



HAL
open science

Etude de l'activité hématopoïétique du tissu adipeux chez la souris et l'homme

Vincent Cuminetti

► **To cite this version:**

Vincent Cuminetti. Etude de l'activité hématopoïétique du tissu adipeux chez la souris et l'homme. Biologie cellulaire. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017. Français. NNT : 2017TOU30154 . tel-01831088

HAL Id: tel-01831088

<https://theses.hal.science/tel-01831088>

Submitted on 5 Jul 2018

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Vincent CUMINETTI

le jeudi 28 septembre 2017

Titre :

Étude de l'activité hématopoïétique du tissu adipeux
chez la souris et l'homme

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Physiopathologie

Unité de recherche :

STROMALab, CNRS ERL 5311, INP-ENVT, EFS, INSERM U1031, UPS

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr. Béatrice COUSIN

Pr. Anne LORSIGNOL

Jury :

Dr Christian DANI Rapporteur

Dr Karima KISSA Rapporteur

Dr Jean-Philippe BASTARD Rapporteur

Dr Bernard PIPY Examineur

Dr Béatrice COUSIN Directrice de thèse

Pr Anne LORSIGNOL Co-directrice de thèse

Remerciements

En préambule, je tiens à exprimer mes sincères remerciements à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail.

Je remercie tout d'abord les membres du jury : je remercie le Dr Karima Kissa, le Dr Christian Dani ainsi que le Dr Jean-Philippe Bastard pour avoir accepté d'évaluer ce travail en tant que rapporteur. Je remercie également le Dr Bernard Pipy pour avoir accepté d'évaluer ce travail en tant que président du jury. Merci également aux membres de mon comité de thèse, le Dr Karin Tarte et le Dr Jean-Emmanuel Sarry, pour avoir accepté de faire partie de ce comité et pour vos remarques pertinentes.

Je tiens ensuite à remercier le Pr Louis Casteilla pour m'avoir accueilli depuis la fin de ma licence dans son laboratoire et dans l'équipe qu'il dirige au STROMALab. Je tiens également à remercier mes directrices de thèse Béatrice Cousin et Anne Lorsignol pour leur encadrement et leur implication tout au long de ces années de thèse. Vous m'avez toujours poussé à donner le meilleur de moi-même, que ce soit du point de vue expérimental, scientifique ou lors de la rédaction de ce manuscrit et je vous en suis très reconnaissant.

Mes remerciements viennent ensuite à tous les membres de l'équipe « hémato » (passés et actuels) : Elodie Luche, Patrick Laharrague, Anaïs Giry, Jenny Paupert et Virginie Robert-Gavioli. Merci pour vos remarques pertinentes, vos coups de mains en manips et votre soutien.

Merci à la bande du bureau doctorant/post-doc : Loïc Fievet, Mathieu Lemaitre, Hélène Leménager, Anne Prel, Lise Rabiller, Virginie Robert-Gavioli (encore !), Marielle Ousset, Quentin Sastourné-Arrey, pour votre bonne humeur, les discussions scientifiques et non scientifiques, vos conseils et votre soutien. Mention spéciale à Elodie Labit de la part du « thésard le plus overbooké du monde » : merci pour les tranches de tissu adipeux pendant mes heures d'enseignement, mais plus sérieusement merci à toi pour tes conseils et ton soutien depuis mon arrivée au labo.

Merci également à tous les autres membres du laboratoire pour votre aide : Audrey Carrière pour m'avoir ouvert les portes du laboratoire lors de mon premier stage et pour ses conseils et son soutien durant la suite de cette aventure « stromalabienne », Cécile Dromard-

Berthézène pour m'avoir encadré durant mon stage de M1, Mireille André pour sa gentillesse, ses conseils en biologie moléculaires et en culture cellulaire, Emmanuelle Arnaud pour l'aide en biologie moléculaire, Sophie Dupuis-Coronas pour sa disponibilité dans l'aide technique sur le trieur cellulaire et le cytomètre, Christophe Guissard et Corrine Barreau pour leur aide technique infiniment précieuse en imagerie ainsi que Yannick Jeanson et Marie-Laure Renoud pour la prise en charge des tris cellulaires durant la rédaction de ce manuscrit.

Merci aussi à Coralie Sengenès et Amandine Girousse pour leurs conseils et leur bonne humeur, Frédéric Deschaseaux pour son humour un peu « spécial », Clément De Vecchi pour sa bonne humeur et son humour tout autant spécial (et pour les « memes » qu'il colle partout dans le labo même si personne ne les comprend), Marion Bourdens pour sa gentillesse et son soutien et Nicolas Espagnol pour cette superbe présentation que nous avons fait sur nos cousins « apes » durant les animations scientifique du labo.

Merci également à tous les autres membres du laboratoire qui m'ont aidé de près ou de loin durant cette thèse : Pauline Achard, Isabelle Ader, Suzy Bigneau, Benoit Chaput, Jean-Gérard Descamps, Marion Ducos, Mélanie Gadelorge, Anne Galinier, Elodie Gayral, Pascale Guillou, Noémie Juin, Elodie Labat, Paul Montsarrat, Valérie Planat, Isabelle Raymond, Luc Sensebé et Audrey Varin.

Merci à mes parents, mes grand-parents et à ma sœur Chloé pour leur soutien et leur désir de comprendre le sujet de mon travail. Merci aussi à tous les copains dont le soutien m'a été très précieux: Thomas et notre amitié qui dure depuis maintenant 15 ans, ainsi que Léa pour toutes les parties de belottes, les apéros, les festivals, les voyages. Alexandre, pour les parties de Rocket League (Quel arrêt !), mais aussi les festivals, les concerts, et avoir été le meilleur wingman du monde pendant nos sorties au Café Pop'. Valentin et Lucie car même si les occasions de se voir sont moins fréquentes c'est toujours un plaisir de partager ces moments avec vous. Joe pour toutes les supers soirées qu'on a pu passer rue des 36 ponts, et pour tes questions d'écologiste sur mes travaux de recherche. Les copains de la fac, Aïsha et Raphaël, malgré les longues périodes sans se voir du fait de nos travaux de thèse respectifs. Et enfin les membres de Yearn For Change : Clément, Didier, Romain, Teddy et Joël.

Merci enfin à Céline, pour ton humour, ta joie de vivre, ta force de caractère, tes rêves de voyage, mais surtout ton amour et ton soutien inconditionnel depuis le début.

Résumé

Le tissu adipeux (TA) contient un grand nombre de leucocytes qui jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'activité métabolique du TA. Chez l'individu sain, les leucocytes du TA ont un profil majoritairement anti-inflammatoire (macrophages M2, polynucléaires éosinophiles, lymphocytes T CD4 Th2 et T régulateurs). Chez le sujet obèse, on observe une modification des populations immunitaires vers un phénotype majoritairement pro-inflammatoire (macrophages M1, polynucléaires neutrophiles, lymphocytes T CD8 et T CD4 Th1). Cet état inflammatoire participe au développement du syndrome métabolique. Chez l'adulte, les leucocytes circulants sont principalement produits dans la moelle osseuse (MO) par des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Notre équipe a montré qu'une partie des leucocytes du TA sont produits *in situ* grâce à la présence de CSH tissulaires spécifiques, dont l'activité hématopoïétique diffère selon le dépôt adipeux. Ce résultat suggère que les CSH du TA pourraient être contrôlées par leur niche, comme c'est le cas dans la MO.

Considérant le rôle prépondérant des leucocytes dans la physiopathologie du TA et le rôle des CSH dans ce tissu, les objectifs de cette thèse ont été les suivants : 1) Caractériser le rôle de l'hématopoïèse du TA dans le développement des maladies métaboliques. 2) Caractériser d'un point de vue cellulaire et moléculaire la niche des CSH du TA et la régulation de leur activité par cet environnement. 3) Mettre en évidence et caractériser l'activité hématopoïétique du TA chez l'homme.

Concernant le premier objectif, nos résultats montrent que dans un modèle de diabète induit par un régime riche en gras, les CSH du TA produisent des macrophages pro-inflammatoires ayant un rôle direct dans le développement des altérations de l'homéostasie glucidique. La greffe de CSH du TA issues d'une souris diabétique dans une souris maintenue sous régime standard induit le transfert de la pathologie. Inversement, la greffe de CSH de TA d'une souris saine dans une souris diabétique améliore le phénotype métabolique. Concernant le second objectif, nous montrons que les CSH du TA se localisent préférentiellement dans le cœur du TA sous-cutané, région principalement composée d'adipocytes beiges, alors que la périphérie, constituée d'adipocytes blancs uniloculaires héberge moins de CSH. L'activation ou l'inhibition des adipocytes beiges diminue la quantité de CSH au cœur du tissu, montrant qu'un déséquilibre du métabolisme des adipocytes beiges a un impact sur les CSH, suggérant que ces adipocytes pourraient alors faire partie d'une niche hématopoïétique. Les approches *in vitro* ne nous ont pas permis d'aller plus loin dans la caractérisation des acteurs cellulaires et/ou moléculaires de cette niche. Concernant le troisième objectif, nous montrons pour la première fois la présence de CSH dans le TA chez l'homme. La fonctionnalité de ces CSH a été testée *in vitro* et *in vivo*. En culture en milieu semi-solide, les CSH de TA humain sont capables de donner des clones myéloïdes, comme chez la souris. *In vivo*, chez des souris immuno-déficientes reconstituées avec des CSH de TA humain, on retrouve des cellules immunitaires humaines dans le tissu adipeux, ce qui démontre leur capacité à reconstituer une partie du système immunitaire de ce tissu.

En conclusion, ce travail de thèse a permis de montrer que l'activité hématopoïétique du TA joue un rôle crucial dans le maintien de la balance énergétique. Les CSH du TA résideraient préférentiellement dans une niche localisée au cœur du tissu, composée d'adipocytes beiges. La caractérisation des signaux moléculaires présents dans les différentes zones du TA permettra de proposer de nouvelles hypothèses sur la régulation de l'activité des CSH du TA. Chez l'homme, notre travail a permis de mettre en évidence une hématopoïèse tissulaire endogène au tissu adipeux, renforçant ainsi l'importance physiopathologique de nos précédents résultats obtenus chez la souris.

Summary

The adipose tissue (AT) contains a lot of leukocytes that play a fundamental role in the regulation of AT metabolic activity. In a physiological situation, AT-leukocytes mostly display an anti-inflammatory profile (M2 macrophages, eosinophils, CD4 Th2 T cells and regulatory T cells). Obesity induces a shift in AT immune cells towards a pro-inflammatory phenotype (M1 macrophages, neutrophils, CD8 and CD4 Th1 T cells). This inflammatory state contributes to the development of the metabolic syndrome. In adults, circulating leukocytes are mostly produced in the bone marrow (BM) by hematopoietic stem cells (HSC). A few years ago, we have shown AT harbors a specific resident HSC population that can renew innate immune cells and especially macrophages in the AT, via *in situ* differentiation. This endogenous hematopoietic activity differs according to the localization of the fat pad, suggesting that like BM-HSC, AT HSC might be controlled by their environment.

Considering the important role of leukocytes in the AT physiopathology and the role of resident HSC in this tissue, the objectives of this work were the followings: 1) To characterize the role of the AT hematopoiesis in the onset of metabolic diseases. 2) To characterize the AT HSC niche from a cellular and a molecular point of view, and the regulation of their activity by this environment. 3) To demonstrate the presence of an endogenous AT-hematopoiesis in humans.

First, by using transplantation of sorted AT-HSC and gain and loss of function studies we showed that some of the inflammatory AT-macrophages inducing metabolic disease originate from resident AT-HSC. Transplantation of AT-HSC sorted from high fat diet-fed (HFD) mice is sufficient to induce AT-macrophage accumulation, and to transfer metabolic disease in control mice. Conversely, the transplantation of control AT-HSC improves both AT-inflammation and glucose homeostasis in HFD mice.

Second, we showed that AT-HSC are preferentially localized in the core of sub-cutaneous AT that contains beige adipocytes, instead of the periphery that mostly harbors unilocular white adipocytes. Activation or inhibition of beige adipocytes induces a loss of this preferential localization, suggesting that modifications of the subcutaneous AT core region metabolism impact HSC behavior. This suggests that beige adipocytes might be a part of a hematopoietic niche in the AT. However, we were unable to characterize the cellular and/or molecular constituents of this niche.

Finally, we showed for the first time that as in mice, human AT contains resident HSC. In methylcellulose semi-solid medium, human AT-HSC are able to produce myeloid clones. *In vivo*, after transplantation of human AT-HSC in immunodeficient mice, human immune cells are observed in the AT. These results show that human AT exhibit a functional endogenous hematopoietic activity.

