in (A) bone marrow and (B) spleen at various time points. Graphs represent the mean \pm SEM of $n=13$, $n=11$, $n=11$ and $n=15$ mice per group (*LmFn* vs *LmSd*) at 1, 7, 14 and 56 days post-infection, respectively. The grey horizontal line and shaded area represent mean \pm 95% confidence interval for naïve control mice. * $P < 0.05$ comparing infection with *LmFn* vs. *LmSd* at a given time point and † $P < 0.05$ comparing infected groups (*LmFn* or *LmSd*) to naïve control mice. The results are compiled from at least 4 independent experiments for each time point. See also Supplementary Figure 2 for flow cytometry gating strategies and representative results.

3.4.4 **BM soluble cytokine/chemokine profiles suggest absence of specific pro-inflammatory responses in persistent infection**

Activation of infection-adapted myelopoiesis can be the result of direct sensing of the pathogen in the BM or a more indirect response to changes in the BM cytokine environment, depending on the situation (Boettcher, Gerosa et al. 2014, Schurch, Riether et al. 2014, Askenase, Han et al. 2015, Boettcher and Manz 2017, Pinto, Brown et al. 2017, Takizawa, Fritsch et al. 2017, Takizawa and Manz 2017, Preham, Pinho et al. 2018, Batsivari, Haltalli et al. 2020). To obtain a global view of the cytokine response in the BM, we analyzed the soluble factors available in the BM from the supernatant (or diluted BM plasma) recovered from naïve mice as well as mice inoculated with *L. major* immediately in the early phase (day 1 p.i.) or late in the chronic phase (day 56 p.i.). We evaluated a panel of 44 different cytokines and chemokines, but only those that were reliably detected in at least 75% of the samples and that varied by at least 50% at any given time point are represented in **Figure 3.6A**. We further divided these factors in seven groups based on expression patterns. The first group includes factors downregulated on day 1 and whose levels remain low in mice infected with the non-healing *LmSd* strain but come back to baseline or increase in those infected with the self-healing *LmFn* strain, such as the interferon-responsive chemokine CXCL9 (**Figure 3.6B**). Groups 2-4 consist of factors upregulated on day 1 and whose levels decrease by day 56 in both groups with the exception of GM-CSF that remains upregulated in *LmFn*-infected mice (**Figure 3.6C**). Some are upregulated slightly more strongly in *LmSd*-infected mice (such as TNF- α or IL-10), others in *LmFn*-infected mice (such as IL-12 p70 or IFN- β), while others follow very similar patterns for both strains (e.g., IL-1 β and IFN- γ). Groups 5 and 6 comprise factors that remain relatively stable on day 1 but are strongly downregulated in the BM of *LmSd*-infected mice on day 56 p.i., such as CCL5/RANTES and the interferon-inducible chemokine CXCL10 (**Figure 3.6D**). Finally, there is a single chemokine, CCL17, that is upregulated on day 1 only in *LmFn*-infected mice, and whose levels remain elevated in this group even on day 56 (**Figure 3.6E**). These results tend to support the presence of an early inflammatory response in the BM of mice infected with either strain of parasite, but unfortunately give us relatively little insight into what would promote sustained myelopoiesis on day 56 in mice infected with the non-healing strain. Instead, they point toward a decrease of interferon- (CXCL10, CXCL9, IFN- β , IL-12 p70) and GM-CSF- (GM-CSF, CCL17) associated responses in the BM of mice infected with the non-healing strain both at early and late time points.

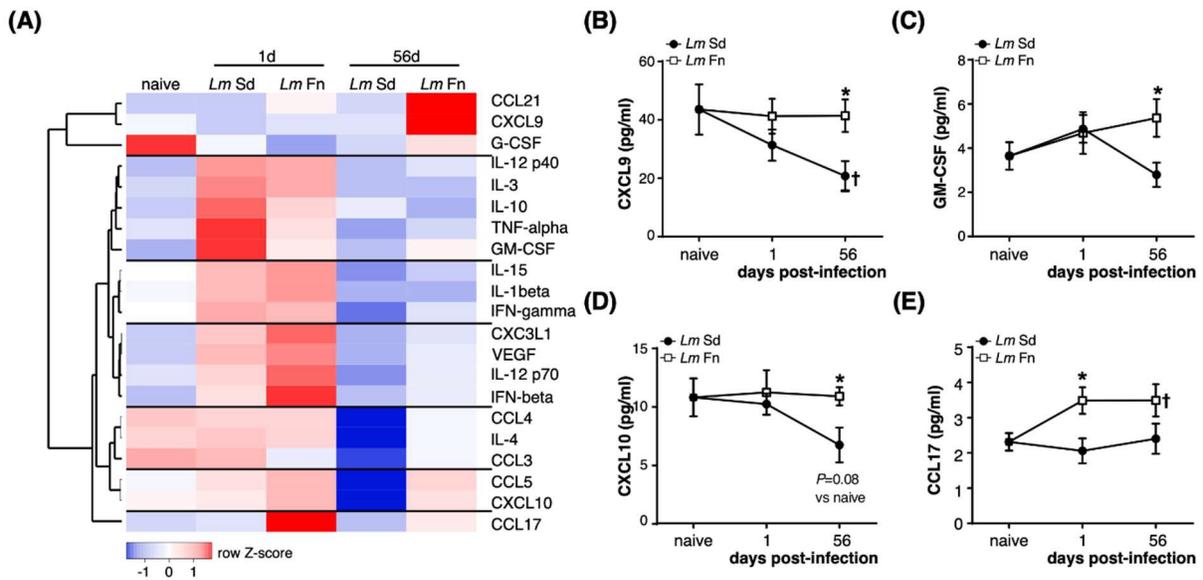


Figure 3.6. Bone marrow inflammatory cytokine/chemokine profiles indicate early activation and subsequent suppression of inflammatory responses in non-healing *L. major* infection. (A) Soluble cytokine/chemokine levels in bone marrow extracellular milieu after *LmFn* and *LmSd* infection. Heatmap represents relative quantities for each cytokine/chemokine as fold change compared to paired, sex-matched naive mice and normalized across each row. Each square represents the average fold change for a sample of 4 male and 4 female mice per group. The raw concentration of (B) CXCL-9 (MIG), (C) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), (D) CXCL-10 (IP-10), and (E) CCL-17 (TARC) in bone marrow supernatant obtained from naïve and infected mice at 1 and 56 days post-infection. Graphs represent the mean \pm SEM for 4 male and 4 female mice per group. * $P < 0.05$ comparing infection with *LmFn* vs. *LmSd* at a given time point and † $P < 0.05$ comparing infected groups (*LmFn* or *LmSd*) to naïve control mice.

3.5 Discussion

BM hematopoietic progenitor cell activation and the subsequent induction of adapted hematopoiesis to infection and inflammation can have positive or negative consequences on the host immune response and hematopoietic recovery, depending on the type and duration of stimulus (Pietras, Mirantes-Barbeito et al. 2016, Abidin, Hammami et al. 2017, Boettcher and Manz 2017, Takizawa and Manz 2017). We have previously shown that infection-adapted myelopoiesis promoted parasite expansion during experimental visceral leishmaniasis, namely by enhancing the generation of monocytes that were highly susceptible to infection by the parasite (Abidin, Hammami et al. 2017) and contributed to the suppression of T lymphocyte responses (Hammami, Abidin et al. 2017). Here we wanted to evaluate the hypothesis that the dissemination of parasite to the BM was not strictly required for a hematopoietic response and that a persistent, non-healing infection with the cutaneous species *L. major* would also promote myeloid differentiation. We found that the intradermal infection of C57BL/6 mice in the ear with a non-healing strain of *L. major* resulted in the expansion of myeloid-biased progenitor cells in BM and spleen, in contrast to an infection with a self-healing strain, and promoted the increase of myeloid

cell numbers not only in the skin lesion but also in the spleen. Our results further suggest a suppression of inflammatory responses at later time points in mice infected with the non-healing strain and underline the importance of considering alterations to the BM output when analyzing *in vivo* host-pathogen interactions.

Enhanced myelopoiesis has been suggested to contribute to *Leishmania* parasite proliferation by generating “safe targets”, or permissive cells in which the parasite can hide from the host immune response, for quite some time (Mirkovich, Galelli et al. 1986). While visceral leishmaniasis establishes a chronic infection in the BM and is associated with signs of BM failure if untreated (Matnani and Ganapathi 2016, Abidin, Hammami et al. 2017), the impact of an intradermal cutaneous infection on BM function has not been thoroughly investigated. The initial report by Mirkovich et al found mild increases in colony-forming activity in the spleen but not in the BM of C57BL/6 mice infected intracutaneously with a large number (5×10^6) of promastigotes (Mirkovich, Galelli et al. 1986). Our results using a much lower number of parasites but enriching for the infectious form prior to inoculation point toward a similar direction, as even though we observe an increase in myeloid-biased progenitor cells in both organs, there was no accumulation of myeloid cells in the BM. These results are very similar to what we have also reported in the mouse model of visceral leishmaniasis (Abidin, Hammami et al. 2017).

We did not detect any viable parasite in the BM by limiting dilution assay, using the equivalent of 5×10^6 BM cells, or approx. 10% of cells harvested from two hind legs (femora and tibiae) as starting dilution. This result strongly suggests that *L. major* remained confined to the skin dermis and draining lymph nodes as generally expected. Low numbers of *L. major* parasites have been reported in the spleen by other groups using other strains of the parasite, other modes of infection and/or higher parasite dose (Martinez-Lopez, Iborra et al. 2015, Paduch, Debus et al. 2019). It thus remains possible that more sensitive detection methods, such as quantitative PCR of high copy number genes, would yield a different result. However, PCR-based methods are also more likely to overestimate the amount of viable pathogen and may detect left-over genetic material from an aborted infection or a recent contact with the pathogen that had been cleared (Pedrosa, Ximenes et al. 2013, Bullard, Dust et al. 2020). More specifically in the context of our study, cells such as neutrophils (Furze and Rankin 2008, De Filippo and Rankin 2020) or migratory dendritic cells (Martinez-Lopez, Iborra et al. 2015) could bring phagocytosed parasite material from skin or draining lymph nodes to the BM and spleen. Neutrophil clearance in the BM also stimulates further granulopoiesis (Furze and Rankin 2008), which would contribute to the expansion of myeloid-biased progenitor cells in persistent infection; however, this remains a

hypothesis in the context of cutaneous leishmaniasis.

While the contribution of neutrophils and dermal macrophages to the non-healing lesions in *LmSd*-infected mouse ear has been previously described (Charmoy, Hurrell et al. 2016, Lee, Charmoy et al. 2018), the importance of infiltrating monocytes has not been established. Monocytes become rapidly infected by *L. amazonensis*, another *Leishmania* species causing cutaneous leishmaniasis (Carneiro, Lopes et al. 2020), and their presence is required for early parasite expansion in this model. While the non-healing strain of *L. major* preferentially infects dermal macrophages that are independent of circulating monocytes at the early time points, monocytes are also infected to a greater extent than with the self-healing strain (Lee, Charmoy et al. 2018). Moreover, the contribution of monocytes to the maintenance of dermal macrophages at later time points (after more than 1 month) cannot be completely excluded, as experiments using bone marrow chimeras showed approximately 25% contribution of bone marrow-derived donor cells to the dermal macrophage compartment at 16 weeks (Lee, Charmoy et al. 2018). Our results identify a subset of Sca-1⁺ CD71⁺ MHC-II⁺ myeloid cells in the infected ears that is quite specific for mice infected with the non-healing *LmSd* strain, and we speculate that it represents a monocyte-derived subset that has upregulated Sca-1 expression *in situ* in response to infection, as we have previously observed that *Leishmania* infection alone was sufficient to promote Sca-1 expression *in vitro* (Abidin, Hammami et al. 2017). Upregulation of Sca-1 and MHC-II expression by monocytes has also been associated with the acquisition of regulatory function in *Toxoplasma gondii* infection (Askenase, Han et al. 2015), while Sca-1⁺ myeloid cells contribute to tissue damage and mortality in experimental infection with *Staphylococcus aureus* (Park, Kim et al. 2020). CD71 expression has been linked to activated monocytes as well as to tissue macrophages, and elevated CD71 levels have been reported, for example, in Post Kala-Azar dermal leishmaniasis patients, both in skin lesions and in circulating monocytes (Dighal, Mukhopadhyay et al. 2020). Further analyses will be required to evaluate the functional importance of this subset.

Control of cutaneous leishmaniasis is highly dependent on early, efficient Th1 responses in the skin and draining lymph nodes (Sacks and Noben-Trauth 2002, Kaye and Scott 2011, Martinez-Lopez, Iborra et al. 2015). An ineffective Th1 response, such as seen in immunosuppressed individuals (Barro-Traore, Preney et al. 2008), genetically modified mouse strains (Martinez-Lopez, Iborra et al. 2015), or in the susceptible Balb/c mouse strain (Sacks and Noben-Trauth 2002, Kaye and Scott 2011) results in systemic spread, especially with high parasite load. Lymphocyte population in the dermis remains mostly Th1-biased even in the

persistent *L. major* infection (Lee, Charmoy et al. 2018); however, cytokine production in this case was evaluated by intracellular staining of PMA/ionomycin restimulated lymphocytes and thus more accurately represents potential rather than actual production *in vivo*. Neutrophil- and monocyte-derived myeloid suppressor cells can inhibit pathogen-specific lymphocyte responses and contribute to tissue damage (Norris, Uebelhoer et al. 2013, Hammami, Abidin et al. 2017, Park, Kim et al. 2020), and could thus contribute to promoting parasite persistence and the development of skin lesions in persistent infection. Moreover, the production of regulatory myeloid cells or cells more permissive to infection, as reported in visceral leishmaniasis (Abidin, Hammami et al. 2017) or in toxoplasmosis (Askenase, Han et al. 2015), for example, would not only interfere with Th1 responses but also provide more target cells for the parasite, as previously discussed. This would not diminish the importance of resident dermal macrophages as primary targets for the persistent *LmSd* strain (Lee, Charmoy et al. 2018), but provide additional “safe houses”. Altered myelopoiesis in the BM is also likely to suppress dendritic cell differentiation (Yanez, Coetzee et al. 2017), and could thus attenuate local T lymphocyte responses in the dermis and draining lymph nodes (Leon, Lopez-Bravo et al. 2007).