Altogether, we show in this study that the AT hematopoietic activity plays a crucial role in the control of energy balance. Although AT HSC are localized preferentially at the vicinity of beige adipocytes, molecular signals controlling this population remain to be characterized. Finally, we demonstrate for the first time an endogenous hematopoiesis in human AT, highlighting the physiopathological importance of our previous results obtained in mice.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	5
ABREVIATIONS.....	9
INTRODUCTION.....	13
Chapitre 1 : Des tissus adipeux, des adipocytes	15
I. Les adipocytes.....	17
1) Les adipocytes blancs.....	17
A- <i>Fonction métabolique</i>	17
B- <i>Fonction sécrétoire</i>	19
2) Les adipocytes bruns.....	20
A- <i>Fonction thermogénique</i>	20
B- <i>Fonction sécrétoire</i>	21
3) Les adipocytes beiges	23
4) Les adipocytes médullaires	24
II. Développement et renouvellement des TA	25
1) Origine des adipocytes ?.....	25
2) Les ASC.....	27
A- <i>Le processus de différenciation adipocytaire</i>	29
B- <i>Autres potentiels de différenciation</i>	29
C- <i>Activité sécrétoire</i>	30
D- <i>Support de l'hématopoïèse</i>	31
Chapitre 2 : Composante immunitaire des TA	35
I. Les Cellules immunitaires	35
1) Les macrophages	35
2) Les autres cellules du lignage myéloïde	37
3) Les Lymphocytes T	38
4) Les autres cellules lymphoïdes	38
II. Rôle physiopathologique des cellules immunitaires du TA.....	39
1) Le <i>browning</i>	39
2) Obésité/Diabète.....	41
III. Contrôle de la réponse inflammatoire du TA par l'adipocyte.....	45
Chapitre 3 : L'hématopoïèse	49
I. Ontogénie de l'hématopoïèse	49
II. Les CSH de la moelle osseuse	53
III. Modèles de l'hématopoïèse	56
IV. Les niches hématopoïétiques	63
1) Techniques de caractérisation de la niche hématopoïétique	63

2)	La niche endostéale	65
3)	La niche vasculaire	67
4)	Autres types cellulaires dans les niches endostéales et vasculaires	68
5)	Les adipocytes : une niche oubliée ?	69
6)	La niche est-elle si importante ?	71
V.	L'hématopoïèse extra-médullaire	72
1)	L'hématopoïèse extra-médullaire en situation pathologique.....	72
2)	L'hématopoïèse extra-médullaire en situation physiologique.....	73
	Objectifs Scientifiques	77
	MATERIELS ET METHODES.....	79
	RESULTATS.....	87
	Chapitre 1 : Rôle physio(patho)logique de l'hématopoïèse du TA chez la souris.....	89
	Article	89
	Chapitre 2 : Caractérisation du micro-environnement des CSH au sein du TA	96
I.	Localisation <i>in situ</i> des CSH du TA.	96
1)	Approche par <i>tracking</i> cellulaire.....	96
2)	Approche par immunofluorescence	98
3)	Approche par microdissection et cytométrie.....	102
II.	Localisation <i>in situ</i> de la descendance des CSH du TA.	108
III.	Caractérisation <i>in vitro</i> de la fonctionnalité de la niche.....	114
	Chapitre 3 : Caractérisation de l'activité hématopoïétique du TA humain.....	120
	Annexe : Le TA, un réservoir de cellules leucémiques ?	126
	DISCUSSION	130
	Le rôle physiologique des CSH du TA et leurs mécanismes de régulation	131
	Rôle de la niche hématopoïétique dans le TA	133
	L'activité hématopoïétique du TA humain	135
	BIBLIOGRAPHIE	138
	ANNEXES	164

ABBREVIATIONS

Acétyl CoA : Acétyl Coenzyme A

AG : Acide Gras

AraC : Arabino-Cytosine

APC : Allophycocyanine

ASC : Adipose Stromal Cell

ATF2 : Activating transcription factor 2

ATP : Adénosine Tri Phosphate

BAT : Brown Adipose Tissue

bFGF : b-Fibroblast Growth Factor

BMP : Bone Morphogenic Proteins

BRITE : BRown IN whiTE

CaR : récepteur à l'ion calcium

CAR-cells : CXCL-12 Abundant Reticular Cells

CD : Cluster Differentiation

C/EBP : CCAAT/Enhancer-Binding Protein

CHT : Caudal Hematopoietic Tissue

CFU-GM : Colony Forming Unit - Granulocyte/Monocyte

CLEC2 : protein-C type lectin-like receptor 2

CLP : Common Lymphoid Progenitors

CLS : Crown-Like Structures

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMP : Common Myeloid Progenitor

CRP : C-Reactive Protein

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

CSM : Cellule Stromale Mésoenchymateuse

CTGF : Connective Tissue Growth Factor

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DG : Diglycéride

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDTA : Éthylène Diamine Tétracétique

EGF : Epithelial Growth Factor

EPO : Erythropoïétine

FADH₂ : Flavine Adénine Dinucléotide Hydroquinone

FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting

FBS : Fetal Bovine Serum

FGF : Fibroblast Growth Factor

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GFP : Green Fluorescent Protein

GM-CSF : Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor

HDL : High Density Lipoprotein

HEM : Hématopoïèse Extra-Médullaire

HFD : High-Fat Diet

HGF : Hepatic Growth Factor

IFN γ : Interféron gamma

IGF-1 : Insuline-like Growth Factor 1

IL : Interleukine

ILC2 : Type 2 Innate Lymphoid Cells

iNKT : invariant Natural Killer T cell

IV : Intra-veineux

JPC : Jours Post-Coït

KLS : c-Kit⁺/Lin⁻/Sca-1⁺

KO : Knock-Out

LAM : Leucémie Aigüe Myéloïde

LDL : Low Density Lipoprotein

LHS : Lipase Hormono-Sensible

LIF : Leukemia Inhibitory Factor

Lin : Lineage Panel

LPL : Lipoprotéine Lipase

LTB4 : Leucotriene B4

LT-CSH : CSH à Long-Terme

MAT : Marrow Adipose Tissue

MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein- 1

M-CSF : Monocyte-Colony Stimulating Factor

Metrn1 : Meteorin-like factor

MG : Monoglycéride

MO : Moelle osseuse

MPP : Multi Potent Progenitors

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
Hydroquinone

NC : Normal Chow

NCS : Newborn Calf Serum

NGF : Nerve Growth Factor

NHS : Normal Horse Serum

NK : Natural Killer

NOD : Non-Obese Diabetic

NPY : Neuropeptide Y

NSLA : Non Segmentable Lobule Area

NSG : NOD/SCID/IL2 γ KO

PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells

PBS : Phosphate Buffer Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PE : Phycoérythrine

PE-Cy7 : Phycoérythrine-Cyanine 7

PerCP : Peridinin Chlorophyll Protein

PGAT : PeriGonadal Adipose Tissue

PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor
gamma coactivator 1-alpha

PGE2 : Prostaglandine E2

PKA : Protéine Kinase A

POMC : Pro-Opio MélanoCortine

PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
gamma

p-Sp/AGM : Para-aortic Splanchnopleure/Aorte
Gonade Mésonéphros

PRDM-16 : Positive Regulatory Domain-16

Sca-1 : Stem cell antigen-1

SCAT : SubCutaneous Adipose Tissue

SCF : Stem Cell Factor

SCID : Severe Combined Immuno-Deficiency

SDF-1 : Stromal Derived Factor-1

SLA : Segmentable Lobule Area

SNS : Système Nerveux Sympathique

SPIM : Selective Plane Illumination Microscopy

S/REBP : Sterol/Regulatory Element Binding Protein

SSAO/VAP1 : Semicarbazide-Sensitive amine
oxydase/vascular adhesion protein-1

ST-CSH : CSH à Court-Terme

SVF : Fraction Stromale Vasculaire

TA : Tissu Adipeux

TCR : T Cell Receptor

TG : Triglycéride

TGF : Transforming Growth Factor

TLR : Toll Like Receptor

TNF α : Tumour Necrosis Factor alpha

TPO : Thrombopoïétine

Tregs : lymphocytes T régulateurs

UCP-1 : Uncoupling Protein-1

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

WAT : White Adipose Tissue

WT : Wild Type

INTRODUCTION



Figure 1 : Localisation des différents types de TA blancs et bruns chez la souris.
D'après Tran et Kahn, *Nature Reviews Endocrinology* 6, 195-213

Chapitre 1 : Des tissus adipeux, des adipocytes

Le tissu adipeux (TA) est un tissu conjonctif présent chez tous les mammifères. Chez l'homme, sa masse représente entre 15 et 25% du poids corporel. Il a été traditionnellement étudié pour ses rôles d'isolant thermique, de protection contre des chocs mécaniques, mais surtout pour son rôle dans la gestion des réserves énergétiques lipidiques¹. En effet, ce tissu est capable de stocker mais aussi de libérer ou d'oxyder des lipides. Ces propriétés métaboliques en font donc un tissu très plastique, capable de s'hypertrophier quand la balance énergétique est excédentaire, ou au contraire de régresser en volume en libérant des lipides à destination d'autres organes lorsque les dépenses énergétiques de l'organisme sont supérieures aux apports². Depuis une vingtaine d'années et l'identification du gène de la leptine, le TA est aussi abondamment étudié pour ses nombreuses sécrétions endocrines^{3,4}, donnant finalement à ce tissu un rôle central en physiopathologies⁵.

Le TA est réparti en plusieurs dépôts au sein de l'organisme, ces différents dépôts n'étant pas similaires d'un point de vue morphologique et fonctionnel. Il existe en effet différents types de TA classés selon leurs couleurs (blanc ou brun), cette couleur traduisant des fonctions et origines différentes⁶. Au sein même du TA blanc (WAT, White Adipose Tissue), il existe des différences fonctionnelles selon la localisation des dépôts (sous-cutanée ou viscérale) (fig. 1)⁷, qui ne seront abordées que d'un point de vue général dans ce manuscrit. Le TA brun (BAT, Brown Adipose Tissue) est localisé dans la région inter-scapulaire chez la souris (fig. 1). Chez l'homme il est présent en grande quantité durant la période péri-natale, avant d'involuer et de n'être présent que dans la région supra-claviculaire et péri-rénale chez l'adulte⁸. Enfin, il existe un TA médullaire, localisé dans la moelle osseuse (MO).

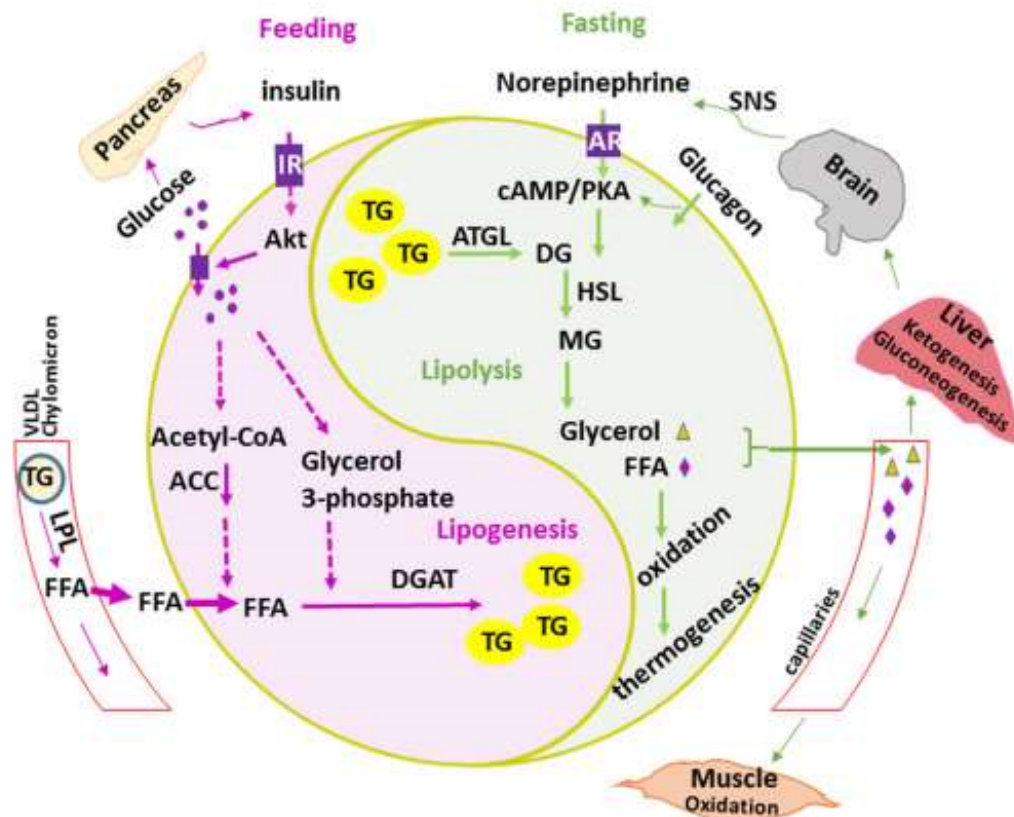


Figure 2 : Métabolisme lipidique, stockage et mobilisation dans l'adipocyte.