Another question that remains yet unanswered is the mechanism by which persistent *L. major* infection would promote myelopoiesis. The concentration of most myeloid growth factors in the BM environment was quite low in our assay, especially in the late phase of the infection, but we cannot exclude the possibility that these factors are being consumed by the developing myeloid cells as soon as they are being produced, leaving only low amounts available in the soluble, extracellular milieu. We cannot thus presume that the BM environment would be lacking in cytokines necessary for myeloid differentiation. *In vitro* colony forming assays showed mild increases in monocytic colonies and total myeloid colonies from the BM of infected mice as compared to naïve controls on day 56 p.i. (Figure S6), suggesting an increase in the number of functional myeloid progenitors in the form of cytokine-responsive cells with robust proliferative potential; however, there was no difference between mice infected with the different strains. Continuous release of newly differentiated myeloid cells from the BM to circulation might also not allow their accumulation in the BM despite their enhanced synthesis. In contrast to the BM, monocytes and monocyte-derived cells accumulated in the spleen of mice infected with the non-healing *LmSd* strain. This accumulation was also accompanied by an increase in myeloid-biased progenitor cells, suggesting that some of these cells could indeed be the result of myeloid differentiation in the spleen. It has been shown in the hamster model of visceral leishmaniasis that at least some of the myeloid cells accumulating in the spleen could be the result of intrasplenic proliferation (Osorio, Medina-Colorado et al. 2020); however, this does not exclude the potential

contribution of enhanced myelopoiesis as immature cells are more likely to proliferate than mature myeloid cells. There was also an accumulation of platelets and an increase in overall spleen cellularity in mice infected with the non-healing *LmSd* strain, further suggesting that spleen could be a site of active hematopoiesis in persistent cutaneous leishmaniasis. Extra-medullary hematopoiesis is common when there is chronic inflammation in the BM, and the specific export of progenitor cells with high potential for megakaryopoiesis, or the production of platelets, has been reported in response to acute inflammatory signaling to promote platelet recovery (Haas, Hansson et al. 2015).

In conclusion, our results using the intradermal inoculation of *L. major* as model of cutaneous leishmaniasis show the accumulation of myeloid-biased progenitor cells and mature myeloid cells in mice infected with the *LmSd* strain causing non-healing lesions as compared to mice infected with a self-healing strain or to naïve controls. These results demonstrate that the presence of active, widespread infection in the BM is not required for the induction of an infection-adapted hematopoietic response and emphasize the importance of considering hematopoietic alterations when analyzing *in vivo* host-pathogen interactions.

3.6 Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

3.7 Funding

This work was supported by Canadian Institutes of Health Research (grant #PJT-148614 to KMH). KMH is a Fonds de recherche du Québec – Santé Junior Research Scholar. AD holds the Canada Research Chair on the Biology of intracellular parasitism. FLBF was partially supported by scholarships from the Fondation Armand-Frappier and the Centre d'excellence en recherche sur les maladies orphelines – Fondation Courtois (CERMO-FC). OS was supported by a Doctoral Award from the Fonds de recherche du Québec – Santé. The funders had no role in study design, data collection, analysis, or interpretation of the results.

3.8 Acknowledgments

We are grateful to Christine Matte, Roxann Héту-Arbour, and the staff of the Laboratoire national de la biologie expérimentale for technical assistance and animal care. We would also like to acknowledge the contribution of Luiz Alberto Bandeira Ferreira to the preparation of figures.

3.9 Supplemental Information

Table S3.1. List of antibodies used for flow cytometry.

ANTIBODY	FLUOROCHROME	CLONE	COMPANY
CD16/32 (Fc block)	Purified	2.4G2	BD Biosciences
HSC staining			
CD117 (cKit)	PE	2B8	BD Biosciences
CD135 (Flt3)	PerCP-eFluor 710	A2F10	eBioscience
CD150	Alexa Fluor 647	TC15-12F12.2	BioLegend
Sca1 (Ly6A/Ly6E)	PE-Cy7	D7	BD Biosciences
CD11b	Biotin	M1/70	BD Biosciences
CD45R/B220	Biotin	RA3-6B2	BD Biosciences
GR1 (Ly6C/Ly6G)	Biotin	RB6-8C5	BD Biosciences
Ter119	Biotin	TER-119	BD Biosciences
CD48	BV421	HM48-1	BD Biosciences
Streptavidin	V500		BD Biosciences
Overview staining			
IgM	PerCP-eFluor 710	II/41	eBioscience
CD19	PE	1D3	BD Biosciences
CD3e	PE-Cy7	145-2C11	eBioscience
CD11b	Alexa Fluor 647	M1/70	BD Biosciences
IgD	APC	11-26c.2a	BD Biosciences
GR1 (Ly6C/Ly6G)	APC-Cy7	RB6-8C5	BD Biosciences
CD4	APCe780	GK1.5	BD Biosciences
CD8a	V450	53-6.7	BD Biosciences

CD45R/B220	A488	RA3-6B2	BD Biosciences
CD11b	A647	M1/70	BD Biosciences
Ly6G	PECy7	1A8	BD Biosciences
Ly6C	PerCP-Cy5.5	HK1.4	eBioscience
MHC Class II (I-Ab)	PE	AF6-120.1	BD Biosciences
Sca1 (Ly6A/Ly6E)	BV711	D7	BD Biosciences
Ter119	Biotin/FITC	TER-119	BD Biosciences
Streptavidin	FITC		BD Biosciences
CD71	BV421	C2 (C2F2)	eBioscience
CD41	PE	MWReg30	BD Biosciences
CD45	PE-CF594	30-F11	BD Biosciences

Table S3.2. List of cytokines and chemokines in the multiplex assay

Eotaxin	G-CSF	GM-CSF	IFN- γ
IL-1 α ¹	IL-1 β	IL-2	IL-3
IL-4 ¹	IL-5 ¹	IL-6	IL-7
IL-9	IL-10	IL-12 p40	IL-12 p70
IL-13 ¹	IL-15	IL-17 ¹	IP-10/CXCL10
KC/	LIF ¹	MCP-1/CCL2	M-CSF
MIG/CXCL9	MIP-1 α /CCL3	MIP-1 β /CCL4	MIP-2/CXCL2
RANTES/CCL5	TNF- α	VEGF	6Ckine/CCL21
EPO ¹	Fractalkine/CX3CL1	IFN- β 1	IL-11 ¹
IL-16	IL-20 ¹	MCP-5/CCL12	MDC/CCL22
MIP-3 α /CCL20 ¹	MIP-3 β /CCL19 ¹	TARC/CCL17	TIMP-1

¹ Not detected in most samples

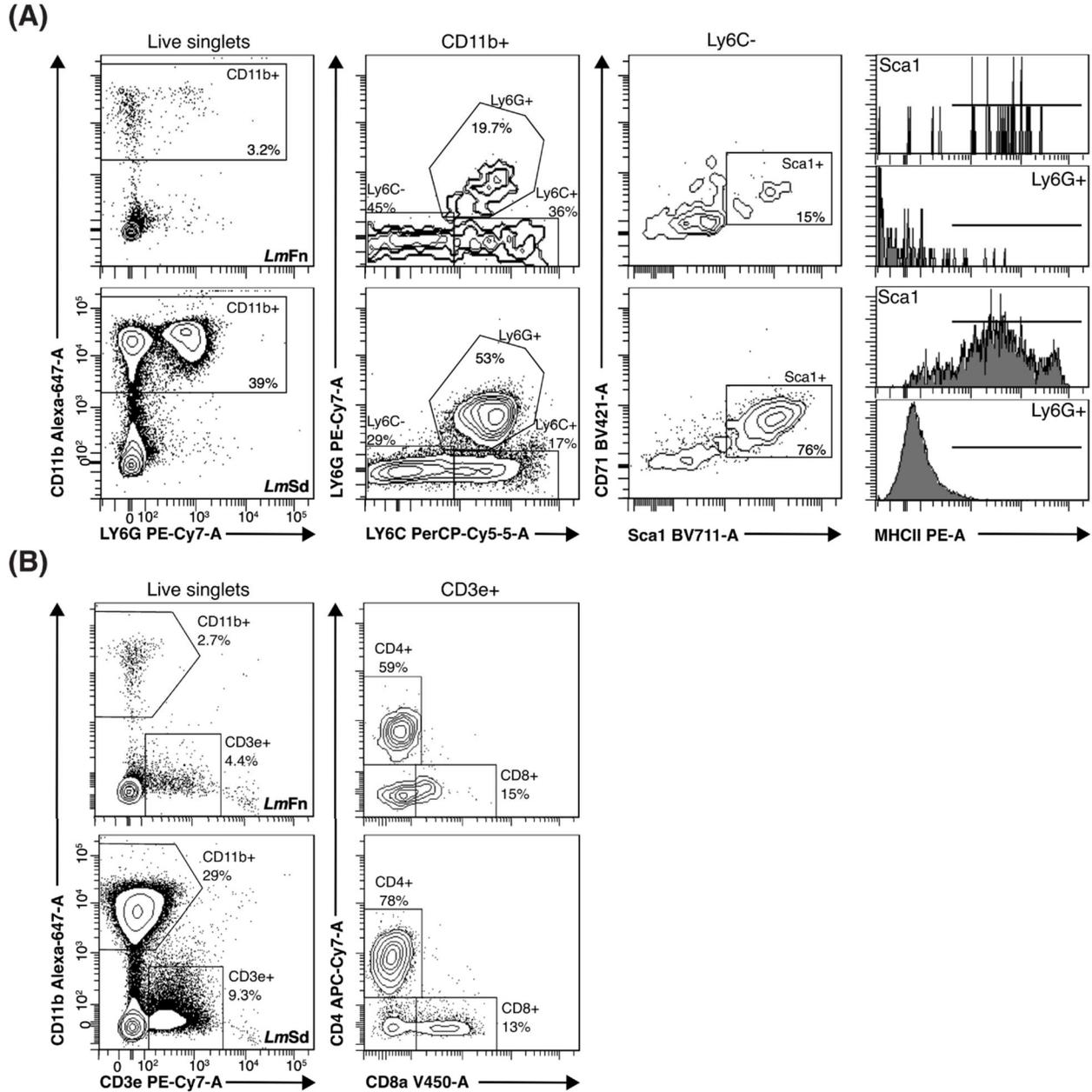


Figure S3.1. Flow cytometry gating strategy and representative results in the infected ear dermis. (A) Representative flow cytometry data for granulocytes (GR1^{hi}), inflammatory monocytes (Ly6C^{hi}CD11b⁺) and monocyte-derived myeloid cells (Ly6C⁻CD11b⁺) and Sca-1 expression. (B) Representative flow cytometry data CD3ε⁺CD4⁺ and CD3ε⁺CD8⁺ T cell subsets. All percentages are calculated on the parent population (indicated at the top of the column).