En situation d'apport énergétique, les adipocytes synthétisent des triglycérides (TG) à partir des acides gras (AG) et du glycérol issue de la glycolyse. La synthèse des AG et l'import de glucose est stimulé par l'insuline. A l'inverse, la lipolyse permet de mobiliser les TG en situation de déficit énergétique. Les TG sont hydrolysés en réponse aux signaux cataboliques tels que la noradrénaline, l'adrénaline, ou le glucagon. Les AG produits et libérés seront oxydés principalement dans le muscle, et le glycérol sera utilisé pour la néoglucogenèse et la cétogenèse dans le foie.

IR: récepteur à l'insuline; ACC: acétyl coA carboxylase; LPL: lipoprotéine lipase; FFA: Free Fatty Acid = Acide Gras Non Estérifié; DGAT = diglycéride acyl-transférase; ATGL: adipose triglycéride lipase; AR: récepteur adrénergique; SNS: système nerveux sympathique; DG: diglycéride; HSL: lipase hormono-sensible; MG: monoglycérides

D'après Luo et Liu, *Journal of Endocrinology* (2016) 231, R77-R99

I. Les adipocytes

1) Les adipocytes blancs

Ces adipocytes caractérisent les dépôts de WAT. Ces cellules sont rondes, avec une unique et volumineuse vacuole lipidique occupant quasiment tout l'espace intra-cellulaire. Le noyau et les organites sont excentrés, collés à la membrane plasmique.

A- Fonction métabolique

Le principal rôle des adipocytes blancs est de stocker les substrats énergétiques dans des situations où ces derniers sont en excès par rapport aux dépenses (en période postprandiale, par exemple, ou lorsque les dépenses énergétiques sont faibles)⁹. Le stockage des acides gras (AG) se fait sous forme de triglycérides (TG). Ces AG proviennent soit des acides gras libres circulants, soit de l'hydrolyse des TG contenus dans les lipoprotéines circulantes. Cette hydrolyse est alors assurée par la lipoprotéine lipase (LPL), synthétisée par les adipocytes et sécrétée dans la lumière des capillaires du TA. Les AG alors transportés dans le cytoplasme des adipocytes sont estérifiés avec du glycérol pour former des TG et stockés dans la vacuole lipidique de l'adipocyte. Les AG peuvent également être synthétisés par une acétyl-CoA carboxylase lors de la lipogenèse *de novo* à partir de l'acétyl-coA issue de la glycolyse. En effet, l'adipocyte blanc est capable d'importer du glucose sous l'effet de l'insuline. Cette propriété en fait une des trois cellules dites « insulino-sensibles »⁹ (fig. 2).

A l'inverse, dans une situation où les dépenses énergétiques sont supérieures aux apports (jeûne, exercice physique prolongé), les adipocytes blancs vont mobiliser ces stocks de TG en les hydrolysant (fig.2). Cette hydrolyse, ou lipolyse, se fait en réponse à des signaux cataboliques (catécholamines, glucocorticoïdes, hormones thyroïdiennes entre autres) dont les voies de signalisation convergent vers la protéine kinase A (PKA)¹⁰. La lipolyse est réalisée par des réactions enzymatiques successives transformant les TG en diglycérides (DG) puis en monoglycérides (MG) dont l'enzyme limitante est la lipase hormono-sensible (LHS) activée par la PKA. La monoglycéride lipase hydrolyse ensuite les MG en AG et glycérol. Les AG libérés et véhiculés dans la circulation en association avec l'albumine¹¹, sont alors oxydés par β -oxydation dans les mitochondries de différents tissus, notamment le foie où ils fourniront des corps cétoniques comme substrats énergétiques pour d'autres organes.

	Facteur	Cellule(s) sécrétrice(s)	Fonction(s)
Adipokines	Leptine	Adipocyte	Satiétogène, activité motrice, dépense énergétique, fertilité, métabolisme osseux
	Adiponectine	Adipocyte	Amélioration de la sensibilité à l'insuline, physiologie vasculaire
	Visfatine	Adipocyte	Insulino-mimétique
	Vaspine	Adipocyte	Amélioration de la sensibilité à l'insuline
	FGF21	Adipocyte	Absorption de glucose par les adipocytes, browning, dépense énergétique
	BMPs	Adipocytes et pré-adipocytes	Métabolisme osseux, prise alimentaire, adipogénèse
	Cathepsines	Indéterminée	Protéase qui clive la leptine et la rend inactive
	Apeline	Adipocytes	Inhibe la sécrétion d'insuline
	Omentine	Adipocytes	Cardiovasculaire, anti-inflammatoire, améliore la sensibilité à l'insuline
Cytokines	TNF- α	Monocytes, macrophages et adipocytes	Pro-inflammatoire, diminue la réponse à l'insuline par les adipocytes
	IL-6	Macrophages, adipocytes	Pro-inflammatoire, métabolisme énergétique
	MCP-1	Adipocytes	Chimiokine
	Resistine	Macrophages et adipocytes	Pro-inflammatoire, associée à l'insulino-résistance
	Progranuline	Cellules immunitaires et adipocytes	Pro-inflammatoire, associée à l'insulino-résistance
Protéines du complément	Adipsine	Monocytes, macrophages et adipocytes	
	Facteur B du complément	Cellules immunitaires et adipocytes	Pro-inflammatoires, développement du diabète de type 2 et de pathologies vasculaires
	ASP	Cellules immunitaires et adipocytes	
	CTRPs	Cellules immunitaires et adipocytes	

Tableau 1: Les différents facteurs sécrétés par les cellules sécrétrices du TA blanc ainsi que leurs effets

ASP: Acylating Simulation protein; BMP: Bone Morphogenic Protein, CTRPs: C1q/TNF-related proteins, FGF21: Fibroblast Growth Factor 21, MCP-1: Monocyte Chemotactic Protein-1, RBP4: Retinol Binding Protein 4, TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha

Adapté de Fasshauer et Blüher, Trends in Pharmacological Sciences, 2015

B- Fonction sécrétoire

Le WAT a une activité sécrétoire très importante qui intervient dans la régulation de nombreux processus physiologiques de l'organisme¹². Cette activité sécrétoire est différente en fonction de la localisation des dépôts adipeux blancs¹³. Les revues concernant le sécrétome du WAT ne font, malheureusement, pas forcément la différence entre les sécrétions adipocytaires et celles des cellules de la fraction stromale (cf § II.2.C de ce chapitre).

Certains de ces facteurs sécrétés ont été appelés adipokines. La leptine fut la première découverte en 1994³, suivie par l'adiponectine en 1995¹⁴. De nombreux autres facteurs ainsi que leurs effets ont depuis été caractérisés (tableau 1)^{15,16}. Ces nombreuses adipokines exercent de multiples effets, de manière endocrine, paracrine et/ou autocrine. Les adipocytes sécrètent également des cytokines impliquées dans la régulation des mécanismes inflammatoires et des protéines du complément ayant un rôle pro-inflammatoire ; l'ensemble de ces molécules est impliqué dans le développement du diabète de type 2 et des pathologies vasculaires¹⁷ (cf chapitre 2).

Ces sécrétions varient d'un dépôt à l'autre. Par exemple, le TA sous-cutané sécrète davantage de leptine que le TA viscéral qui sécrète, lui, davantage d'adiponectine et de cytokines pro-inflammatoires¹⁵. La sécrétion de ces facteurs par les adipocytes et/ou les cellules de la SVF varie aussi en fonction des situations physiopathologiques, notamment en fonction du métabolisme du tissu et de son état inflammatoire^{18,19}. Enfin, ces sécrétions peuvent également être contrôlées par la taille de l'adipocyte, comme c'est le cas pour la leptine et l'adiponectine²⁰.

Les sécrétions des adipocytes blancs participent principalement au maintien de la balance énergétique en agissant à de multiples niveaux. Par exemple, la leptine, hormone peptidique de 16 kDa codée par le gène *ob*, diminue la prise alimentaire et stimule les dépenses énergétiques (*via* une activation du système nerveux sympathique) en agissant principalement sur l'hypothalamus²¹. Par ailleurs, la leptine exerce des effets en périphérie. Ainsi, au niveau pancréatique, elle inhibe la production et la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas²². Au niveau des adipocytes eux-mêmes, l'activation des récepteurs à la leptine diminue la sensibilité à l'insuline conduisant ainsi à une diminution de la synthèse

des TG²³. Ces effets périphériques sont surprenants car allant plutôt à l'inverse de ses effets au niveau central. L'adiponectine, elle, n'exerce que des effets périphériques : en effet elle stimule la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas²⁴, et améliore la sensibilité à l'insuline des hépatocytes²⁵ et des adipocytes²⁶.

Les adipokines ont également un effet sur la physiologie vasculaire. La leptine par exemple stimule localement l'angiogenèse et protège les cellules endothéliales du stress oxydant²⁷. L'adiponectine aurait un effet protecteur dans le développement de l'athérosclérose en diminuant l'infiltration de leucocytes circulants dans les plaques d'athérome²⁸.

Les adipokines sécrétées par les adipocytes blancs contrôlent également l'activité des cellules du système immunitaire du TA mais également celle de cellules circulantes²⁹. Cet effet peut être différent en fonction des conditions physiopathologiques. Il a été montré par exemple que chez l'individu obèse, la leptine avait un effet pro-inflammatoire^{30,31}, alors que, dans une situation de malnutrition, elle joue un rôle immunosuppresseur³². L'adiponectine a un rôle suppresseur de l'inflammation : elle diminue l'activité inflammatoire des lymphocytes T et B et stimule la production de l'IL-10 (Interleukine-10), cytokine anti-inflammatoire (cf. Chapitre II)³³. Par ailleurs, les adipocytes sécrètent également des cytokines pro-inflammatoires (TNF α par exemple) et des protéines du complément (telles que l'adipsine)³⁴. Ces facteurs sécrétés jouent un rôle paracrine mais également endocrine¹⁵.

D'autres grandes fonctions physiologiques sont également contrôlées au moins en partie, par les adipokines comme la fonction de reproduction ainsi que le métabolisme osseux³⁵⁻³⁸.

2) Les adipocytes bruns

Les adipocytes bruns sont localisés dans le BAT. Contrairement aux adipocytes blancs, ce sont des cellules refermant plusieurs petites vacuoles lipidiques et de très nombreuses mitochondries³⁹.

A- Fonction thermogénique

Les adipocytes bruns stockent les lipides sous forme de TG de la même façon que les adipocytes blancs. En réponse à une stimulation β -adrénergique, les TG sont hydrolysés en AG et glycérol par la LHS (fig. 2). Les AG produits servent ensuite à la production d'acétyl-

CoA lors de la β -oxydation dans la matrice mitochondriale. L'acétyl-CoA alimente le cycle de Krebs pour produire du NADH, H⁺ et du FADH₂ qui sont ensuite oxydés au niveau de la chaîne respiratoire localisée au niveau de la membrane interne mitochondriale. Le transport des électrons le long de la chaîne respiratoire est associé à un flux de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Dans les adipocytes bruns, l'expression de la protéine découplante UCP-1 (Uncoupling Protein-1) permet le retour de ces protons dans la matrice mitochondriale et ainsi découple le fonctionnement de la chaîne respiratoire de celui de l'ATP synthase. Ceci conduit à une accélération du fonctionnement de la chaîne respiratoire associée à une production de chaleur (fig.3). Cette thermogénèse de non frisson permet au BAT de contrôler la température corporelle et ainsi de lutter contre l'hypothermie⁴⁰.

L'activité thermogénique des adipocytes bruns est augmentée dans plusieurs situations physiopathologiques, notamment lors d'une exposition au froid associée à une forte libération de noradrénaline. La stimulation des récepteurs β -adrénergiques par la noradrénaline induit l'expression du gène codant pour UCP-1. Parmi les nombreux acteurs moléculaires impliqués dans la régulation transcriptionnelle du gène Ucp-1, les co-régulateurs PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-alpha), et PRDM-16 (Positive Regulatory Domain-16) ainsi que les facteurs de transcription ATF2 (Activating transcription factor 2) et PPAR γ (Peroxisome proliferator-Activated Receptor gamma) ont été largement étudiés⁴¹. La voie de signalisation p38 MAPK est fondamentale dans cette régulation⁴².

B- Fonction sécrétoire

A l'instar des adipocytes blancs capables de sécréter des adipokines, les adipocytes bruns sécrètent des batokines. Ces batokines ont des effets endocrines et paracrines⁴³.