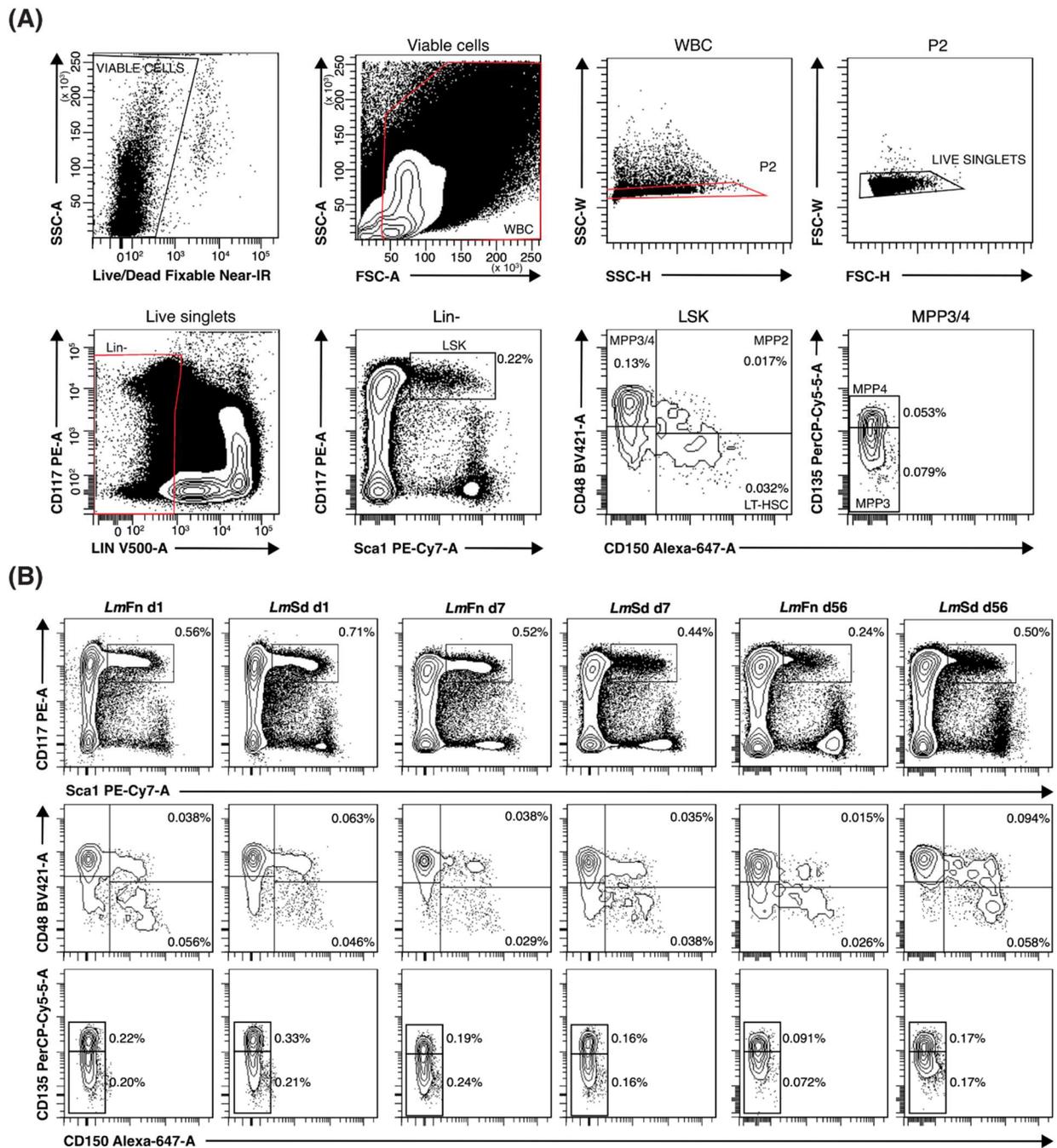


Figure S3.2. Flow cytometry gating strategy and representative results for BM stem/progenitor cell subsets. (A) Gating strategy and representative flow cytometry data for a naïve mouse, demonstrating the identification of Lin⁻Sca1⁺cKit⁺ (LSK) stem/progenitor cells and their different subsets according to CD150, CD48, and CD135 expression (MPP3, MPP2, LMPP and LT-HSC) in the bone marrow. The same strategy was also used for the spleen. (B) Representative flow cytometry data for infected mice on day 1, day 7, and day 56 post-infection. All percentages are calculated on live singlets.

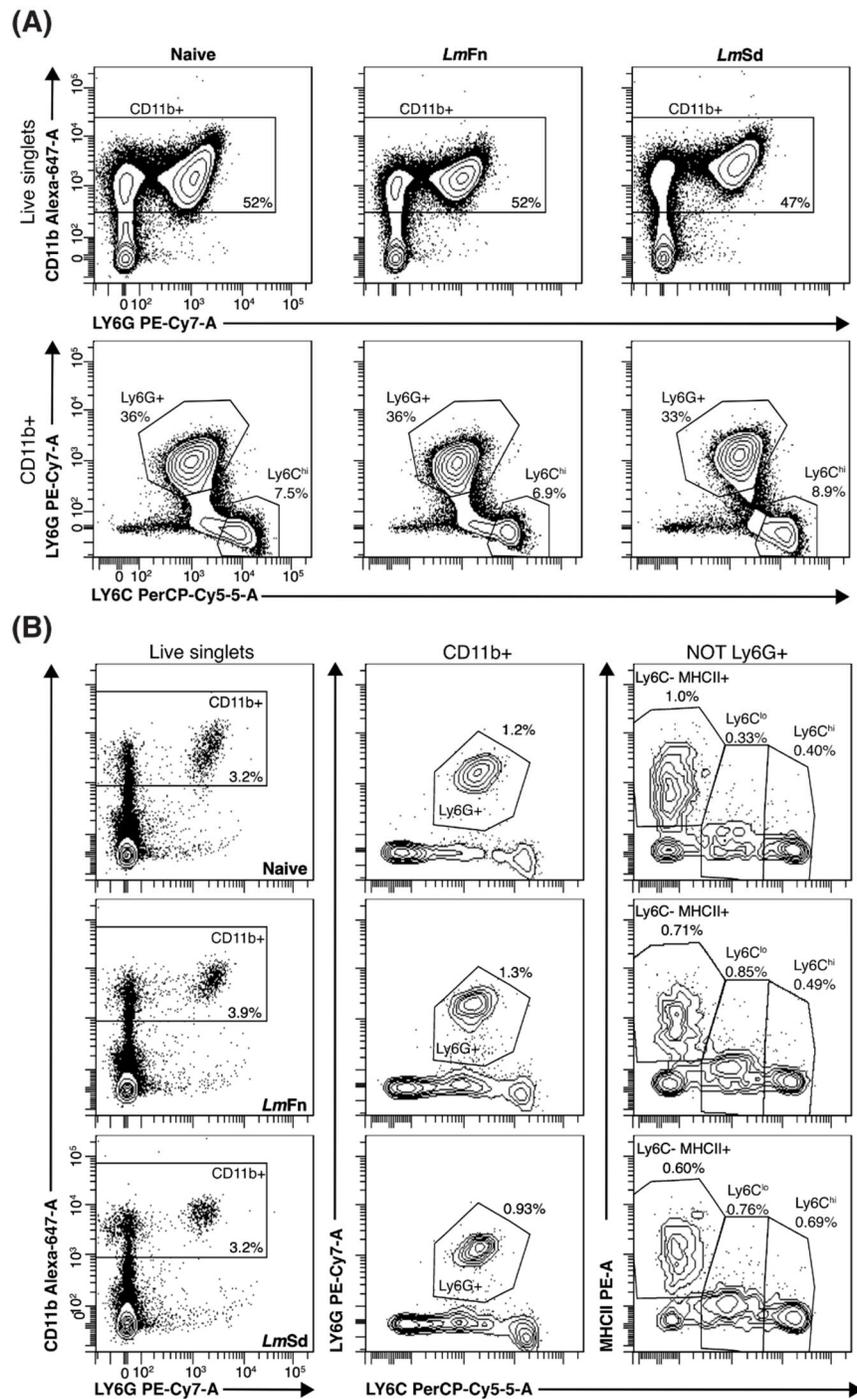


Figure S3.3. Flow cytometry gating strategy and representative results for myeloid cells in BM and spleen.

(A) Gating strategy and representative flow cytometry plots of naïve and infected mice (day 56), demonstrating the identification of granulocytes (GR1^{hi}), and mature monocytes (Ly6C^{hi}CD11b⁺) in the bone marrow. (B) Representative flow cytometry plots and gating strategy of naïve and infected mice (day 56), demonstrating the identification of granulocytes (GR1^{hi}), inflammatory monocytes (Ly6C^{hi}CD11b⁺), alternative monocytes (Ly6C^{lo} CD11b⁺), and monocyte-derived myeloid cells (Ly6C⁻ CD11b⁺ MHC-II⁺) in the spleen. All percentages are calculated on live singlets.

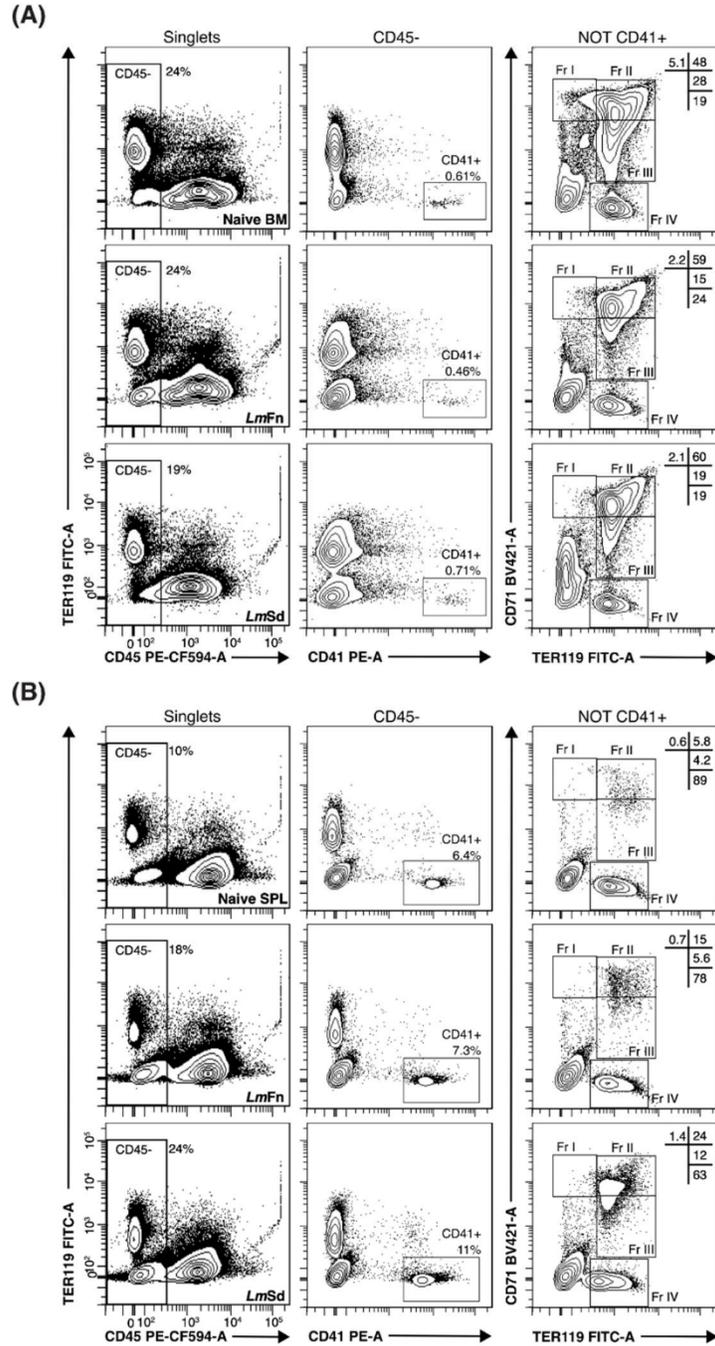


Figure S3.4. Flow cytometry gating strategy and representative results for red blood cells and platelets. Gating strategy and representative flow cytometry plots of naïve and infected mice (day 56) and for platelets (CD41⁺) and the different stages of red blood cell differentiation (based on CD71 and Ter119 expression) in (A) the bone marrow and spleen. Percentages for platelets refer to total CD45⁺ cells, while those for erythroid cells are calculated as percentage of total erythroid cells (all four stages).

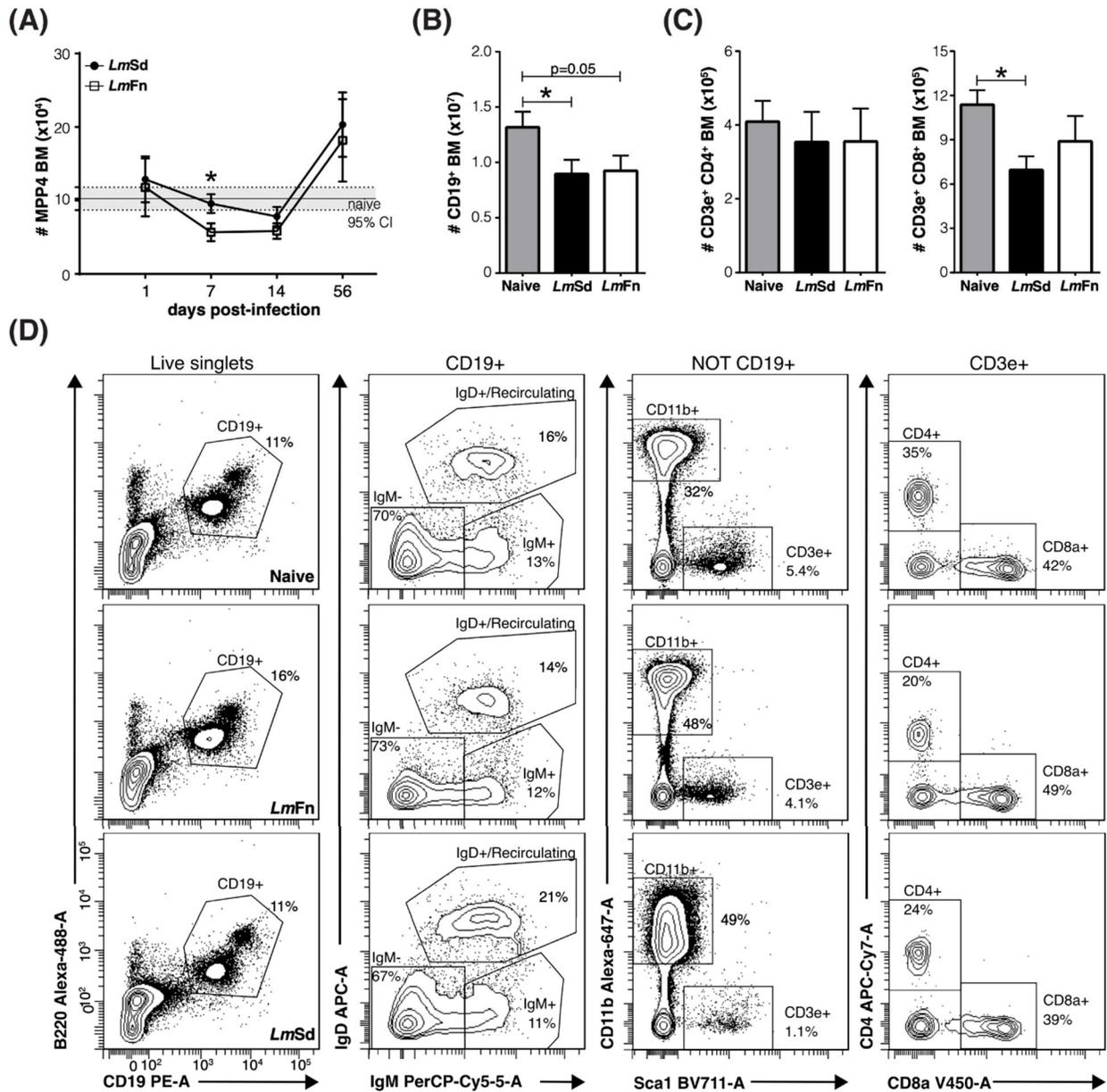


Figure S3.5. Lymphocytes in bone marrow. (A) The number of cells within the CD48⁺CD150⁻CD135⁺ MPP4 subset of hematopoietic progenitor cells in bone marrow at different times post-infection. (B) Number of CD19⁺ B lymphocytes, (A) CD4⁺ CD3e⁺ T lymphocytes, and CD8⁺ CD3e⁺ T lymphocytes in BM on day 56 post-infection. Graphs represent are the mean \pm SEM of $n=13$, $n=11$, $n=11$ and $n=15$ mice per group (*LmFn* vs *LmSd*) at 1, 7, 14 and 56 days post-infection, respectively. * $P < 0.05$ 95% CI comparing infection with *LmFn* vs. *LmSd* at a given time point and † $P < 0.05$ 95% CI comparing infected groups (*LmFn* or *LmSd*) to naive control mice. The results are compiled from at least 4 independent experiments for each time point. (D) Gating strategy and representative flow cytometry data for naive and infected mice (day 56). The percentages refer are calculated on live singlets (CD19⁺ cells, CD3e⁺ cells) or on the parent population (B and T cell subsets).