Des médiateurs peptidiques comme les protéines de la famille des BMP (Bone Morphogenic Proteins)⁴⁴ contribuent à la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes de type brun au sein du BAT. Le *Fibroblast Growth Factor 21* (FGF 21) induit l'activité thermogénique des adipocytes bruns indépendamment du système nerveux sympathique⁴⁵.

En condition physiologique les adipocytes bruns sécrètent également des batokines impliquées dans la régulation de la réponse inflammatoire. La sécrétion d'IL-6 permet la

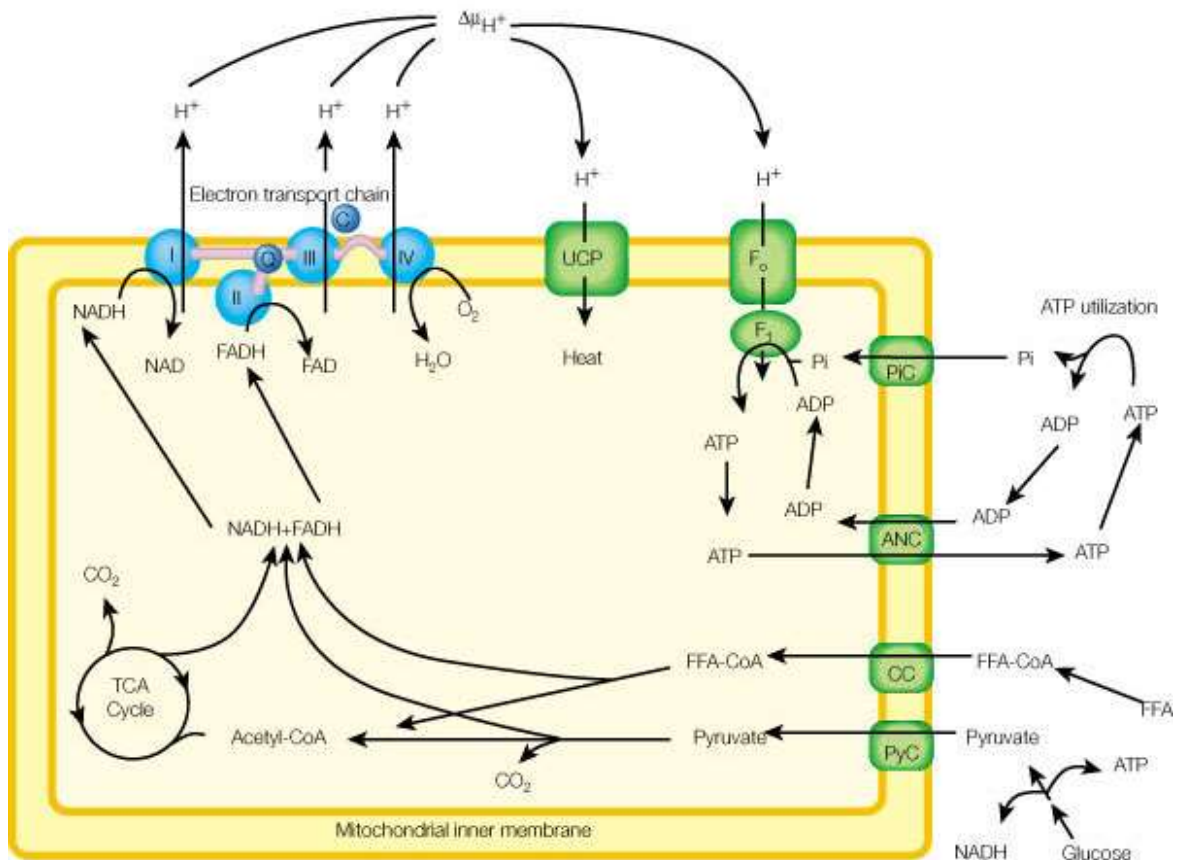


Figure 3 : Métabolisme mitochondrial des adipocytes bruns

Les acides gras (AG) sont oxydés dans la matrice mitochondriale pour produire de l'actéyl-coA. Le cycle de Krebs (ou TCA) utilise cet acétyl-CoA et produit du NADH, H^+ et du $FADH_2$ qui seront oxydés sur la chaîne de transport des électrons pour produire un gradient de protons de par et d'autre de la membrane interne. Ce gradient est utilisé par l'ATP synthase comme force protomotrice pour produire de l'ATP. Le découplage de ce gradient par UCP-1 permet la génération de chaleur.

FFA : Free Fatty Acid ; ANC : Adenine Nucleotide Carrier ; CC : Carnitine Carrier ; PiC : Phosphate Carrier ; PyC : Pyruvate Carrier ; TCA : Tri-Carboxylic Acid ; CoA ; Co-enzyme A ; ADP : Adenosine Tri-Phosphate ; ADP : Adenosine Di-Phosphate

D'après Lowell & Spiegelman, Nature. 2000

sensibilisation des macrophages anti-inflammatoires de type M2 à l'IL-4⁴³. Cette sécrétion d'IL-6 par les adipocytes bruns a également un effet endocrine, en stimulant la lipolyse dans le WAT et en améliorant la sécrétion d'insuline par le pancréas⁴⁶. D'autres facteurs endocrines impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique sont également sécrétés comme l'hormone thyroïdienne T3 (stimulation de la capacité thermogénique des adipocytes bruns), ou l'angiopoïétine-like 8 (inhibition de la LPL)^{43 47}.

3) Les adipocytes beiges

Dans le WAT et dans certaines conditions (stimulation β -adrénergique, exposition au froid) on retrouve des adipocytes ayant des caractéristiques d'adipocytes bruns (plusieurs gouttelettes lipidiques, nombreuses mitochondries, protéine découplante UCP-1)⁴⁸⁻⁵⁰. Il a récemment été démontré que ces adipocytes sont différents des adipocytes bruns classiques (présents dans le BAT), et ont été dénommés adipocytes beiges⁵¹. Il est toutefois admis que leur fonction est semblable à celle des adipocytes bruns classiques, à savoir la production de chaleur⁵².

Outre la localisation tissulaire, une des différences notables entre adipocytes bruns et adipocytes beiges réside dans le caractère inductible des adipocytes beiges après stimulation, notamment par le froid. On parle alors de brunissement ou « *browning* » du WAT⁵³. Il faut noter que ce processus n'est pas général à tous les dépôts de WAT, le dépôt sous-cutané chez la souris y est particulièrement sensible⁵⁴. Cette variabilité dans la capacité à « brunir » va plus loin. En effet, notre laboratoire a montré chez la souris que le *browning* du TA sous-cutané se limite au cœur du dépôt⁵⁵. En effet, des adipocytes beiges UCP1-positifs ne sont jamais observés dans la périphérie de ce tissu⁵⁵. L'analyse en 3 dimensions (3D) de ce tissu a, par ailleurs, révélé une organisation des adipocytes différente entre le cœur et la périphérie : ceux-ci sont regroupés en lobules au cœur du dépôt ce qui n'est pas le cas en périphérie. Ces deux régions ont ainsi été respectivement dénommées SLA (Segmentable Lobule Area) et NSLA (Non Segmentable Lobule Area).

Outre le froid, d'autres conditions physiopathologiques sont associées à un brunissement du WAT, comme l'exercice physique, les brûlures ou la cachexie associée au cancer, ce qui suggère que les adipocytes beiges pourraient être impliqués dans d'autres fonctions que la thermogénèse³⁹. Enfin, le laboratoire a montré que le *browning* du WAT peut être induit par

des intermédiaires métaboliques comme le lactate ou les corps cétoniques. Des modifications de l'état redox intracellulaire sont à l'origine d'une induction de l'expression d'UCP-1⁵⁶.

Il n'a pas été clairement établi de différences entre le sécrétome des adipocytes beiges et celui des adipocytes bruns. Il semblerait cependant qu'*in vitro*, les adipocytes beiges du WAT expriment davantage l'adiponectine et le facteur Metrnl (Meteorin-like)⁵⁷. *In vivo*, en réponse au froid, l'adiponectine sécrétée par les adipocytes beiges agit de façon paracrine et active les macrophages résidents du WAT ; ceux-ci stimulent en réponse le *browning* du WAT, à l'origine d'un cercle vertueux⁵⁷.

4) Les adipocytes médullaires

Initialement considérés comme des cellules assurant un simple rôle de remplissage de la cavité osseuse, on sait désormais que les adipocytes du TA médullaire (Marrow Adipose Tissue ou MAT) jouent un rôle actif dans la régulation du processus hématopoïétique⁵⁸ (cf. Chapitre 2) et dans le contrôle de l'homéostasie osseuse⁵⁹.

Ces adipocytes ont des caractéristiques phénotypiques et métaboliques similaires aux adipocytes blancs du WAT : ils sont en effet capables de stocker et de libérer des lipides, sont sensibles à l'insuline et sécrètent des adipokines comme par exemple la leptine⁶⁰. D'autres auteurs, au contraire, montrent que les adipocytes médullaires ont des caractéristiques d'adipocytes bruns en terme d'expression génique (UCP-1, PGC-1 α , Dio2, PRDM-16, et FoxC2)⁶¹. Les adipocytes médullaires constitueraient, en fait, une population hétérogène avec des cellules ayant des caractéristiques d'adipocytes blancs, et d'autres, des caractéristiques d'adipocytes bruns⁶⁰.

En accord avec cette idée, un article publié en 2015 montre que les adipocytes médullaires sont divisés en 2 populations distinctes en terme de développement, taille, composition lipidique, expression génique et localisation⁶². En effet, chez la souris et l'homme, les adipocytes situés aux extrémités des os longs (fémur et tibia) sont présents dès la naissance et sont qualifiés de « constitutifs ». Ils seraient peu actifs d'un point de vue métabolique et ne seraient pas impliqués dans la régulation du processus hématopoïétique. A l'inverse, les adipocytes situés au centre de l'os, région active d'un point de vue hématopoïétique,

apparaissent plus tardivement. Ces adipocytes centraux qualifiés de « régulés » par les auteurs disparaissent avec l'âge et lors de lipodystrophies, et pourraient être responsables des perturbations hématopoïétiques associées à ces deux situations. En outre, contrairement aux adipocytes constitutifs, le nombre et la taille des adipocytes régulés diminuent en réponse au froid. Ils sont également phénotypiquement plus proches des adipocytes blancs, avec un profil d'expression génique similaire. Ces résultats confirment l'hétérogénéité des populations d'adipocytes médullaires.

Des études histologiques ont montré que le MAT est un TA très plastique, qui change au cours de la vie de l'individu et des différentes situations physiopathologiques. Il est peu présent à la naissance chez l'homme⁶³ et s'accumule avec l'âge en prenant progressivement la place des cellules hématopoïétiques⁶⁴. Une accumulation accrue d'adipocytes médullaires est en outre observée dans des situations pathologiques telles que l'ostéoporose, le diabète de type 1 ou l'anorexie⁶⁵. Ces pathologies sont associées à une atrophie de la moelle rouge, suggérant que les adipocytes participent également au remodelage de la MO en assurant un rôle de « remplissage » de l'espace médullaire. L'atrophie du MAT chez l'homme n'a été observée que dans quelques cas d'anorexie très sévère. Cette atrophie est mieux décrite dans des modèles murins de défaut de l'adipogenèse (par exemple, les souris Azip)⁶⁶.

Comme l'adipocyte blanc ou brun, l'adipocyte médullaire sécrète des adipokines telles que la leptine, l'adiponectine ou d'autres facteurs inflammatoires⁶⁷. Ces adipokines peuvent agir sur les cellules souches hématopoïétiques et les ostéoblastes, et sont donc impliquées dans le contrôle de l'hématopoïèse et du remodelage osseux⁶⁸. Le contrôle de l'hématopoïèse par les adipocytes médullaires sera abordé dans le chapitre 3.

II. Développement et renouvellement des TA

1) Origine des adipocytes ?

Les adipocytes blancs dérivent principalement du mésoderme à l'exception des adipocytes blancs présents au niveau de la face qui se développent à partir de la crête neurale et expriment le facteur de transcription Sox10⁶⁹. Il a récemment été démontré que les

adipocytes blancs qui émergent au cours du développement ne proviennent pas du même progéniteur que ceux qui apparaissent à l'âge adulte⁷⁰. Plusieurs études se sont intéressées à l'origine des adipocytes sous-cutanés vs viscéraux, sans toutefois permettre l'identification de progéniteurs spécifiques. On considère aujourd'hui que les adipocytes blancs ont plusieurs origines développementales qui pourraient être fonction de leur localisation. Ceci pourrait d'ailleurs expliquer l'atrophie et l'expansion sélective de certains dépôts adipeux au cours des lipodystrophies⁵². Le développement de nouvelles techniques de traçage cellulaire *in vivo* a cependant permis la mise en évidence de marqueurs des progéniteurs adipocytaires les plus immatures, tels que le CD24⁷¹. Le laboratoire, quant à lui, a montré que la protéine CD38 est exprimée par les progéniteurs engagés dans l'adipogenèse⁷².