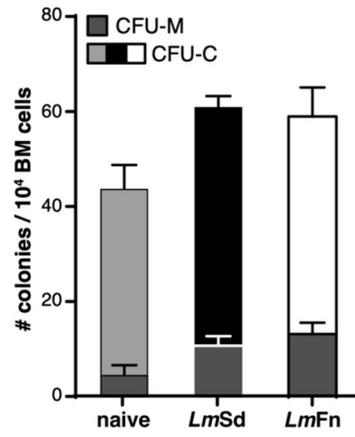


Figure S3.6. Cell culture comparing infected groups (*LmFn* or *LmSd*) to naive control mice. CFU-M: ColonyForming Unit M (macrophages and monocytes); CFU-C: Colony-forming unit cell.

4 DISCUSSION

La leishmaniose cutanée est la forme la plus courante de leishmaniose et est présente sur quatre continents. Elle provoque des lésions cutanées, principalement des ulcères, sur les parties exposées du corps, laissant des cicatrices à vie et de graves handicaps ou stigmatisation (OMS, 2020). Après l'inoculation, les promastigotes sont phagocytés par les cellules phagocytaires du système immunitaire. Ce processus induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui, à leur tour, activent les cellules à produire d'espèces réactives de l'azote et de l'oxygène pour tuer le parasite et contrôler l'infection (Cotterell, Engwerda et al. 2000, Torres-Guerrero, Quintanilla-Cedillo et al. 2017). Comprendre les mécanismes immunologiques de l'interaction hôte-pathogène est d'une importance primordiale pour la recherche et le développement de thérapies médicamenteuses, telles que de nouveaux médicaments qui ciblent les fonctions de l'hôte.

Les parasites *Leishmania* ont développé plusieurs mécanismes pour contourner les efforts des cellules de l'hôte pour restreindre la croissance des parasites et l'établissement de la maladie (Gupta, Oghumu et al. 2013). Dans le cas de LC, en général, l'activation des cellules T, la migration accrue des neutrophiles et des monocytes et les cytokines inflammatoires en réponse à l'agent pathogène, jouent un rôle important dans la guérison de la maladie (Charmoy, Hurrell et al. 2016, Lee, Charmoy et al. 2018). Nos résultats suggèrent que ce processus de réponse immunitaire active la CSH à se diviser en cellules de la lignée myéloïde afin de fournir des cellules qui migrent vers le site d'infection pour combattre le parasite. De plus, les monocytes et les macrophages jouent un rôle central dans la pathogenèse de toutes les formes de leishmaniose, y compris cutanée et viscérale. Par conséquent, cette étude présente également des preuves du rôle des cellules myéloïdes en tant que niche répliquative du parasite. Ceci est conforme aux découvertes récentes qui montrent que les macrophages ont pour fonction d'être une niche répliquative initiale, des effecteurs antimicrobiens, des immunorégulateurs et un refuge sûr pour les parasites qui persistent après la guérison clinique (Bogdan 2020, Lopes, Dos Santos et al. 2021).

Quand on regarde l'induction de l'hématopoïèse lors d'une infection, des travaux ont déjà montré que l'activation des cellules progénitrices hématopoïétiques de la MO et l'induction subséquente d'une hématopoïèse adaptée à l'infection et à l'inflammation peuvent entraîner des conséquences positives ou négatives sur la réponse immunitaire de l'hôte et la récupération hématopoïétique, selon le type et la durée du stimulus (Pietras, Mirantes-Barbeito et al. 2016,

Abidin, Hammami et al. 2017, Boettcher and Manz 2017, Takizawa and Manz 2017). Nous avons déjà montré que la myélopoïèse induite par l'infection favorisait l'expansion du parasite au cours de la LV expérimentale, notamment en augmentant la génération de monocytes hautement sensibles à l'infection par le parasite (Abidin, Hammami et al. 2017), et contribuait à la suppression des réponses des lymphocytes T (Hammami, Abidin et al. 2017). Notre hypothèse était que la dissémination des parasites vers la MO n'était pas strictement requise pour une réponse hématopoïétique et qu'une infection persistante par la *L. major* cutanée, favoriserait également la différenciation myéloïde. Nous avons constaté que l'infection intradermique de souris C57BL/6 dans l'oreille avec une souche persistante de *L. major* induit l'expansion des progéniteurs myéloïdes dans la MO et la rate contrairement à une infection avec une souche avec guérison spontanée, et favorise l'augmentation du nombre de cellules myéloïdes non seulement dans la lésion cutanée mais aussi dans la rate. Nos résultats suggèrent en outre une suppression des réponses inflammatoires à des moments tardifs chez les souris infectées par la souche persistante, soulignent l'importance de prendre en compte l'altération de la production cellulaire dans la MO lors de l'analyse des interactions hôte-pathogène *in vivo*.

Il a été suggéré que la myélopoïèse améliorée contribue à la prolifération du parasite *Leishmania* en générant des « cibles sûres », ou des cellules permissives dans lesquelles le parasite peut se cacher de l'hôte de la réponse immunitaire, depuis un certain temps (Cotterell, Engwerda et al. 2000). Une fois la LV établie, l'infection chronique dans la MO est associée à des signes d'insuffisance de la MO si elle n'est pas traitée (Abidin, Hammami et al. 2017). L'impact d'une infection cutanée intradermique sur la fonction de la MO n'a pas été complètement étudié. Le rapport initial de Mirkovich et al. a trouvé de légères augmentations de l'activité de formation de colonies dans la rate mais pas dans la MO de souris C57BL/6 infectées par voie intracutanée avec un grand nombre (5×10^6) de promastigotes (Mirkovich, Galelli et al. 1986).

Nos résultats utilisant un plus petit nombre de parasites, mais plus riche de la forme infectieuse au point d'inoculation, car même si nous observons une augmentation des cellules progénitrices myéloïdes dans les deux organes, il n'y avait pas d'accumulation de cellules myéloïdes dans la MO. Ces résultats sont très similaires à ce que nous avons également rapporté sur le modèle murin de LV (Abidin, Hammami et al. 2017). En revanche, nous n'avons détecté aucun parasite viable dans la MO, de sorte que l'absence du parasite dans la MO suggère fortement que *L. major* reste confiné au derme cutané et aux ganglions lymphatiques drainants, comme on s'y attendait généralement. Une faiblesse de notre travail qui pourrait contribuer davantage à cette recherche serait de réaliser également une culture pour la

détection du parasite dans les ganglions lymphatiques, ce qui nous donnerait plus de certitude sur la cinétique d'infection dans d'autres organes importants dans la réponse immunitaire.

De faibles nombres de parasites *L. major* ont été signalés dans la rate par d'autres groupes utilisant d'autres souches du parasite, d'autres modes d'infection et/ou une dose de parasites plus élevée (Martinez-Lopez, Iborra et al. 2015, Paduch, Debus et al. 2019). Il reste donc possible que des méthodes de détection plus sensibles, telles que la PCR quantitative de gènes à nombre de copies élevé, donnent un résultat différent. Cependant, les méthodes basées sur la PCR sont également plus susceptibles de surestimer la quantité d'agents pathogènes viables et peuvent détecter le matériel génétique restant d'une infection avortée ou d'un contact récent avec l'agent pathogène qui a été éliminé (Pedrosa, Ximenes et al. 2013, Bullard, Dust et al. 2020). Plus précisément dans le cadre de notre étude, des cellules telles que les neutrophiles (Furze and Rankin 2008, De Filippo and Rankin 2020) ou les cellules dendritiques migratrices (Martinez-Lopez, Iborra et al. 2015), pourraient apporter du matériel parasitaire phagocyté de la peau ou des ganglions lymphatiques drainants vers la MO et la rate. Pour cette raison, nous avons décidé de réaliser une culture *in vitro* pour la détection du parasite dans la MO afin de mettre en évidence la présence du parasite et pas seulement le matériel génétique parasitaire ou un sous-produit de la réponse immunitaire à l'infection. Après tout, la présence du parasite dans la MO conduirait à une réponse immunitaire *in situ* et, au même temps, l'activation de la production de cellules myéloïdes afin de contrôler l'infection parasitaire sous-cutanée. Il est important de souligner que la clairance des neutrophiles dans la MO pour combattre une infection locale, pourrait aussi stimuler également une granulopoïèse supplémentaire (Furze and Rankin 2008).

Alors que la contribution des neutrophiles et des macrophages dermiques aux lésions persistantes dans l'oreille de souris infectée par *LmSd* a déjà été décrite (Sacks and Noben-Trauth 2002, Charmoy, Hurrell et al. 2016), l'importance de l'infiltration des monocytes n'a pas été établie. Les monocytes sont infectés par *L. amazonensis*, une autre espèce de *Leishmania* provoquant la LC (Carneiro, Lopes et al. 2020) et leur présence est requise pour l'expansion précoce du parasite dans ce modèle. Même si la souche persistante de *L. major* infecte préférentiellement les monocytes dermiques qui sont indépendants des monocytes circulants à des moments précoces, les macrophages issus de monocytes ou les neutrophiles sont également dans une plus grande mesure infectée par la souche avec guérison spontanée (Sacks and Noben-Trauth 2002, Charmoy, Hurrell et al. 2016). De plus, la contribution des monocytes au maintien des macrophages dermiques à des moments ultérieurs (après plus d'un

mois) ne peut être complètement exclue, car des expériences utilisant des chimères de la MO ont montré une contribution d'environ 25 % des cellules donneuses dérivées de la MO au compartiment macrophage dermique à 16 semaines (Lee, Charmoy et al. 2018).

La libération continue de cellules myéloïdes nouvellement différenciées de la MO vers la circulation pourrait également ne pas permettre leur accumulation dans la MO malgré leur synthèse améliorée. Contrairement à la MO, les monocytes et les cellules dérivées de monocytes se sont accumulés dans la rate des souris infectées par la souche *LmSd* persistante. Cette accumulation s'est également accompagnée d'une augmentation des cellules progénitrices myéloïdes, suggérant que certaines de ces cellules pourraient bien être le résultat d'une différenciation myéloïde dans la rate. Une étude a déjà été démontré dans le modèle hamster de la leishmaniose viscérale qu'au moins certaines des cellules myéloïdes s'accumulant dans la rate pouvaient être le résultat d'une prolifération intrasplénique (Osorio, Medina-Colorado et al. 2020); cependant, cela n'exclut pas la contribution potentielle d'une myélopoïèse accrue, car les cellules immatures sont plus susceptibles de proliférer que les cellules myéloïdes matures.

La Population des monocytes Ly6C⁺ CCR2⁺ peuvent devenir aussi des cellules hôtes pour le parasite. Une étude récente, utilisant un biocapteur pour mesurer la prolifération d'agents pathogènes dans les tissus vivants a révélé que les phagocytes Ly6C + CCR2 + dérivés de monocytes exprimant CD11c constituaient le principal type de cellule hébergeant *L. major* à prolifération rapide dans une infection en cours. La recherche a montré que les cellules hôtes nouvellement recrutées étaient infectées quel que soit leur type cellulaire ou leur stade de maturation si bien que parmi ces cellules, les monocytes qui expriment le CD11c sont plus permissifs à la prolifération des pathogènes et donc alimentent principalement la prolifération intracellulaire et la prolifération cellulaire et le transfert de cellule à cellule au cours d'une infection aiguë. Ainsi, les cellules dérivées de monocytes qui expriment CD11c seraient un réservoir pour les parasites à prolifération rapide qui se propagent au site de l'infection (Heyde, Philipsen et al. 2018).

Nos résultats montrent une accumulation de plaquettes et une augmentation de la cellularité globale de la rate chez les souris infectées par la souche *LmSd*, suggérant en outre que la rate pourrait être un site d'hématopoïèse active dans la leishmaniose cutanée persistante. L'hématopoïèse extra-médullaire est courante lorsqu'il y a une inflammation chronique dans la MO et l'exportation spécifique de cellules progénitrices à fort potentiel de mégacaryopoïèse, ou de production de plaquettes, a été rapportée en réponse à une signalisation inflammatoire aiguë

pour favoriser la récupération plaquettaire (Haas, Hansson et al. 2015). Une étude de 2011 suggère que les plaquettes peuvent également influencer le système immunitaire contre l'infection par la *L. major*. La sous-population de monocytes GR1 (Ly6C) qu'est rapidement recrutée dans les lésions pour tuer efficacement les parasites *L. major* dépend du récepteur de chimiokine CCR2 et de l'activation des plaquettes. Les plaquettes activées sécrètent un facteur de croissance dérivé des plaquettes, qui induit la libération rapide de CCL2 par les leucocytes et les cellules mésenchymateuses. Ainsi, cette découverte nous éveille également à comprendre le rôle des plaquettes dans la réponse contre *L. major* car le recrutement sélectif d'une sous-population de monocytes effecteurs à partir du sang pour tuer efficacement ce parasite intracellulaire, pourrait contenir la participation des plaquettes (Goncalves, Zhang et al. 2011).

Concernant l'infection dans l'oreilles des souris, nos résultats identifient un sous-ensemble de cellules myéloïdes Sca-1 + CD71 + MHC-II + qui est assez spécifique pour les souris infectées par la souche *LmSd* persistante et nous proposons qu'il représente un sous-ensemble dérivé de monocytes qui a régulé à la hausse l'expression de Sca-1 *in situ* en réponse à l'infection, car nous avons précédemment observé que l'infection par *Leishmania* seule était suffisante pour favoriser l'expression de Sca-1 *in vitro* (Abidin, Hammami et al. 2017). La régulation à la hausse de l'expression de Sca-1 et du CMH-II par les monocytes a également été associée à l'acquisition d'une fonction régulatrice dans l'infection à *Toxoplasma gondii* (Askenase, Han et al. 2015), tandis que les cellules myéloïdes Sca-1+ contribuent aux lésions tissulaires et à la mortalité lors d'une infection expérimentale par *Staphylococcus aureus* (Park, Kim et al. 2020). La connaissance de ces études suggère que les cellules myéloïdes Sca-1+ et CMH-II+ de la peau pourraient représenter des « *safe houses* » pour la *L. major*. L'expression de CD71 a été liée aux monocytes activés ainsi qu'aux macrophages tissulaires et des niveaux élevés de CD71 ont été rapportés, par exemple, chez des patients atteints de leishmaniose dermique post-Kala Azar, à la fois dans les lésions cutanées et dans les monocytes circulants (Dighal, Mukhopadhyay et al. 2020). Une recherche possible que nous pouvons faire à l'avenir serait de réaliser une infection et culture *in vitro* de cellules qui expriment Sca-1 et CMH-II et aussi CD71 pour déterminer si ces types de cellules seraient, d'une certaine manière, une adaptation de survie du parasite contre leur élimination. En même temps, caractériser le rôle des monocytes de fonction régulatrice et établir des relations avec la sévérité de l'infection par la souche résistante pour l'analyse de l'infection et l'évaluation des cytokines régulatrices.

Le contrôle de la LC dépend fortement de réponses Th1 précoces et efficaces dans la peau et dans les ganglions lymphatiques drainants (Kaye and Scott 2011, Martinez-Lopez,

Iborra et al. 2015, Charmoy, Hurrell et al. 2016). Une réponse Th1 inefficace, comme celle observée chez les individus immunodéprimés (Barro-Traore, Preney et al. 2008), chez les souches de souris génétiquement modifiées (Martinez-Lopez, Iborra et al. 2015) ou chez la souche de souris Balb/c sensible (Sacks and Noben-Trauth 2002, Kaye and Scott 2011), entraîne une propagation systémique, en particulier avec une charge parasitaire élevée. La population lymphocytaire dans le derme reste majoritairement biaisée en Th1 même dans l'infection persistante à *L. major* (Lee, Charmoy et al. 2018); cependant, la production de cytokines dans ce cas a été évaluée par coloration intracellulaire de lymphocytes restimulés par PMA/ionomycine et représente ainsi plus précisément la production potentielle plutôt que réelle *in vivo*. Les cellules suppressives myéloïdes dérivées de neutrophiles et de monocytes peuvent inhiber les réponses lymphocytaires spécifiques à l'agent pathogène et contribuer aux lésions tissulaires (Norris, Uebelhoer et al. 2013, Hammami, Abidin et al. 2017, Park, Kim et al. 2020) et pourraient ainsi contribuer à favoriser la persistance du parasite et le développement de lésions cutanées en cas d'infection persistante. Enfin et surtout, les lymphocytes T CD8+ sont également importants au cours de l'infection par *L. major*, certaines études ont également indiqué que les cellules T CD8+ jouent un rôle vital dans la défense immunitaire par la production de cytokines et leur activité cytotoxique et la production excessive de médiateurs pro-inflammatoires favorisent un recrutement amplifié de cellules. Cela pourrait être corrélé à une réaction inflammatoire excessive et aboutir finalement à la destruction des tissus et au développement de l'immunopathogenèse (Sacks and Noben-Trauth 2002, Maspi, Abdoli et al. 2016, Dayakar, Chandrasekaran et al. 2019).

L'activation des CSH et de la monopoïèse accrue dans la LV ont été attribuées au recrutement de lymphocytes T CD4+ producteurs d'IFN- γ dans la MO (Pinto, Brown et al. 2017, Romano, Brown et al. 2021). Nous n'avons observé aucune accumulation de lymphocytes T CD4+ dans la MO des souris infectées par les deux souches, mais cela ne prouve pas à lui seul qu'il ne pourrait pas y avoir d'augmentation spécifique des cellules productrices d'IFN- γ , même si l'IFN- γ libre les niveaux étaient très faibles dans le plasma de la MO. Cependant, il y avait une diminution significative des facteurs sensibles à l'IFN- γ , tels que CXCL9/MIG et CXCL10/IP-10, dans la MO des souris infectées par le *LmSd*, suggérant que la réponse à l'IFN- γ était atténuée en cas d'infection persistante. Une approche expérimentale que nous pourrions utiliser à l'avenir pour comprendre cette réponse atténuée à l'IFN- γ serait d'effectuer un scRNA-seq car cette technique nous permettrait de caractériser des populations cellulaires hétérogènes, de reconstruire des trajectoires de développement cellulaire et de comprendre la modélisation de

la dynamique de la transcription. Le rôle de l'IFN- γ dans la myélopoïèse reste dépendant du contexte, ce qui rend difficile l'interprétation de l'importance fonctionnelle de notre découverte. D'une part, l'IFN- γ est important pour l'amorçage des macrophages et les réponses effectrices microbicides, y compris la régulation positive d'iNOS, une enzyme clé pour le contrôle de la prolifération des leishmanies (Murray and Nathan 1999, Sacks and Noben-Trauth 2002, Kaye and Scott 2011, Kima and Soong 2013, Paduch, Debus et al. 2019).

Les parasites *Leishmania* sont également bien connus pour leur capacité à supprimer la réponse des cellules hôtes à l'IFN γ pour favoriser leur survie à l'intérieur des macrophages infectés (Dogra, Warburton et al. 2007, Matte and Descoteaux 2010). Des réponses l'IFN- γ réduites dans la MO, en particulier chez les souris infectées par la souche persistante, indiqueraient ainsi une capacité réduite à contrôler le parasite, en particulier si cette réactivité réduite est transportée vers le derme cutané et cela serait possible grâce à modification épigénétiques et « *trained immunity* » ou la mémoire des cellules du système inné (Dos Santos, Barroso de Figueiredo et al. 2019, Khan, Downey et al. 2020). D'autre part, une exposition précoce à l'IFN- γ au cours de la différenciation myéloïde peut également avoir un impact négatif sur la fonction des monocytes, comme le montre l'induction de monocytes régulateurs dans le modèle murin de la toxoplasmose (Askenase, Han et al. 2015). Une alternative à l'avenir pour évaluer les changements épigénétiques serait de vérifier si les progéniteurs myéloïdes de souris infectées contiennent ces changements épigénétiques via ATAC-seq, méthylome de l'ADN, etc., puis d'évaluer si la voie de l'IFN- γ pourrait être spécifiquement impliquée ou régulée négativement l'expression du récepteur ou la surexpression de régulateurs négatifs par détection de l'IFN- γ en culture *in vitro*. De futures études examinant le rôle fonctionnel des progéniteurs myéloïdes dans la MO et la rate de souris infectées par *LmSd* devraient nous permettre de répondre à nombreuses questions : Si on part de l'hypothèse que les cellules myéloïdes sont plus sensibles à l'infection, on pourrait isoler les cellules myéloïdes soit de la peau, soit de la moelle osseuse (Abidin, Hammami et al. 2017) ou encore de la rate, ainsi que les progéniteurs et les exposer au parasite en culture pour vérifier quelles cellules et de quels organes sont les plus sensibles à l'infection ainsi que la production de l'IFN- γ .

En bref, la réponse immunitaire à l'infection par *Leishmania* initiée par les cellules immunitaires innées, suivies d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire est principalement cruciale pour un contrôle efficace de l'infection à leishmanie, et par conséquent, les cellules T sont vitales pour le développement de la résistance. Par ailleurs, nos résultats indiquent que la présence d'une infection active et généralisée dans la MO n'est pas nécessaire pour l'induction d'une réponse hématopoïétique adaptée à l'infection et soulignent l'importance de considérer les

altérations hématopoïétiques lors de l'analyse *in vivo* des interactions hôte-pathogène. Afin d'obtenir des données plus significatives concernant la nature de la réponse immunitaire responsable par la guérison ou par la susceptibilité aux infections par LC, d'autres études approfondies des modèles murins à l'infection humaine axées sur la modulation immunitaire liés à l'augmentation et l'induction de la lignée méloïdé, aux cellules immunosuppressives, la production de cytokines et d'anticorps qui composent le processus de réponse immunitaire, devraient être menées pour développer de meilleures options thérapeutiques et stratégies vaccinales à cette maladie tropicale négligée, une de plus importante.

5 CONCLUSION

Ce projet de maîtrise visait à comprendre l'activation des CSH et les cellules immunitaires impliquées dans le processus d'activation à partir d'un modèle murin d'une infection cutanée par le parasite *L. major* ainsi qu'à caractériser la réponse dans les premières heures de l'infection et également lorsque l'infection parasitaire devient chronique, en utilisant deux souches de parasites : une auto-curable autre persistant. Nos résultats ont été générés après l'inoculation intradermique de *L. major* et montrent l'accumulation de cellules progénitrices à prédisposition myéloïde et de cellules myéloïdes matures chez des souris infectées par la souche *LmSd*, provoquant des lésions persistantes par rapport aux souris infectées par une souche transitoire ou à des contrôles naïfs. Ces résultats démontrent que la présence de l'agent pathogène dans la MO n'est pas requise pour l'induction d'une réponse hématopoïétique adaptée à l'infection et soulignent l'importance de prendre en compte les altérations hématopoïétiques lors de l'analyse des interactions hôte- pathogène *in vivo*.

La réponse immunitaire à l'infection par la *L. major* est principalement initiée par les cellules immunitaires innées suivies par la réponse immunitaire humorale. La réponse immunitaire innée et à médiation cellulaire est principalement cruciale pour un contrôle efficace de l'infection, de sorte que comprendre les effets de l'infection sur la peau et en particulier sur la MO, où se trouvent les cellules souches hématopoïétiques qui produisent, en plus des globules rouges et des plaquettes, les leucocytes qui font partie du système immunitaire, est extrêmement important pour comprendre la physiopathologie de la maladie. Dans l'ensemble, cette recherche a montré que l'infection cutanée persistante par le parasite *L. major* souche Seidman provoque une l'expansion des progéniteurs myéloïdes dans la MO et la rate, et favorise l'augmentation du nombre de cellules myéloïdes dans la lésion cutanée et dans la rate, de plus, nos résultats suggèrent une suppression des réponses inflammatoires par la souche persistante dans le jour 56. Un point important sur lequel réfléchir serait de surveiller les niveaux de cytokines et de chimiokines dans la lésion et dans la rate au jour 56. Analyses futures afin de comparer si les niveaux de cytokines et chimiokines seraient différents de la MO, ou même si d'autres cytokines et chimiokines agiraient dans le processus infectieux chronique, nous permettrait de vérifier si la suppression, mise en évidence dans la MO, arriverait aussi *in situ* et dans un autre organe hématopoïétique.

Une autre observation relevant de cette recherche est lié à l'immunoprotection par des cytokines et leur production amplifiée peut conduire simultanément à une immunopathogénèse.

La production excessive de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires conduit à un recrutement amplifié de cellules du sang, de sorte que la production accrue de cytokines pro-inflammatoires pourrait être associée à une réaction inflammatoire excessive et éventuellement altérer la destruction des tissus et le développement des lésions après une infection par *Leishmania*, de sorte que, la suppression des réponses dans notre modèle pourrait représenter une forme de compromis pour limiter les dommages tissulaires ou la tolérance, étant donné que le parasite n'a pas l'intention de détruire l'hôte.

Comprendre les mécanismes immunologiques associés à l'infection à *L. major*, nous permettra de réfléchir aux thérapies qui peuvent être utilisées pour contrôler l'infection. L'administration de cytokines, par exemple, pourrait être une approche possible pour modifier les effets biologiques associés aux maladies immunitaires, ainsi qu'un développement possible de la culture cellulaire *in vitro* de CSH pour cette production de cytokines en réponse à *Leishmania* pourraient, par exemple, constituer des thérapies potentielles à l'avenir. En bref, l'objectif général de cette recherche serait de signaler l'importance dans les études des cellules myéloïdes et des cytokines et chimiokines produites pour contrôler l'infection parasitaire afin, par exemple, de nous permettre de produire des thérapies basées sur ces substances qui pourraient être utilisées comme médicaments pour contrôler et même éradiquer l'infection, en particulier chez les patients immunodéprimés. Afin d'obtenir des données plus significatives concernant la nature de la réponse immunitaire responsable de la guérison ou de la susceptibilité aux infections à LC, d'autres études approfondies allant de modèles murins à l'infection humaine axées sur la modulation immunitaire peut être utile pour la possibilité de développer des stratégies vaccinales ou thérapeutiques pour ce type de maladie tropicale négligée qui touche une grande partie de la population mondiale.