Il existe une controverse concernant l'origine des adipocytes bruns, blancs et beiges. Il a d'abord été décrit que les adipocytes bruns dériveraient d'un progéniteur exprimant les facteurs de transcription Myf5, Pax7 et/ou Pax3, communs aux progéniteurs des cellules musculaires^{52,69,73}. Dans ce modèle, les adipocytes blancs (et beiges) dériveraient d'un progéniteur Myf5⁻. Ce modèle a été remis en cause puisqu'il a été démontré, grâce à des études de lignage, que les adipocytes blancs (et beiges) pouvaient aussi émerger de cellules Myf5⁺, et que certains adipocytes bruns dériveraient de progéniteurs Myf5⁻, en fonction de la nature et de la localisation du dépôt adipeux⁷⁴. Ces études montrent qu'il existe probablement différents types de progéniteurs adipocytaires embryonnaires, susceptibles donc de générer des populations distinctes d'adipocytes blancs et bruns.

L'origine des adipocytes beiges reste très controversée à ce jour. Certaines études proposent une trans-différenciation (ou interconversion) des adipocytes blancs en adipocytes beiges^{75,76}. D'autres études suggèrent l'existence de progéniteurs bipotents dans le WAT, capables de se différencier en adipocytes beiges après exposition au froid ou mise sous régime riche en graisse⁷⁷⁻⁷⁹. Enfin d'autres travaux proposent que les adipocytes beiges aient une origine similaire aux cellules musculaires lisses⁸⁰. A l'heure actuelle, les arguments les plus forts qui supportent l'idée d'un lignage spécifique pour les adipocytes beiges proviennent d'études *in vitro*. La culture de cellules de SVF provenant de TA sous-cutané en conditions clonales, a en effet permis de générer des lignées adipocytaires qui ont, ou non, la capacité d'exprimer des marqueurs spécifiques des adipocytes blancs ou beiges au cours de leur différenciation⁵¹.

Enfin, plusieurs équipes proposent une origine hématopoïétique des adipocytes bruns ou blancs. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) seraient en effet capables de se différencier en adipocytes *in vivo* et *in vitro*⁸¹. Plus récemment, il a été montré qu'un cocktail de cytokines (BMP4, IGF-II, VEGF-A, SCF, Flt-3 ligand et IL-6) induit la différenciation des iPSC (induced Pluripotent Stem Cells) et des cellules souches embryonnaires humaines en adipocytes bruns fonctionnels⁸². Très récemment, l'équipe du professeur Klemm a montré chez la souris que les macrophages du TA peuvent se transdifférencier en adipocytes *via* une « transition hémato-mésenchymateuse »⁸³. Ces données proposent une nouvelle origine des adipocytes, et surtout un nouveau lien entre le système hématopoïétique et le TA.

Les adipocytes médullaires se développent majoritairement après la naissance à partir de progéniteurs présents dans la MO, communs aux adipocytes médullaires et aux ostéoblastes⁸⁴. La différenciation adipocytaire de ces progéniteurs est induite par l'activation du facteur de transcription PPAR γ , par la protéine sFRP1 (secreted Frizzled-Related Protein 1), et par le FGF 21⁸⁴.

2) Les ASC

Les progéniteurs adipocytaires sont classiquement définis comme des cellules souches/stromales adipocytaires, aussi appelées ASC (Adipose-derived Stromal Cells), localisées dans la fraction stroma-vasculaire (SVF) des TA. Cette fraction est isolée après digestion enzymatique du TA et renferme outre les ASC, des cellules endothéliales et des cellules immunitaires⁸⁵.

Les critères qui caractérisent les ASC ont été définis sur la base de ceux qui caractérisent les cellules stromales mésenchymateuses (Mesenchymal Stromal Cells ou MSC) de la moelle osseuse⁸⁶. Parmi ces critères, il faut citer: 1) l'adhérence sur plastique dans des conditions de culture standard, 2) l'expression simultanée des marqueurs membranaires CD105, CD73 et CD90 avec une absence de marqueurs membranaires hématopoïétiques (CD45, CD11b, CD14, CD19), et pour les ASC spécifiquement, l'expression du CD34⁸⁷, 3) la différenciation en adipocytes, chondrocytes et ostéoblastes en réponse à des *stimuli* spécifiques *in vitro*⁸⁸.

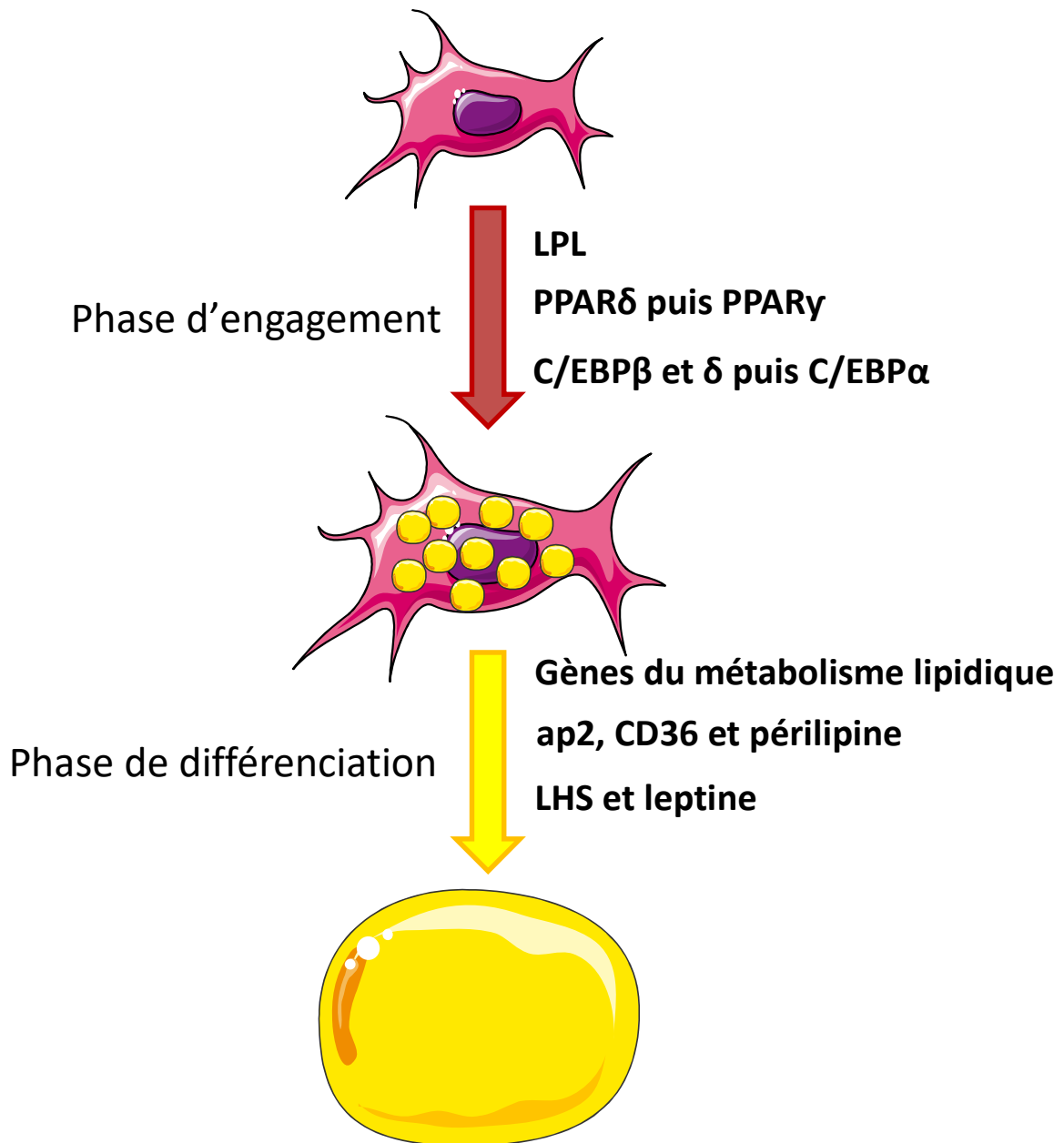


Figure 4 : processus de différenciation des ASC

Durant la phase d'engagement, les ASC se mettent à exprimer la LPL, PPAR γ après avoir transitoirement exprimé PPAR δ , et C/EBP α après avoir transitoirement exprimé C/EBP β et δ . Durant la phase tardive de différenciation, les cellules expriment les gènes du métabolisme lipidique, les transporteurs lipidiques ap2 et CD36, la protéine périlipine qui est associée aux gouttelettes lipidiques, ainsi que la LHS et la leptine

A- Le processus de différenciation adipocytaire

La différenciation adipocytaire à partir des ASC s'effectue en 2 grandes étapes (fig. 4). Dans la phase précoce de différenciation, les ASC s'engagent dans le lignage adipocytaire, arrêtent leur prolifération et se mettent à exprimer la LPL⁸⁹. Elles expriment ensuite transitoirement le facteur de transcription PPAR δ , avant d'exprimer PPAR γ de façon définitive⁹⁰. Cette phase précoce de différenciation se termine par les expressions transitoires de C/EBP (CCAAT/Enhancer-Binding Protein) β et δ , qui sont ensuite remplacés par C/EBP α ⁹¹. Dans un deuxième temps, les préadipocytes engagés entrent en phase tardive de différenciation et se différencient en adipocytes matures. Cette phase de différenciation est marquée par l'expression des gènes du métabolisme lipidique⁹². L'expression des transporteurs aux lipides ap2 et CD36 ainsi que celle de la périlipine permettent l'accumulation des lipides dans la gouttelette lipidique⁹³⁻⁹⁵. Enfin, les adipocytes expriment des gènes spécifiques des adipocytes matures tels que la LHS et la leptine^{96,97}. L'ensemble de ce processus est sous le contrôle de protéines de la voie Wnt, des facteurs de croissance BMP (Bone Morphogenic Protein) et des facteurs de transcription de la famille des PPAR, S/REBP (Sterol/Regulatory Element Binding Protein) et C/EBP⁹⁸.

B- Autres potentiels de différenciation

Comme les MSC, les ASC murines et humaines sont capables de se différencier en ostéoblastes en réponse à une stimulation par de la dexaméthasone, du β -glycerophosphate, de la vitamine D3 et du BMP2⁹⁹. Elles se différencient également en chondrocytes en réponse à l'Insulin Growth Factor (IGF) et au TGF- β ⁹⁹.

In vitro et *in vivo*, les ASC murines et humaines sont également capables de se différencier en d'autres cellules du lignage cellulaire mésodermique : cellules endothéliales¹⁰⁰, myocytes et cardiomyocytes, cellules qui semblent être fonctionnelles¹⁰¹.

Quelques études, exclusivement réalisées *in vitro*, montrent que les ASC humaines sont également capables de se différencier dans des lignages ectodermiques sous certaines conditions : Des ASC cultivées en présence d'acide rétinoïque ou d'une matrice de fibrine et traitées avec de l'EGF (Epithelial Growth Factor) expriment en effet des marqueurs géniques de cellules épithéliales^{102,103}. Un traitement des ASC en culture avec du peptide vasoactif intestinal induit la différenciation des ASC en cellules épithéliales rétinienne

pigmentaires¹⁰⁴. Dans des conditions de culture appropriées, les ASC murines seraient également capables de se différencier en cellules neuronales et gliales¹⁰⁵.

Il a aussi été montré que les ASC seraient capables de se différencier en cellules du lignage endodermique. Elles auraient le potentiel de se différencier en hépatocytes *in vitro*¹⁰⁶ et en cellules endocrines pancréatiques capables de sécréter de l'insuline, du glucagon et de la somatostatine¹⁰⁷.

Il faut cependant noter que ces potentiels de différenciation ont été démontrés exclusivement *in vitro* avec des cocktails de différenciation très spécifiques. De plus, dans la plupart de ces études, les cellules matures n'ont été caractérisées que sur la base de leur phénotype (morphologie, expression génique et synthèse protéique). La seule étude fonctionnelle concerne la différenciation pancréatique. Après différenciation des ASC *in vitro*, leur greffe dans une souris atteinte de diabète de type 1 restaure la glycémie de l'animal grâce à la sécrétion d'insuline. Toutes ces différenciations n'ont été démontrées qu'*in vitro* et il n'existe, néanmoins, à ce jour aucun argument *in vivo* permettant de penser que les ASC pourraient être des cellules réellement pluripotentes.