 **microorganisms**
an Open Access Journal by MDPI

CERTIFICATE OF ACCEPTANCE

Certificate of acceptance for the manuscript (**microorganisms-1561302**) titled:
Persistent cutaneous *Leishmania major* infection promotes infection-adapted
myelopoiesis

Authored by:
Fabio Luis Bandeira Ferreira; Olivier Séguin; Albert Descoteaux; Krista M. Heinonen

has been accepted in *Microorganisms* (ISSN 2076-2607) on 26 February 2022

 **MDPI** Academic Open Access Publishing
since 1996

Basel, February 2022

7 BIBLIOGRAPHIE

Abidin, B. M., A. Hammami, S. Stäger and K. M. Heinonen (2017). "Infection-adapted emergency hematopoiesis promotes visceral leishmaniasis." PLoS Pathog **13**(8): e1006422.

Abramson, S., R. G. Miller and R. A. Phillips (1977). "The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems." J Exp Med **145**(6): 1567-1579.

Adolfsson, J., O. J. Borge, D. Bryder, K. Theilgaard-Mönch, I. Astrand-Grundström, E. Sitnicka,

Y. Sasaki and S. E. Jacobsen (2001). "Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity." Immunity **15**(4): 659-669.

Adolfsson, J., R. Mansson, N. Buza-Vidas, A. Hultquist, K. Liuba, C. T. Jensen, D. Bryder, L. Yang, O. J. Borge, L. A. Thoren, K. Anderson, E. Sitnicka, Y. Sasaki, M. Sigvardsson and S. E. Jacobsen (2005). "Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment." Cell **121**(2): 295-306.

Alemayehu, B. and M. Alemayehu (2017). "Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host." Health Science Journal **Vol.11**.

Anand, M., S. K. Chodda, P. M. Parikh and J. S. Nadkarni (1998). "Abnormal levels of proinflammatory cytokines in serum and monocyte cultures from patients with chronic myeloid leukemia in different stages, and their role in prognosis." Hematol Oncol **16**(4): 143-154.

Asada, N., S. Takeishi and P. S. Frenette (2017). "Complexity of bone marrow hematopoietic stem cell niche." Int J Hematol **106**(1): 45-54.

Asami, M., M. Owhashi, T. Abe and Y. Nawa (1992). "A comparative study of the kinetic changes of hemopoietic stem cells in mice infected with lethal and non-lethal malaria." Int J Parasitol **22**(1):43-47.

Askenase, M. H., S. J. Han, A. L. Byrd, D. Morais da Fonseca, N. Bouladoux, C. Wilhelm, J. E. Konkel, T. W. Hand, N. Lacerda-Queiroz, X. Z. Su, G. Trinchieri, J. R. Grainger and Y. Belkaid (2015). "Bone-Marrow-Resident NK Cells Prime Monocytes for Regulatory Function during Infection." Immunity **42**(6): 1130-1142.

Babicki, S., D. Arndt, A. Marcu, Y. Liang, J. R. Grant, A. Maciejewski and D. S. Wishart (2016). "Heatmapper: web-enabled heat mapping for all." Nucleic Acids Res **44**(W1): W147-153.

Baldrige, M. T., K. Y. King, N. C. Boles, D. C. Weksberg and M. A. Goodell (2010). "Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN-gamma in response to chronic infection." Nature **465**(7299): 793-797.

Barro-Traore, F., L. Preney, A. Traore, H. Darie, P. Tapsoba, A. Bassole, S. Sawadogo, P. Niamba, E. Grosshans and M. Geniaux (2008). "Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major* involving the bone marrow in an AIDS patient in Burkina Faso." Annales De Dermatologie Et De Venereologie **135**(5): 380-383.

Batsivari, A., M. L. R. Haltalli, D. Passaro, C. Pospori, C. Lo Celso and D. Bonnet (2020). "Dynamic responses of the haematopoietic stem cell niche to diverse stresses." Nat Cell Biol **22**(1): 7-17.

Belkaid, Y., S. Mendez, R. Lira, N. Kadambi, G. Milon and D. Sacks (2000). "A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity." J Immunol **165**(2): 969-977.

Boettcher, S., R. C. Gerosa, R. Radpour, J. Bauer, F. Ampenberger, M. Heikenwalder, M. Kopf and M. G. Manz (2014). "Endothelial cells translate pathogen signals into G-CSF-driven emergency granulopoiesis." Blood **124**(9): 1393-1403.

Boettcher, S. and M. G. Manz (2016). "Sensing and translation of pathogen signals into demand-adapted myelopoiesis." Curr Opin Hematol **23**(1): 5-10.

Boettcher, S. and M. G. Manz (2017). "Regulation of Inflammation- and Infection-Driven Hematopoiesis." Trends Immunol **38**(5): 345-357.

Bogdan, C. (2020). "Macrophages as host, effector and immunoregulatory cells in leishmaniasis: Impact of tissue micro-environment and metabolism." Cytokine X **2**(4): 100041.

Bonnet, D. (2002). "Haematopoietic stem cells." J Pathol **197**(4): 430-440.

Bruns, I., D. Lucas, S. Pinho, J. Ahmed, M. P. Lambert, Y. Kunisaki, C. Scheiermann, L. Schiff,

M. Poncz, A. Bergman and P. S. Frenette (2014). "Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion." Nat Med **20**(11): 1315-1320.

Brys, L., A. Beschin, G. Raes, G. H. Ghassabeh, W. Noël, J. Brandt, F. Brombacher and P. De Baetselier (2005). "Reactive oxygen species and 12/15-lipoxygenase contribute to the antiproliferative capacity of alternatively activated myeloid cells elicited during helminth infection." J Immunol **174**(10): 6095-6104.

Bullard, J., K. Dust, D. Funk, J. E. Strong, D. Alexander, L. Garnett, C. Boodman, A. Bello, A. Hedley, Z. Schiffman, K. Doan, N. Bastien, Y. Li, P. G. Van Caesele and G. Poliquin (2020). "Predicting Infectious Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 From Diagnostic Samples." Clin Infect Dis **71**(10): 2663-2666.

Burza, S., S. L. Croft and M. Boelaert (2018). "Leishmaniasis." Lancet **392**(10151): 951-970.

Busch, F. W., W. Mutter, U. H. Koszinowski and M. J. Reddehase (1991). "Rescue of myeloid lineage-committed progenitor cells from cytomegalovirus-infected bone marrow stroma." J Virol **65**(2): 981-984.

Buza-Vidas, N., J. Antonchuk, H. Qian, R. Månsson, S. Luc, S. Zandi, K. Anderson, S. Takaki, J.

M. Nygren, C. T. Jensen and S. E. Jacobsen (2006). "Cytokines regulate postnatal hematopoietic stem cell expansion: opposing roles of thrombopoietin and LNK." Genes Dev **20**(15): 2018-2023.

Calvi, L. M., G. B. Adams, K. W. Weibrecht, J. M. Weber, D. P. Olson, M. C. Knight, R. P. Martin,

E. Schipani, P. Divieti, F. R. Bringhurst, L. A. Milner, H. M. Kronenberg and D. T. Scadden (2003). "Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche." Nature **425**(6960): 841-846.

Capel, B., R. G. Hawley and B. Mintz (1990). "Long- and short-lived murine hematopoietic stem cell clones individually identified with retroviral integration markers." Blood **75**(12): 2267-2270.

Capitano, M. L. (2019). "Toll-like receptor signaling in hematopoietic stem and progenitor cells." Curr Opin Hematol **26**(4): 207-213.

Carneiro, M. B., M. E. Lopes, L. S. Hohman, A. Romano, B. A. David, R. Kratofil, P. Kubes, M. L. Workentine, A. C. Campos, L. Q. Vieira and N. C. Peters (2020). "Th1-Th2 Cross-Regulation Controls Early Leishmania Infection in the Skin by Modulating the Size of the Permissive Monocytic Host Cell Reservoir." Cell Host Microbe **27**(5): 752-768 e757.

Carvalho-Gontijo, R., D. R. Moreira, M. Resende, M. F. Costa-Silva, V. Peruhype-Magalhães, C.

M. F. Ribeiro, D. D. Ribeiro, R. Silvestre, A. Cordeiro-da-Silva, O. A. Martins-Filho and A. Teixeira-Carvalho (2018). "Infection of hematopoietic stem cells by *Leishmania infantum* increases erythropoiesis and alters the phenotypic and functional profiles of progeny." Cell Immunol **326**: 77-85.

Castellucci, L., S. E. Jamieson, L. Almeida, J. Oliveira, L. H. Guimarães, M. Lessa, M. Fakiola, A. R. Jesus, E. Nancy Miller, E. M. Carvalho and J. M. Blackwell (2012). "Wound healing genes and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil." Infect Genet Evol **12**(5): 1102-1110.

Chang, M. K., L. J. Raggatt, K. A. Alexander, J. S. Kuliwaba, N. L. Fazzalari, K. Schroder, E. R. Maylin, V. M. Ripoll, D. A. Hume and A. R. Pettit (2008). "Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo." J Immunol **181**(2): 1232-1244.

Charmoy, M., B. P. Hurrell, A. Romano, S. H. Lee, F. Ribeiro-Gomes, N. Riteau, K. Mayer-Barber, F. Tacchini-Cottier and D. L. Sacks (2016). "The Nlrp3 inflammasome, IL-1beta, and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a nonhealing strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice." Eur J Immunol **46**(4): 897-911.

Chavakis, T., I. Mitroulis and G. Hajishengallis (2019). "Hematopoietic progenitor cells as integrative hubs for adaptation to and fine-tuning of inflammation." Nat Immunol **20**(7): 802-811.

Cheng, H., Z. Zheng and T. Cheng (2020). "New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation." Protein Cell **11**(1): 34-44.

Chiba, Y., I. Mizoguchi, H. Hasegawa, M. Ohashi, N. Orii, T. Nagai, M. Sugahara, Y. Miyamoto,

M. Xu, T. Owaki and T. Yoshimoto (2018). "Regulation of myelopoiesis by proinflammatory cytokines in infectious diseases." Cell Mol Life Sci **75**(8): 1363-1376.

Claborn, D. M. (2010). "The biology and control of leishmaniasis vectors." J Glob Infect Dis **2**(2):127-134.

Clark, C. R., B. D. Chen and D. L. Boros (1988). "Macrophage progenitor cell and colony-stimulating factor production during granulomatous schistosomiasis mansoni in mice." Infect Immun **56**(10): 2680-2685.

Cotterell, S. E., C. R. Engwerda and P. M. Kaye (2000). "Enhanced hematopoietic activity accompanies parasite expansion in the spleen and bone marrow of mice infected with *Leishmania donovani*." Infect Immun **68**(4): 1840-1848.

Cotterell, S. E., C. R. Engwerda and P. M. Kaye (2000). "*Leishmania donovani* infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF- α ." Blood **95**(5): 1642-1651.

Dayakar, A., S. Chandrasekaran, S. V. Kuchipudi and S. K. Kalangi (2019). "Cytokines: Key Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy." Front Immunol **10**: 670.

de Bruin, A. M., Ö. Demirel, B. Hooibrink, C. H. Brandts and M. A. Nolte (2013). "Interferon- γ impairs proliferation of hematopoietic stem cells in mice." Blood **121**(18): 3578-3585.

de Bruin, A. M., S. F. Libregts, M. Valkhof, L. Boon, I. P. Touw and M. A. Nolte (2012). "IFN γ induces monopoiesis and inhibits neutrophil development during inflammation." Blood **119**(6): 1543-1554.

De Filippo, K. and S. M. Rankin (2020). "The Secretive Life of Neutrophils Revealed by Intravital Microscopy." Front Cell Dev Biol **8**: 603230.

de Kruijf, E. F. M., W. E. Fibbe and M. van Pel (2020). "Cytokine-induced hematopoietic stem and progenitor cell mobilization: unraveling interactions between stem cells and their niche." Ann N Y Acad Sci **1466**(1): 24-38.

Dighal, A., D. Mukhopadhyay, R. Sengupta, S. Moulik, S. Mukherjee, S. Roy, S. J. Chaudhuri, N. K. Das and M. Chatterjee (2020). "Iron trafficking in patients with Indian Post kala-azar dermal leishmaniasis." PLoS Negl Trop Dis **14**(2): e0007991.

Dogra, N., C. Warburton and W. R. McMaster (2007). "Leishmania major abrogates gamma interferon-induced gene expression in human macrophages from a global perspective." Infect Immun **75**(7): 3506-3515.

Dos Santos, J. C., A. M. Barroso de Figueiredo, M. V. Teodoro Silva, B. Cirovic, L. C. J. de Bree, M. S. M. A. Damen, S. J. C. F. Moorlag, R. S. Gomes, M. M. Helsen, M. Oosting, S. T. Keating, A. Schlitzer, M. G. Netea, F. Ribeiro-Dias and L. A. B. Joosten (2019). "β-Glucan-Induced Trained Immunity Protects against Leishmania braziliensis Infection: a Crucial Role for IL-32." Cell Rep **28**(10): 2659-2672.e2656.

Dufour, C., A. Corcione, J. Svahn, R. Haupt, V. Poggi, A. N. Béka'ssy, R. Scimè, A. Pistorio and V. Pistoia (2003). "TNF-alpha and IFN-gamma are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF-alpha suppresses erythropoiesis in vitro." Blood **102**(6): 2053-2059.

Dutra, H. S., M. C. El-Cheikh, S. P. Azevedo, M. I. Rossi and R. Borojevic (1998). "Murine schistosomiasis mansoni: experimental analysis of bone marrow and peripheral myelopoiesis." Parasitol Res **84**(8): 668-675.

Dutra, H. S., M. I. Rossi, S. P. Azevedo, M. C. el-Cheikh and R. Borojevic (1997). "Haematopoietic capacity of colony-forming cells mobilized in hepatic inflammatory reactions as compared to that of normal bone marrow cells." Res Immunol **148**(7): 437-444.

Essers, M. A., S. Offner, W. E. Blanco-Bose, Z. Waibler, U. Kalinke, M. A. Duchosal and A.

Trumpp (2009). "IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo." Nature **458**(7240): 904-908.

Furze, R. C. and S. M. Rankin (2008). "The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse." FASEB J **22**(9): 3111-3119.

Ghorbani, M. and R. Farhoudi (2018). "Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?" Drug Des Devel Ther **12**: 25-40.

Giudice, A., C. Vendrame, C. Bezerra, L. P. Carvalho, T. Delavechia, E. M. Carvalho and O. Bacellar (2012). "Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection." BMC Infect Dis **12**: 75.

Goncalves, R., X. Zhang, H. Cohen, A. Debrabant and D. M. Mosser (2011). "Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection." J Exp Med **208**(6): 1253-1265.

Goñi, O., P. Alcaide and M. Fresno (2002). "Immunosuppression during acute *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of Ly6G (Gr1(+))CD11b(+) immature myeloid suppressor cells." Int Immunol **14**(10): 1125-1134.

Grassinger, J., B. Williams, G. H. Olsen, D. N. Haylock and S. K. Nilsson (2012). "Granulocyte colony stimulating factor expands hematopoietic stem cells within the central but not endosteal bone marrow region." Cytokine **58**(2): 218-225.

Guilliams, M., K. Movahedi, T. Bosschaerts, T. VandenDriessche, M. K. Chuah, M. Hérin, A. Acosta-Sanchez, L. Ma, M. Moser, J. A. Van Ginderachter, L. Brys, P. De Baetselier and A. Beschin (2009). "IL-10 dampens TNF/inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cell-mediated pathogenicity during parasitic infection." J Immunol **182**(2): 1107-1118.

Gupta, G., S. Oghumu and A. R. Satoskar (2013). "Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis." Adv Appl Microbiol **82**: 155-184.

Haas, S., J. Hansson, D. Klimmeck, D. Loeffler, L. Velten, H. Uckelmann, S. Wurzer, A. M.

Prendergast, A. Schnell, K. Hexel, R. Santarella-Mellwig, S. Blaszkievicz, A. Kuck, H. Geiger, M. D. Milsom, L. M. Steinmetz, T. Schroeder, A. Trumpp, J. Krijgsveld and M. A. Essers (2015). "Inflammation-induced emergency megakaryopoiesis driven by hematopoietic stem cell-like megakaryocyte progenitors." Cell Stem Cell **17**(4): 422-434.

Hamburger, A. W. and R. B. Chen (1993). "Impaired ability of bone marrow cells from immunodeficient mice to establish long-term cultures." Br J Haematol **85**(4): 646-652.

Hammami, A., B. M. Abidin, T. Charpentier, A. Fabie, A.-P. Duguay, K. M. Heinonen and S. Stager (2017). "HIF-1 alpha is a key regulator in potentiating suppressor activity and limiting the microbicidal capacity of MDSC-like cells during visceral leishmaniasis." Plos Pathogens **13** (9).

Hammami, A., B. M. Abidin, T. Charpentier, A. Fabié, A. P. Duguay, K. M. Heinonen and S. Stäger (2017). "HIF-1 α is a key regulator in potentiating suppressor activity and limiting the microbicidal capacity of MDSC-like cells during visceral leishmaniasis." PLoS Pathog **13**(9): e1006616.

Heyde, S., L. Philipsen, P. Formaglio, Y. Fu, I. Baars, G. Höbbel, C. L. Kleinholz, E. A. Seiß, J. Stettin, P. Gintschel, A. Dudeck, P. Bouso, B. Schraven and A. J. Müller (2018). "CD11c-expressing Ly6C+CCR2+ monocytes constitute a reservoir for efficient Leishmania proliferation and cell-to-cell transmission." PLoS Pathog **14**(10): e1007374.

Hirche, C., T. Frenz, S. F. Haas, M. Doring, K. Borst, P. K. Tegtmeyer, I. Brizic, S. Jordan, K. Keyser, C. Chhatbar, E. Pronk, S. Lin, M. Messerle, S. Jonjic, C. S. Falk, A. Trumpp, M. A. G. Essers and U. Kalinke (2017). "Systemic Virus Infections Differentially Modulate Cell Cycle State and Functionality of Long-Term Hematopoietic Stem Cells In Vivo." Cell Rep **19**(11): 2345-2356.

Hofer, T. and H. R. Rodewald (2018). "Differentiation-based model of hematopoietic stem cell functions and lineage pathways." Blood **132**(11): 1106-1113.

Ishihara, K. and T. Hirano (2002). "IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease." Cytokine Growth Factor Rev **13**(4-5): 357-368.

Jordan, C. T. and I. R. Lemischka (1990). "Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse." Genes Dev **4**(2): 220-232.

Kawai, T. and S. Akira (2011). "Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity." Immunity **34**(5): 637-650.

Kaye, P. and P. Scott (2011). "Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface." Nat Rev Microbiol **9**(8): 604-615.

Khalil, R. M., A. Luz, R. Mailhammer, J. Moeller, A. A. Mohamed, S. Omran, P. Dörmer and L. Hültner (1996). "Schistosoma mansoni infection in mice augments the capacity for interleukin 3 (IL-3) and IL-9 production and concurrently enlarges progenitor pools for mast cells and granulocytes-macrophages." Infect Immun **64**(12): 4960-4966.

Khan, N., J. Downey, J. Sanz, E. Kaufmann, B. Blankenhaus, A. Pacis, E. Pernet, E. Ahmed, S. Cardoso, A. Nijnik, B. Mazer, C. Sasseti, M. A. Behr, M. P. Soares, L. B. Barreiro and M. Divangahi (2020). "M. tuberculosis Reprograms Hematopoietic Stem Cells to Limit Myelopoiesis and Impair Trained Immunity." Cell **183**(3): 752-770.e722.

Kiel, M. J., O. H. Yilmaz, T. Iwashita, C. Terhorst and S. J. Morrison (2005). "SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells." Cell **121**(7): 1109-1121.

Kima, P. E. and L. Soong (2013). "Interferon gamma in leishmaniasis." Front Immunol **4**: 156.

Kumar, R., V. Fossati, M. Israel and H. W. Snoeck (2008). "Lin-Sca1+kit- bone marrow cells contain early lymphoid-committed precursors that are distinct from common lymphoid progenitors." J Immunol **181**(11): 7507-7513.

Laranjeira-Silva, M. F., I. Hamza and J. M. Pérez-Victoria (2020). "Iron and Heme Metabolism at the Leishmania-Host Interface." Trends Parasitol **36**(3): 279-289.

Laurenti, E. and B. Gottgens (2018). "From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes." Nature **553**(7689): 418-426.

Lee, S. H., M. Charmoy, A. Romano, A. Paun, M. M. Chaves, F. O. Cope, D. A. Ralph and D. L. Sacks (2018). "Mannose receptor high, M2 dermal macrophages mediate nonhealing Leishmania

major infection in a Th1 immune environment." J Exp Med **215**(1): 357-375.

Lelchuk, R., R. Graveley and F. Y. Liew (1988). "Susceptibility to murine cutaneous leishmaniasis correlates with the capacity to generate interleukin 3 in response to leishmania antigen in vitro." Cell Immunol **111**(1): 66-76.

Leon, B., M. Lopez-Bravo and C. Ardavin (2007). "Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania." Immunity **26**(4): 519-531.

Lin, F. C., M. Karwan, B. Saleh, D. L. Hodge, T. Chan, K. C. Boelte, J. R. Keller and H. A. Young (2014). "IFN- γ causes aplastic anemia by altering hematopoietic stem/progenitor cell composition and disrupting lineage differentiation." Blood **124**(25): 3699-3708.

Lopes, M. E., L. M. Dos Santos, D. Sacks, L. Q. Vieira and M. B. Carneiro (2021). "Resistance Against." Front Immunol **12**: 730437.

Maeda, K., Y. Baba, Y. Nagai, K. Miyazaki, A. Malykhin, K. Nakamura, P. W. Kincade, N. Sakaguchi and K. M. Coggeshall (2005). "IL-6 blocks a discrete early step in lymphopoiesis." Blood **106**(3): 879-885.

Mann, M., A. Mehta, C. G. de Boer, M. S. Kowalczyk, K. Lee, P. Haldeman, N. Rogel, A. R. Knecht, D. Farouq, A. Regev and D. Baltimore (2018). "Heterogeneous Responses of Hematopoietic Stem Cells to Inflammatory Stimuli Are Altered with Age." Cell Rep **25**(11): 2992-3005.e2995.

Manz, M. G. and S. Boettcher (2014). "Emergency granulopoiesis." Nat Rev Immunol **14**(5): 302-314.

Martinez-Lopez, M., S. Iborra, R. Conde-Garrosa and D. Sancho (2015). "Batf3-dependent CD103+ dendritic cells are major producers of IL-12 that drive local Th1 immunity against Leishmania major infection in mice." Eur J Immunol **45**(1): 119-129.

Maspi, N., A. Abdoli and F. Ghaffarifar (2016). "Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous

leishmaniasis: a review." Pathog Glob Health **110**(6): 247-260.

Matatall, K. A., C. C. Shen, G. A. Challen and K. Y. King (2014). "Type II interferon promotes differentiation of myeloid-biased hematopoietic stem cells." Stem Cells **32**(11): 3023-3030.

Matnani, R. and K. A. Ganapathi (2016). "Hemophagocytic lymphohistiocytosis associated with visceral leishmaniasis." Blood **127**(4): 513-513.

Matte, C. and A. Descoteaux (2010). "Leishmania donovani amastigotes impair gamma interferon-induced STAT1alpha nuclear translocation by blocking the interaction between STAT1alpha and importin-alpha5." Infect Immun **78**(9): 3736-3743.

McCabe, A. and K. C. MacNamara (2016). "Macrophages: Key regulators of steady-state and demand-adapted hematopoiesis." Exp Hematol **44**(4): 213-222.

McCabe, A., Y. Zhang, V. Thai, M. Jones, M. B. Jordan and K. C. MacNamara (2015). "Macrophage-Lineage Cells Negatively Regulate the Hematopoietic Stem Cell Pool in Response to Interferon Gamma at Steady State and During Infection." Stem Cells **33**(7): 2294-2305.

McCulloch, E. A. and J. E. Till (2005). "Perspectives on the properties of stem cells." Nat Med **11**(10): 1026-1028.

Metcalf, D. (2008). "Hematopoietic cytokines." Blood **111**(2): 485-491.

Mirantes, C., E. Passequé and E. M. Pietras (2014). "Pro-inflammatory cytokines: emerging players regulating HSC function in normal and diseased hematopoiesis." Exp Cell Res **329**(2): 248-254.

Mirkovich, A. M., A. Galelli, A. C. Allison and F. Z. Modabber (1986). "Increased myelopoiesis during Leishmania major infection in mice: generation of 'safe targets', a possible way to evade the effector immune mechanism." Clin Exp Immunol **64**(1): 1-7.

Mitroulis, I., L. Kalafati, G. Hajishengallis and T. Chavakis (2018). "Myelopoiesis in the Context of Innate Immunity." J Innate Immun **10**(5-6): 365-372.

Morales-Mantilla, D. E. and K. Y. King (2018). "The Role of Interferon-Gamma in Hematopoietic Stem Cell Development, Homeostasis, and Disease." Curr Stem Cell Rep **4**(3): 264-271.

Morrison, S. J. and I. L. Weissman (1994). "The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype." Immunity **1**(8): 661-673.

Murray, H. W. and C. F. Nathan (1999). "Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*." J Exp Med **189**(4): 741-746.

Nagai, Y., K. P. Garrett, S. Ohta, U. Bahrn, T. Kouro, S. Akira, K. Takatsu and P. W. Kincade (2006). "Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment." Immunity **24**(6): 801-812.

Nagareddy, P. R., M. Kraakman, S. L. Masters, R. A. Stirzaker, D. J. Gorman, R. W. Grant, D. Dragoljevic, E. S. Hong, A. Abdel-Latif, S. S. Smyth, S. H. Choi, J. Korner, K. E. Bornfeldt, E. A. Fisher, V. D. Dixit, A. R. Tall, I. J. Goldberg and A. J. Murphy (2014). "Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytosis in obesity." Cell Metab **19**(5): 821-835.

Ng, A. P. and W. S. Alexander (2017). "Haematopoietic stem cells: past, present and future." Cell Death Discov **3**: 17002.

Niu, Q., S. Li, D. Chen, Q. Chen and J. Chen (2016). "Iron acquisition in *Leishmania* and its crucial role in infection." Parasitology **143**(11): 1347-1357.

Norris, B. A., L. S. Uebelhoer, H. I. Nakaya, A. A. Price, A. Grakoui and B. Pulendran (2013). "Chronic but not acute virus infection induces sustained expansion of myeloid suppressor cell numbers that inhibit viral-specific T cell immunity." Immunity **38**(2): 309-321.

Novais, F. O., L. P. Carvalho, S. Passos, D. S. Roos, E. M. Carvalho, P. Scott and D. P. Beiting (2015). "Genomic profiling of human *Leishmania braziliensis* lesions identifies transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology." J Invest Dermatol **135**(1): 94-101.