C- *Activité sécrétoire*

A côté de leur potentialité de différenciation, les ASCs sécrètent de multiples molécules que l'on peut classer en trois grandes familles d'intérêt thérapeutique : molécules pro-angiogéniques, facteurs immunomodulateurs et molécules de remodelage tissulaire.

Les études *in vitro* et l'utilisation d'ASC murines ou humaines dans des modèles d'ischémie du membre inférieur a permis de montrer un effet pro-angiogénique de ces cellules, qui passe en partie par la sécrétion de facteurs tels que le HGF (Hepatic Growth Factor) et le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)^{108 109}. Le VEGF agit sur les cellules endothéliales et permet la néoangiogenèse¹¹⁰. Le laboratoire a également montré que la sécrétion de ces facteurs angiogéniques diminue avec l'âge, mais cette diminution peut être réversée par un mécanisme dépendant des espèces actives de l'oxygène^{111,112}.

Les ASC murines et humaines sont également capables de sécréter des facteurs impliqués dans l'immuno-modulation¹¹³. *In vivo* et en situation physiologique, ces cellules sécrètent, en effet, des facteurs paracrines permettant la suppression de la réponse immunitaire, *via*

notamment l'activation des lymphocytes T régulateurs anti-inflammatoires et l'inhibition des lymphocytes T CD4 Th1 pro-inflammatoires. Ces facteurs paracrines incluent l'indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO), la prostaglandine E2 (PGE2) l'IL-10 et le TGF- β (Transforming Growth Factor-beta)¹¹⁴. A l'inverse, *in vitro* et en réponse à une stimulation pro-inflammatoire, ces cellules sont capables de sécréter des facteurs pro-inflammatoires tels que l'IL-6, l'IL-8, l'IL-7, l'IL-11 et le TNF- α ¹¹⁵.

Enfin, les ASC jouent un rôle important dans le remodelage tissulaire *via* la sécrétion de molécules de la matrice extracellulaire (comme par exemple la tenascine C, du collagène et la fibronectine)¹¹⁶, ainsi que des facteurs de croissance (HGF, FGF-1)¹¹⁶ ou des protéases (cathepsine, metalloprotéases)¹¹⁷. Chez l'homme, ces sécrétions sont notamment induites par le TNF- α . La sécrétion de cathepsines par les ASC permet de plus de favoriser la transition épithélio-mésenchymateuse et la revascularisation, et par conséquent la cicatrisation de la peau¹¹⁸.

Par ailleurs, les propriétés pro-angiogéniques et immuno-modularices des ASC participent à leur effet sur le remodelage tissulaire. Le milieu conditionné d'ASC est en effet capable d'attirer les macrophages sur les sites lésionnels grâce à la présence dans ce milieu de MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), d'IL-6 et d'IL-8¹¹⁷. Il a également été montré que du milieu conditionné d'ASC stimule la prolifération et la migration des kératinocytes humains, *via* la sécrétion de CTGF (Connective Tissue Growth Factor), de PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1), de G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor), d'IL-6, de VEGF et de TGF- β ¹¹⁹. Ces données montrent le rôle clé des ASC lors de la phase inflammatoire et du remodelage tissulaire associé à une lésion.

D- Support de l'hématopoïèse

Comme les MSC médullaires, les ASC sont capables de contrôler l'activité hématopoïétique. Le mécanisme par lequel les ASC soutiennent l'hématopoïèse n'est à l'heure actuelle pas bien décrit. Chez l'homme ce support de l'hématopoïèse passerait par une sécrétion de facteurs solubles tels que l'IL-6, l'IL-7, le M-CSF (Monocyte-Colony Stimulating Factor), le G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor), le GM-CSF (Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor), le SDF-1 (Stromal Derived Factor-1 ou CXCL12) et le SCF (Stem Cell

Factor ou Kit-Ligand)¹¹³. La sécrétion de ces facteurs, décrite qu'*in vitro*, stimulerait à la fois la survie et la différenciation des CSH.

In vitro, dans des expériences de co-culture, les ASC murines et humaines induisent la différenciation des CSH médullaires vers les lignages myéloïdes et lymphoïdes^{115,120-122}. *In vivo*, la co-injection d'ASC et de CSH de MO humaines dans des souris NSG immuno-déficientes accélère la reconstitution hématopoïétique, et donc limite la période d'aplasie. Il a ainsi été proposé qu'*in vivo*, les ASC forment une niche hématopoïétique propice à la prolifération et à la différenciation des CSH humaines¹²³.

Cellules	Rôle général	Rôle dans le TA
Mph M2	Anti-inflammatoire	Phagocytose des adipocytes apoptotiques
		Sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF-B)
		Remodelage de la matrice extra-cellulaire
		Bénéfiques sur le métabolisme énergétique
Mph M1	Pro-inflammatoire	Entretien de la réponse inflammatoire
		Sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1B, TNF-a, IL-6)
		Délétère sur le métabolisme énergétique
Polynucléaires éosinophiles	Réponse anti-parasitaire	Anti-inflammatoire (IL4, IL13)
Polynucléaires neutrophiles	Pro-inflammatoire	Initiation de l'inflammation
Mastocytes	Réponse allergique	Indéterminée (Population qui augmente avec l'obésité)
Cellules NK	Réponse immunitaire cytotoxique	Pro-inflammatoire
LT CD8	Réponse immunitaire cytotoxique	Pro-inflammatoire (IFN γ) activent les macrophages M1
LT CD4 Th1	Activent la réponse immunitaire cytotoxique	Pro-inflammatoire (IFN γ , IL-2) activent les mph M1
LT CD4 Th2	Activent la réponse immunitaire humorale	Anti-inflammatoire (IL-4, IL-5, IL-13) activent les macrophages M2
LB	Réponse immunitaire humorale	Indéterminée (Population qui augmentent avec l'obésité)
ILC2	Anti-inflammatoire	Anti-inflammatoire (sécrètent de l'IL-5 et IL-13)
		Activation des éosinophiles et des macrophages M2
		Stimulation du <i>browning</i>

Tableau 2 : Rôle général des cellules immunitaires présentes dans le TA

Mph: Macrophages ; LT: Lymphocytes T ; LB: Lymphocytes B ;

ILC2: Cellules innées lymphoïdes de type 2

Chapitre 2 : Composante immunitaire des TA

I. Les Cellules immunitaires

Les cellules immunitaires, caractérisées par l'expression du marqueur de surface CD45, représentent 30 à 40% des cellules de la SVF du TA blanc, chez la souris et l'homme, soit environ 20% des cellules totales du dépôt adipeux¹²⁴. Peu d'études se sont intéressées aux différences possibles des populations de cellules immunitaires entre les dépôts blancs sous-cutanés et viscéraux, la plupart utilisant indistinctement les TA viscéral et/ou sous-cutané. La littérature concernant les cellules immunitaires du BAT est, elle, beaucoup moins fournie et beaucoup plus récente.

Les cellules immunitaires du TA peuvent être classées en deux catégories : des cellules anti-inflammatoires (macrophages M2, polynucléaires éosinophiles, lymphocytes T régulateurs et innate lymphoid cells), et des cellules pro-inflammatoires (macrophages M1, polynucléaires neutrophiles et basophiles, mastocytes, lymphocytes T CD8 et CD4 Th1). La balance entre ces deux catégories de cellules est un élément crucial dans le contrôle de l'homéostasie de ce tissu¹²⁵.

Dans ce chapitre, nous allons dans un premier temps décrire les populations immunitaires présentes dans le TA en conditions physiologiques, puis nous aborderons le rôle physiopathologique de ces cellules dans des contextes où le métabolisme du TA est modifié. Le rôle général des cellules immunitaires ainsi que leurs rôles dans le TA sont détaillés dans le tableau 2.

1) Les macrophages

Les macrophages représentent la population immunitaire la plus abondante au sein du TA (40-50% des cellules immunitaires du TA) et sont caractérisés par l'immuno-phénotype CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁺ ¹²⁶. Il est classiquement admis que les macrophages peuvent présenter deux phénotypes distincts : un phénotype pro-inflammatoire (ou M1) et un phénotype anti-inflammatoire (ou M2). Ces deux phénotypes se caractérisent par des marqueurs de surface et des fonctions différentes¹²⁷. Dans le TA blanc chez la souris et

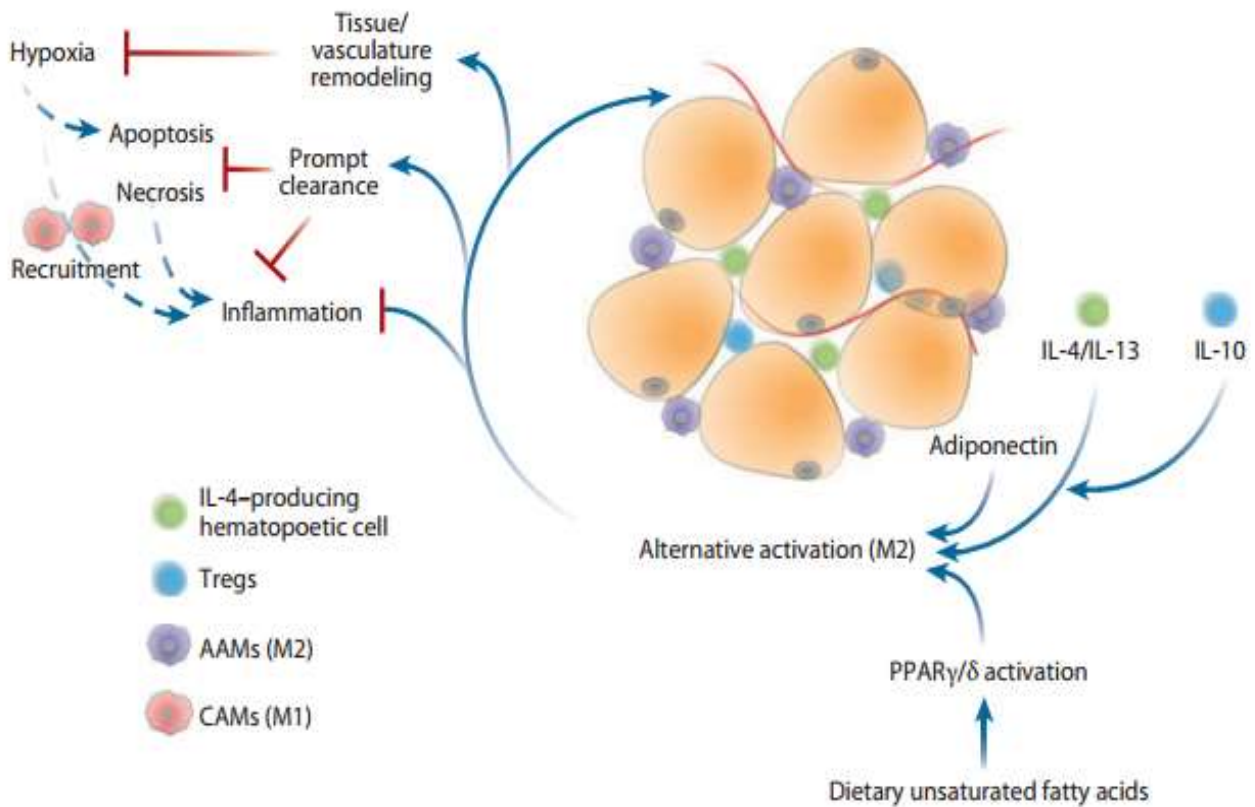


Figure 5 : rôle des macrophages M2 dans le TA

Les cytokines IL-4 et 13 produites par les polynucléaires éosinophiles, l'IL-10 produite par les lymphocytes Tregs, ainsi que les AG insaturés activent la polarisation des macrophages de type M2. Ces macrophages M2 limitent l'inflammation au niveau local, phagocytent les adipocytes apoptotiques et favorisent le remodelage et la vascularisation du TA

AAMs: Alternately Activated Macrophages (= macrophages M2) ; CAMs: Classically Activated Macrophages (= macrophages M1)

D'après Odegaard et Chawla, Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 2011. 6:275–97

l'homme, en condition physiologique, les macrophages sont majoritairement de type M2¹²⁸. Ils exercent un effet plutôt bénéfique dans le contrôle de l'homéostasie du TA et du métabolisme énergétique en général¹²⁹. Ils sont notamment impliqués dans l'adipogenèse en stimulant la prolifération et la différenciation des ASC *via* la sécrétion d'ostéopontine¹³⁰ et participent à la clairance des adipocytes apoptotiques *via* la formation de crown-like structures (CLS)¹³¹. Ils sécrètent également de l'IL 10 et des protéases comme l'arginase permettant notamment le remodelage de la matrice extra-cellulaire et l'angiogenèse¹³² (fig. 5). Il a été montré chez des animaux normopondérés que la quantité de macrophages et de CLS est supérieure dans le dépôt périgonadique (PGAT) par rapport au dépôt sous-cutané (SCAT)¹³¹. Ces données suggèrent un renouvellement des adipocytes plus rapide dans le PGAT que dans le SCAT, même si cela n'a jamais été démontré.