Noël, W., G. Raes, G. Hassanzadeh Ghassabeh, P. De Baetselier and A. Beschin (2004).

"Alternatively activated macrophages during parasite infections." Trends Parasitol **20**(3): 126-133.

Ogawa, M., F. Tajima, T. Ito, T. Sato, J. H. Laver and T. Deguchi (2001). "CD34 expression by murine hematopoietic stem cells. Developmental changes and kinetic alterations." Ann N Y Acad Sci **938**: 139-145.

Organization, W. H. (2020) "Leishmaniasis."Orkin, S. H. and L. I. Zon (2008). "Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology." Cell **132**(4): 631-644.

Osorio, E. Y., A. A. Medina-Colorado, B. L. Travi and P. C. Melby (2020). "In-situ proliferation contributes to the accumulation of myeloid cells in the spleen during progressive experimental visceral leishmaniasis." PLoS One **15**(11): e0242337.

Paduch, K., A. Debus, B. Rai, U. Schleicher and C. Bogdan (2019). "Resolution of Cutaneous Leishmaniasis and Persistence of *Leishmania major* in the Absence of Arginase 1." J Immunol **202**(5): 1453-1464.

Park, M. Y., H. S. Kim, H. Y. Lee, B. A. Zabel and Y. S. Bae (2020). "Novel CD11b(+)Gr-1(+)Sca-1(+) myeloid cells drive mortality in bacterial infection." Sci Adv **6**(4): eaax8820.

Pascutti, M. F., M. N. Erkelens and M. A. Nolte (2016). "Impact of Viral Infections on Hematopoiesis: From Beneficial to Detrimental Effects on Bone Marrow Output." Front Immunol **7**: 364.

Pearson, R. D. and A. Q. Sousa (1996). "Clinical spectrum of Leishmaniasis." Clin Infect Dis **22**(1): 1-13.

Pedrosa, C. M., R. A. Ximenes, W. A. Almeida and E. M. Rocha (2013). "Validity of the polymerase chain reaction in the diagnosis of clinically suspected cases of American visceral leishmaniasis." Braz J Infect Dis **17**(3): 319-323.

Peng, C., Y. Chen, Y. Shan, H. Zhang, Z. Guo, D. Li and S. Li (2012). "LSK derived LSK- cells have a high apoptotic rate related to survival regulation of hematopoietic and leukemic stem cells." PLoS One **7**(6): e38614.

Peterson, V. M., G. S. Madonna and S. N. Vogel (1992). "Differential myelopoietic responsiveness of BALB/c (Ity) and C.D2 (Ityr) mice to lipopolysaccharide administration and Salmonella typhimurium infection." *Infect Immun* 60(4): 1375-1384.

Pietras, E. M. (2017). "Inflammation: a key regulator of hematopoietic stem cell fate in health and disease." *Blood* 130(15): 1693-1698.

Pietras, E. M., R. Lakshminarasimhan, J. M. Techner, S. Fong, J. Flach, M. Binnewies and E. Passegue (2014). "Re-entry into quiescence protects hematopoietic stem cells from the killing effect of chronic exposure to type I interferons." *J Exp Med* 211(2): 245-262.

Pietras, E. M., R. Lakshminarasimhan, J. M. Techner, S. Fong, J. Flach, M. Binnewies and E. Passegué (2014). "Re-entry into quiescence protects hematopoietic stem cells from the killing effect of chronic exposure to type I interferons." *J Exp Med* 211(2): 245-262.

Pietras, E. M., C. Mirantes-Barbeito, S. Fong, D. Loeffler, L. V. Kovtonyuk, S. Zhang, R. Lakshminarasimhan, C. P. Chin, J. M. Techner, B. Will, C. Nerlov, U. Steidl, M. G. Manz, T. Schroeder and E. Passegue (2016). "Chronic interleukin-1 exposure drives haematopoietic stem cells towards precocious myeloid differentiation at the expense of self-renewal." *Nat Cell Biol* 18(6): 607-618.

Pietras, Eric M., D. Reynaud, Y.-A. Kang, D. Carlin, Fernando J. Calero-Nieto, Andrew D. Leavitt, Joshua M. Stuart, B. Göttgens and E. Passegué (2015). "Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions." *Cell Stem Cell* 17(1): 35-46.

Pinto, A. I., N. Brown, O. Preham, J. S. P. Doehl, H. Ashwin and P. M. Kaye (2017). "TNF signalling drives expansion of bone marrow CD4+ T cells responsible for HSC exhaustion in experimental visceral leishmaniasis." *PLoS Pathog* 13(7): e1006465.

Preham, O., F. A. Pinho, A. I. Pinto, G. F. Rani, N. Brown, I. S. Hitchcock, H. Goto and P. M. Kaye (2018). "CD4." *Front Immunol* 9: 2958.

Preham, O., F. A. Pinho, A. I. Pinto, G. F. Rani, N. Brown, I. S. Hitchcock, H. Goto and P. M. Kaye

(2018). "CD4(+) T Cells Alter the Stromal Microenvironment and Repress Medullary Erythropoiesis in Murine Visceral Leishmaniasis." *Front Immunol* 9: 2958.

Pronk, C. J., O. P. Veiby, D. Bryder and S. E. Jacobsen (2011). "Tumor necrosis factor restricts hematopoietic stem cell activity in mice: involvement of two distinct receptors." *J Exp Med* 208(8): 1563-1570.

Reynaud, D., E. Pietras, K. Barry-Holson, A. Mir, M. Binnewies, M. Jeanne, O. Sala-Torra, J. P. Radich and E. Passegué (2011). "IL-6 controls leukemic multipotent progenitor cell fate and contributes to chronic myelogenous leukemia development." *Cancer Cell* 20(5): 661-673.

Rezzoug, F., Y. Huang, M. K. Tanner, M. Wysoczynski, C. L. Schanie, P. M. Chilton, M. Z. Ratajczak, I. J. Fugier-Vivier and S. T. Ildstad (2008). "TNF-alpha is critical to facilitate hemopoietic stem cell engraftment and function." *J Immunol* 180(1): 49-57.

Ribeiro-Gomes, F. L. and D. Sacks (2012). "The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection." *Front Cell Infect Microbiol* 2: 59.

Robb, L. (2007). "Cytokine receptors and hematopoietic differentiation." *Oncogene* 26(47): 6715-6723.

Rogers, M. B., J. D. Hilley, N. J. Dickens, J. Wilkes, P. A. Bates, D. P. Depledge, D. Harris, Y. Her, P. Herzyk, H. Imamura, T. D. Otto, M. Sanders, K. Seeger, J. C. Dujardin, M. Berriman, D.

F. Smith, C. Hertz-Fowler and J. C. Mottram (2011). "Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*." *Genome Res* 21(12): 2129-2142.

Romano, A., N. Brown, H. Ashwin, J. S. P. Doehl, J. Hamp, M. Osman, N. Dey, G. F. Rani, T. R. Ferreira and P. M. Kaye (2021). "Interferon- γ -Producing CD4." *Front Immunol* 12: 700501.

Rose, S., A. Misharin and H. Perlman (2012). "A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment." *Cytometry A* 81(4): 343-350.

Sacks, D. and N. Noben-Trauth (2002). "The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice." *Nat Rev Immunol* 2(11): 845-858.

Schmid, M., N. Zimara, A. K. Wege and U. Ritter (2014). "Myeloid-derived suppressor cell functionality and interaction with *Leishmania major* parasites differ in C57BL/6 and BALB/c mice." *Eur J Immunol* 44(11): 3295-3306.

Schuettpelz, L. G., J. N. Borgerding, M. J. Christopher, P. K. Gopalan, M. P. Romine, A. C. Herman, J. R. Woloszynek, A. M. Greenbaum and D. C. Link (2014). "G-CSF regulates hematopoietic stem cell activity, in part, through activation of Toll-like receptor signaling." *Leukemia* 28(9): 1851-1860.

Schuettpelz, L. G. and D. C. Link (2013). "Regulation of hematopoietic stem cell activity by inflammation." *Front Immunol* 4: 204.

Schultze, J. L., E. Mass and A. Schlitzer (2019). "Emerging Principles in Myelopoiesis at Homeostasis and during Infection and Inflammation." *Immunity* 50(2): 288-301.

Schurch, C. M., C. Riether and A. F. Ochsenbein (2014). "Cytotoxic CD8⁺ T cells stimulate hematopoietic progenitors by promoting cytokine release from bone marrow mesenchymal stromal cells." *Cell Stem Cell* 14(4): 460-472.

Schürch, C. M., C. Riether and A. F. Ochsenbein (2014). "Cytotoxic CD8⁺ T cells stimulate hematopoietic progenitors by promoting cytokine release from bone marrow mesenchymal stromal cells." *Cell Stem Cell* 14(4): 460-472.

Scorza, B. M., E. M. Carvalho and M. E. Wilson (2017). "Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis." *Int J Mol Sci* 18(6).

Scott, P., P. Natovitz, R. L. Coffman, E. Pearce and A. Sher (1988). "CD4⁺ T cell subsets in experimental cutaneous leishmaniasis." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83 Suppl 1: 256-259.

Scott, P. and F. O. Novais (2016). "Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis." *Nat Rev Immunol* 16(9): 581-592.

Seita, J. and I. L. Weissman (2010). "Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation." *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2(6): 640-653.

Selig, C. and W. Nothdurft (1995). "Cytokines and progenitor cells of granulocytopoiesis in peripheral blood of patients with bacterial infections." *Infect Immun* 63(1): 104-109.

Shizuru, J. A., R. S. Negrin and I. L. Weissman (2005). "Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system." *Annu Rev Med* 56: 509-538.

Socolovsky, M., H. Nam, M. D. Fleming, V. H. Haase, C. Brugnara and H. F. Lodish (2001). "Ineffective erythropoiesis in *Stat5a(-/-)5b(-/-)* mice due to decreased survival of early erythroblasts." *Blood* 98(12): 3261-3273.

Solar, G. P., W. G. Kerr, F. C. Zeigler, D. Hess, C. Donahue, F. J. de Sauvage and D. L. Eaton (1998). "Role of c-mpl in early hematopoiesis." *Blood* 92(1): 4-10.

Sponaas, A. M., A. P. Freitas do Rosario, C. Voisine, B. Mastelic, J. Thompson, S. Koernig, W. Jarra, L. Renia, M. Mauduit, A. J. Potocnik and J. Langhorne (2009). "Migrating monocytes recruited to the spleen play an important role in control of blood stage malaria." *Blood* 114(27): 5522-5531.

Sundar, S. and M. Rai (2002). "Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis." *Clin Diagn Lab Immunol* 9(5): 951-958.

Szilvassy, S. J., R. K. Humphries, P. M. Lansdorp, A. C. Eaves and C. J. Eaves (1990). "Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(22): 8736-8740.

Takizawa, H., K. Fritsch, L. V. Kovtonyuk, Y. Saito, C. Yakkala, K. Jacobs, A. K. Ahuja, M. Lopes, A. Hausmann, W. D. Hardt, A. Gomariz, C. Nombela-Arrieta and M. G. Manz (2017). "Pathogen-induced TLR4-TRIF innate immune signaling in hematopoietic stem cells promotes proliferation but reduces competitive fitness." *Cell Stem Cell* 21(2): 225-240 e225.

Takizawa, H. and M. G. Manz (2017). "Impact of inflammation on early hematopoiesis and the

microenvironment." *Int J Hematol* 106(1): 27-33.

Thomas, J., F. Liu and D. C. Link (2002). "Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor." *Curr Opin Hematol* 9(3): 183-189.

Torres-Guerrero, E., M. R. Quintanilla-Cedillo, J. Ruiz-Esmenjaud and R. Arenas (2017). "Leishmaniasis: a review." *F1000Res* 6: 750.

Trumpp, A., M. Essers and A. Wilson (2010). "Awakening dormant haematopoietic stem cells." *Nat Rev Immunol* 10(3): 201-209.

Van Ginderachter, J. A., A. Beschin, P. De Baetselier and G. Raes (2010). "Myeloid-derived suppressor cells in parasitic infections." *Eur J Immunol* 40(11): 2976-2985.

Wilson, A. and A. Trumpp (2006). "Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches." *Nat Rev Immunol* 6(2): 93-106.

Yanez, A., S. G. Coetzee, A. Olsson, D. E. Muench, B. P. Berman, D. J. Hazelett, N. Salomonis, H. L. Grimes and H. S. Goodridge (2017). "Granulocyte-Monocyte Progenitors and Monocyte-Dendritic Cell Progenitors Independently Produce Functionally Distinct Monocytes." *Immunity* 47(5): 890-902 e894.

Yilmaz, O. H., M. J. Kiel and S. J. Morrison (2006). "SLAM family markers are conserved among hematopoietic stem cells from old and reconstituted mice and markedly increase their purity." *Blood* 107(3): 924-930.

Yokota, T. (2019). "'Hierarchy' and 'Holacracy'; A Paradigm of the Hematopoietic System." *Cells* 8(10).

Yu, V. W. and D. T. Scadden (2016). "Hematopoietic Stem Cell and Its Bone Marrow Niche." *Curr Top Dev Biol* 118: 21-44.

Zhang, J., C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W. G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J. Q. Feng, S. Harris, L. M. Wiedemann, Y. Mishina and L. Li (2003). "Identification of the haematopoietic

stem cell niche and control of the niche size." *Nature* 425(6960): 836-841.

Zhang, Y., M. Jones, A. McCabe, G. M. Winslow, D. Avram and K. C. MacNamara (2013). "MyD88 signaling in CD4 T cells promotes IFN- γ production and hematopoietic progenitor cell expansion in response to intracellular bacterial infection." *J Immunol* 190(9): 4725-4735.