Jusqu'à récemment, la communauté scientifique considérait que la population de macrophages du TA résultait, uniquement, de l'infiltration de monocytes circulants¹³³⁻¹³⁵. Cela a été en partie remis en cause par la mise en évidence d'une prolifération des macrophages *in situ* pour maintenir le pool de macrophages locaux indépendamment d'une activation de l'hématopoïèse médullaire¹³⁶. D'autres données suggèrent que les ASC pourraient acquérir des caractéristiques (phénotype et fonction) de macrophages en réponse à des signaux appropriés¹³⁷⁻¹³⁹. Enfin, des résultats obtenus au laboratoire démontrent qu'il existe une production endogène de macrophages à partir de CSH résidentes dans le TA (cf chapitre 3).

2) Les autres cellules du lignage myéloïde

Parmi les autres cellules myéloïdes présentes dans le WAT en conditions physiologiques, on retrouve des polynucléaires, les plus abondants étant les éosinophiles. Les polynucléaires éosinophiles participent au recrutement de cellules immunitaires anti-inflammatoires par la sécrétion d'IL-4, d'IL-10 et d'IL-13¹⁴⁰ et à la polarisation des macrophages M2 par la sécrétion d'IL-4¹⁴¹. *In vivo*, le nombre de polynucléaires éosinophiles dans le TA est corrélé positivement à une bonne sensibilité à l'insuline¹⁴². Ils semblent, cependant, ne pas avoir d'effet direct sur l'adipocyte¹⁴³.

On retrouve également des mastocytes dans le TA. Ces mastocytes connus principalement pour leur rôle dans la réponse allergique sont peu nombreux dans le WAT en situation

physiologique. Le laboratoire a cependant montré que le WAT constituait un réservoir de progéniteurs mastocytaires¹⁴⁴. Leur rôle dans le TA reste peu étudié et les résultats de la littérature prêtent encore à controverse.

3) Les Lymphocytes T

Après les macrophages, les lymphocytes T (LT) CD3⁺ constituent la population de leucocytes la plus abondante dans le TA (environ 20% des cellules immunitaires dans la SVF), chez la souris comme chez l'homme. En condition normale, les LT du TA sont principalement anti-inflammatoires : CD4⁺ Th2 et T régulateurs (Tregs)¹⁴⁵. Les LT CD4⁺ Th2 ont une action immuno-suppressive en induisant la polarisation des macrophages vers un type M2 et contribuent ainsi à une meilleure sensibilité à l'insuline du TA¹⁴⁶. On peut noter que 2% des LT CD4⁺ Th2 du TA portent un TCR (T Cell Receptor) particulier de type $\gamma\delta$ qui serait impliqué dans la reconnaissance des motifs lipidiques¹⁴⁷ ; cette population serait davantage présente dans le PGAT que dans le SCAT¹⁴⁵.

Les Tregs constituent une population de lymphocytes de phénotype Foxp3⁺/CD4⁺/CD25⁺ dont la sécrétion de cytokines permet le maintien d'un phénotype anti-inflammatoire pour les cellules immunitaires du TA¹⁴⁷. Les Tregs sont ainsi associés à une meilleure sensibilité à l'insuline grâce à leur rôle inhibiteur de la réponse inflammatoire¹⁴⁸. Leur action anti-inflammatoire et bénéfique au niveau métabolique passerait probablement par des molécules de contact¹⁴⁹. Le lien entre les LT CD4⁺ Th2 et les Treg, tous deux immunosuppresseurs n'est pas clairement établi, certains auteurs ayant même suggéré que ces différents lymphocytes ne seraient en fait qu'un seul et même type de cellule¹⁵⁰.

4) Les autres cellules lymphoïdes

On retrouve également des cellules NK (Natural Killer) et NKT (Natural Killer T Cell) ainsi que des lymphocytes B, en faible nombre, dans le TA chez la souris¹⁴⁵. Le rôle de ces cellules en situation physiologique n'est pas très clair. Il a été proposé que les cellules NK limitent l'apparition de nouveaux adipocytes, *via* une inhibition de la différenciation des ASC¹⁵¹.

Enfin, la présence de cellules ILC2 (Type 2 Innate Lymphoid Cells) de phénotype Lin⁻/CD45⁺/CD25⁺/CD127⁺/IL33R⁺ a été récemment démontrée dans le TA blanc¹⁵². Ces cellules

jouent un rôle inhibiteur de la réponse inflammatoire par les cellules de l'immunité innée¹⁵³, *via* la sécrétion d'IL-5 et d'IL-13 qui activeraient, respectivement, les éosinophiles et les macrophages M2¹⁵⁴.

II. Rôle physiopathologique des cellules immunitaires du TA

1) Le *browning*.

Comme indiqué précédemment (cf Chapitre 1, partie I. 3), le *browning* correspond à l'apparition d'adipocytes beiges au sein du TA blanc. L'implication des cellules immunitaires dans ce processus n'a été étudiée que de façon très récente, et reste peu décrite.

Il a cependant été montré chez la souris que les éosinophiles sont impliqués dans le processus de *browning* du WAT *via* la production d'IL-4 activatrice des macrophages M2^{140,155}. Ces macrophages M2 sont capables de synthétiser et sécréter des catécholamines comme la noradrénaline qui active directement l'expression d'UCP-1 dans les adipocytes par l'intermédiaire des récepteurs β_3 adrénergiques¹⁵⁶. Cette synthèse a cependant été remise en cause très récemment. Des expériences ont en effet montré que la délétion du gène de la tyrosine hydroxylase (enzyme clé dans la voie de synthèse des catécholamines), spécifiquement dans les cellules immunitaires, ne perturbe en aucun cas le *browning* du TA chez les souris exposées au froid¹⁵⁷. Les auteurs proposent que les catécholamines sécrétées par les macrophages M2 proviennent non pas d'une synthèse *de novo* mais d'une phagocytose par ces cellules immunitaires. Un autre acteur a aussi été récemment impliqué dans le *browning* du TA chez la souris. Il s'agit des ILC2 qui auraient, à la fois, un rôle direct et indirect sur l'émergence d'adipocytes beiges : d'une part *via* la sécrétion d'enképhalines qui stimulerait l'expression d'UCP-1, et d'autre part *via* la sécrétion d'IL-5 et d'IL-13 qui activeraient respectivement les éosinophiles et les macrophages M2. Cette activation des ILC2 aurait lieu en réponse à une stimulation par l'IL-33¹⁵⁸ (fig. 6).

Chez l'homme, les mastocytes pourraient, eux aussi, être impliqués dans le *browning* du TA lors de l'exposition au froid¹⁵⁹. Néanmoins, les conclusions de cette étude reposent sur des

corrélations d'expression génique avec un faible nombre de sujets et des modèles *in vitro* sans démontrer le rôle causal des mastocytes sur le *browning*.

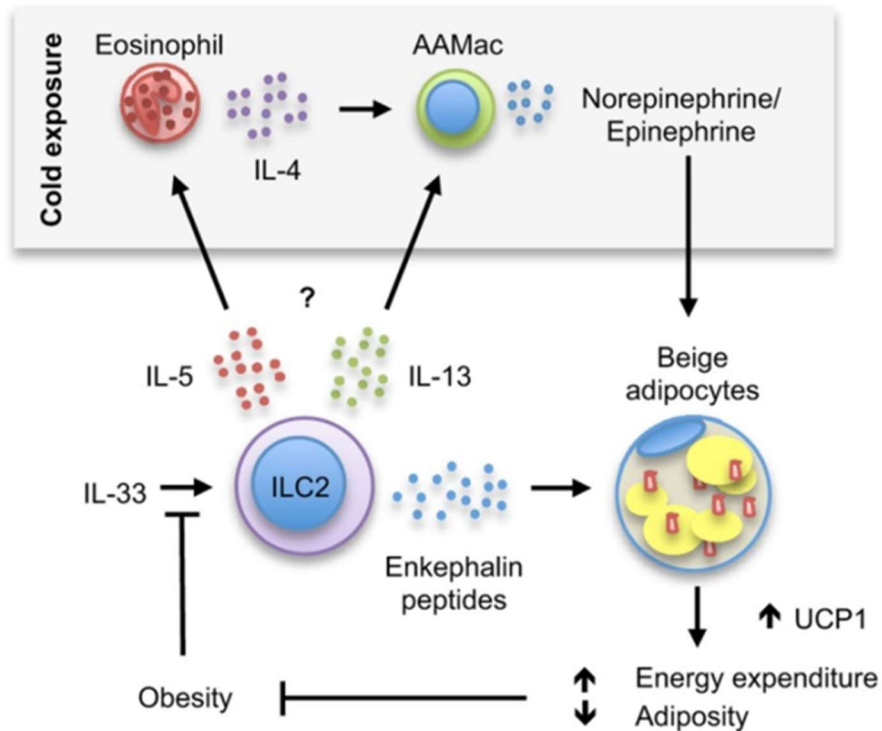


Figure 6 : Régulation du *browning* du TA par les ILC-2 en réponse à l'IL-33

L'IL-33 active la sécrétion d'énképhalines par les ILC-2, stimulant le *browning* des adipocytes, ainsi que la sécrétion d'IL-5 et d'IL-13 activant les éosinophiles et les macrophages M2. Les éosinophiles sécrètent également de l'IL-4 activant les macrophages M2 et leur sécrétion de catécholamines inductrices elles-aussi du *browning*.

D'après Brestoff et al., Nature, 2015

2) Obésité/Diabète

L'obésité est une maladie qui s'accompagne d'une inflammation chronique à bas bruit. Le déséquilibre de l'homéostasie immuno-métabolique qui caractérise cette situation pathologique est entretenue à la fois par les sécrétions adipocytaires mais aussi par le recrutement et l'activation de cellules immunitaires inflammatoires¹⁶⁰. Chez la souris et l'homme obèses, on observe au niveau du TA, une augmentation du nombre de cellules immunitaires de phénotype pro-inflammatoire au détriment des cellules immunitaires de phénotype anti-inflammatoire. Une corrélation positive a en effet été montrée entre la masse grasse et le nombre de macrophages, préférentiellement M1, dans le tissu adipeux chez la souris et l'homme^{161,162}. A l'inverse, une diminution du nombre de cellules anti-inflammatoires telles que les LT CD4⁺, les macrophages M2, les éosinophiles ou les ILC2 a été décrite dans le TA de sujets obèses (fig.7)^{125,158,163}. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'accumulation de macrophages dans le TA chez la souris obèses tels que le recrutement de monocytes circulants ou la prolifération des macrophages résidents¹⁶⁴⁻¹⁶⁷.

Ces modifications peuvent être très rapides puisque, dès 3 jours de régime riche en gras, le nombre de neutrophiles dans le TA abdominal augmente d'un facteur 20 chez la souris¹⁶⁸. Ces cellules sécrètent alors des facteurs pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-8 et MIP-1 α induisant l'activation des lymphocytes T CD8 et des macrophages de type M1 caractérisés par un phénotype membranaire CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁺/CD11c⁺^{163,169} (fig. 8). Les lymphocytes T CD8 activés sécrètent de l'INF γ , qui stimule l'accumulation des macrophages dans le TA et participe à leur polarisation M1¹⁷⁰⁻¹⁷² (fig. 8). Les lymphocytes T CD8 s'infiltreraient avant les macrophages et participeraient ainsi au recrutement des macrophages dans le TA, sans que le mécanisme soit clairement établi¹⁷³. Ces macrophages M1 organisés en crown-like structures (CLS) contribuent au recrutement de pré-adipocytes par la sécrétion d'ostéopontine^{174,175}. Il faut cependant noter que la distinction entre phénotype M1 et M2 des macrophages n'est pas aussi évidente *in vivo*. Ces deux phénotypes correspondent à deux extrêmes ayant été décrits pour faciliter la compréhension et l'étude de ces cellules. Dans le TA, les macrophages se répartiraient ainsi dans un continuum allant d'un phénotype M1 à M2 ; leur proportion relative serait fonction des signaux de l'environnement¹⁷⁶.

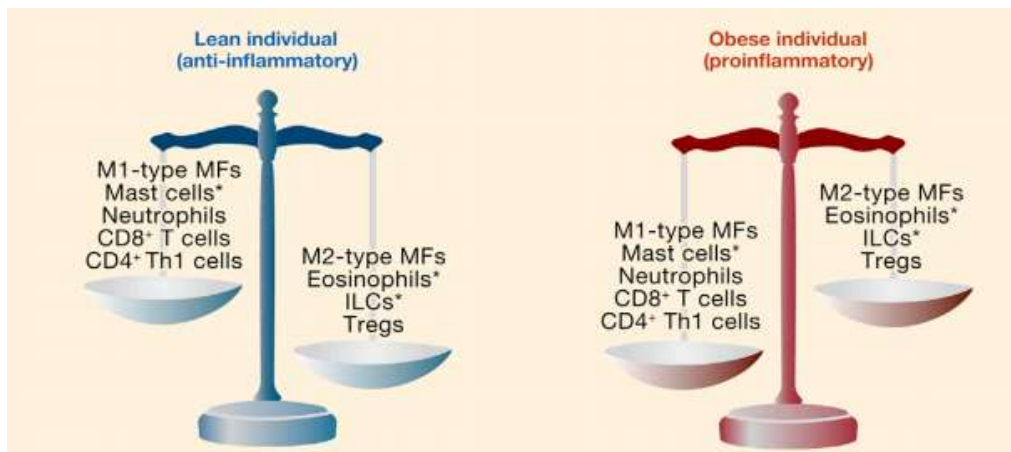


Figure 7 : populations immunitaires dans le TA blanc en situation physiologique et en situation pathologique

En situation physiologique, les cellules sont majoritairement de phénotype anti-inflammatoire avec une majorité de macrophages de type M2, d'éosinophiles, de cellules lymphoïdes innées (ILCs) et de lymphocytes T régulateurs et une minorité de cellules pro-inflammatoires comme les macrophages de type M1, les mastocytes, les neutrophiles et les lymphocytes T CD4 Th1 et CD8. En situation d'obésité, ce rapport de force s'inverse avec une majorité de cellules à caractère pro-inflammatoire.

D'après Mathis, Cell Metabolism, 2013

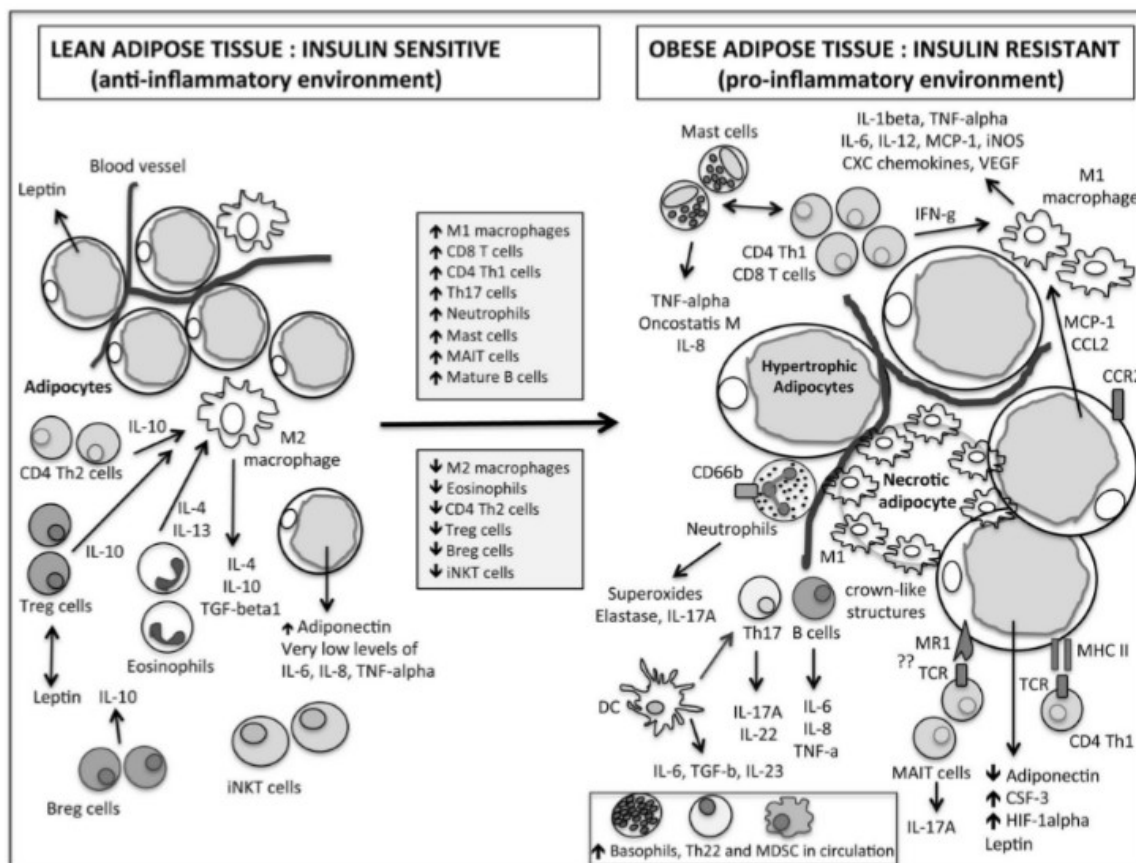


Figure 8 : Modification de l'état inflammatoire du TA en réponse à l'obésité

En situation physiologique, les macrophages de type M2, les éosinophiles, les lymphocytes T CD4 Th2 et les Tregs maintiennent un environnement anti-inflammatoire. Chez l'obèse, la transition vers des populations immunitaires inflammatoires produit un environnement pro-inflammatoire responsable d'une insulino-résistance dans les adipocytes.

D'après Apostolopoulos et al., Mol. Nutr. Food. Res., 2016

Parmi les autres cellules immunitaires impliqués dans la réponse inflammatoire du TA chez la souris obèse, figurent les mastocytes, *via* une augmentation de leur nombre et de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires¹⁷⁷, mais leur rôle est moins bien décrit et prêté à controverse^{178,179}. Il existe également une augmentation du nombre de lymphocytes B et de cellules NKT dans le TA viscéral au cours de l'obésité. Ces cellules stimulent l'activation des macrophages M1 ainsi que celle des lymphocytes T CD4⁺ Th1^{180,181}.

Cet état inflammatoire chronique dans le TA a des effets délétères sur le métabolisme de ce tissu et de l'organisme en général, en diminuant la sensibilité à l'insuline¹⁸². Bien avant la mise en évidence du rôle des macrophages dans l'inflammation du TA, il avait été observé qu'un traitement des adipocytes blancs par le TNF α (une cytokine produite par les macrophages pro-inflammatoires M1) induit une diminution de la translocation du transporteur GLUT-4 à la membrane plasmique en réponse à l'insuline¹⁸³, conduisant à une moindre utilisation du glucose et donc à une hyperglycémie, caractéristique d'un diabète de type 2. Il est intéressant de noter qu'il existe des interconnexions entre la voie de signalisation à l'insuline et les cascades de signalisation de certaines cytokines, ce qui permet d'expliquer comment un état inflammatoire peut altérer la réponse à l'insuline notamment dans l'adipocyte¹³² (fig. 9).

Le rôle des macrophages M1 dans le développement des maladies métaboliques a été démontré dans plusieurs modèles murins. La délétion de gènes de l'inflammation (Jnk, Ikk) spécifiquement dans les macrophages protège les souris d'un diabète secondaire à la mise en place d'une obésité^{184,185}. L'inactivation de gènes impliqués dans la fonction des macrophages tels que *Sorbs1*¹⁸⁶ ou codant pour des protéines d'adhésion impliquées dans l'infiltration des macrophages¹⁸⁷ inhibe également le développement du diabète chez la souris obèse. Enfin, le rôle spécifique des macrophages pro-inflammatoires CD11c⁺ dans le développement du diabète a été démontré par l'utilisation de souris CD11c-DTR. Dans ce modèle, la déplétion des macrophages CD11c⁺ (alors que les souris sont sous régime riche en gras obésogène) par un traitement avec la toxine diphtérique induit une amélioration de la signalisation à l'insuline dans les adipocytes et une meilleure tolérance au glucose¹⁸⁸. Ces résultats confirment le rôle crucial des macrophages M1 dans l'initiation de l'inflammation du TA et la mise en place de l'insulino-résistance.

Plusieurs études se sont intéressées aux différences entre le WAT et le BAT en termes de contenu en macrophages et de signalisation inflammatoire¹⁸⁹. Le contenu en macrophages du BAT est inférieur à celui du WAT¹⁸⁹. La production de cytokines pro-inflammatoires par le BAT est aussi moins importante que dans le WAT, ce qui est cohérent avec le rôle bénéfique du BAT sur la « santé métabolique » de l'organisme.

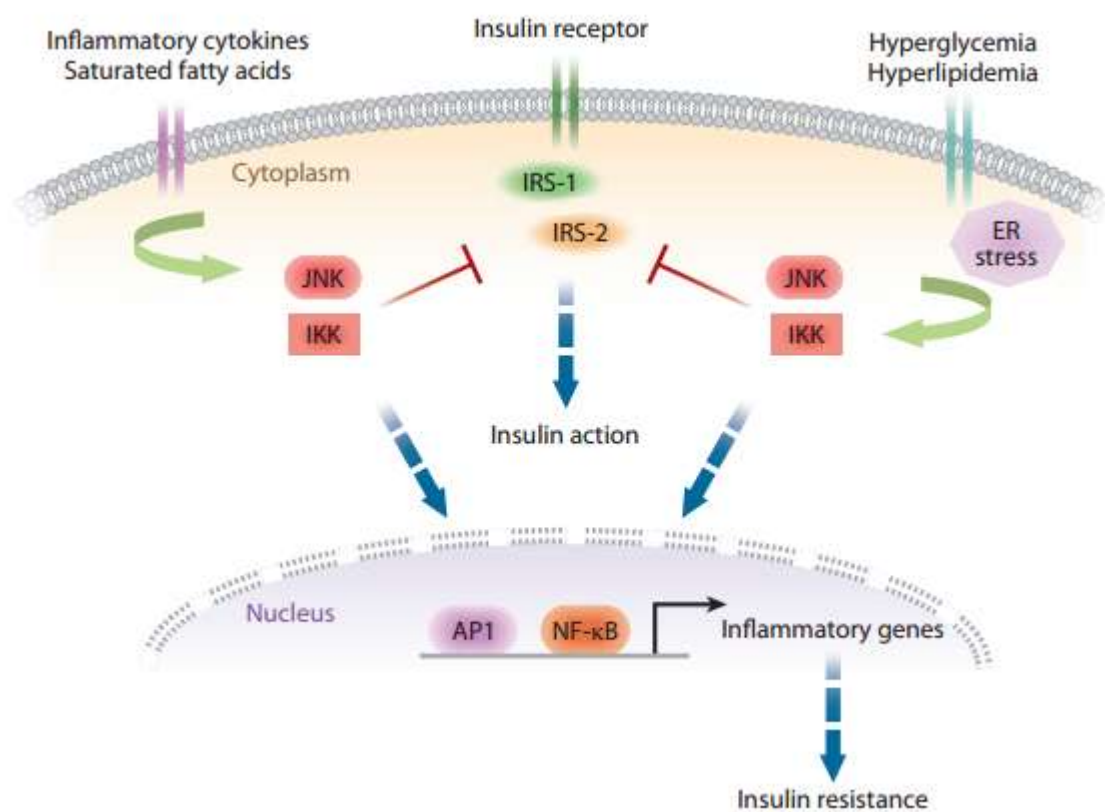


Figure 9 : Inhibition de la signalisation à l'insuline par les cytokines inflammatoires

En réponse à des cytokines pro-inflammatoires, des acides gras saturés ou un stress nutritionnel, l'activation de la *Jun-Kinase* (JNK) et de l'*inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase* (IKK) va phosphoryler les complexes protéiques IRS-1 et IRS-2 (Insulin Receptor Signal) et inhiber la voie de signalisation de l'insuline.

D'après Odegaard et Chawla, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2011. 6:275–97

III. Contrôle de la réponse inflammatoire du TA par l'adipocyte

La réponse inflammatoire dans le TA peut être contrôlée par les adipocytes eux-mêmes, ce qui contribue à former une boucle de régulation qui entretient l'inflammation chez l'obèse. Ce contrôle s'effectue au niveau du recrutement des cellules inflammatoires dans le tissu mais également au niveau de leur activation.

Chez le sujet obèse, les adipocytes sécrètent des facteurs chimiotactiques (MCP-1 et dans une moindre mesure, CX3CL1 et chémérine) qui contribuent au recrutement de monocytes circulants^{181,190,191}. Le CX3CL1 et la chémérine seraient également impliquées dans le recrutement et l'adhérence vasculaire des lymphocytes T^{190,191}. La leptine permet aussi le recrutement et l'activation des polynucléaires neutrophiles^{192,193}.

Les adipocytes peuvent également activer directement ou indirectement les cellules immunitaires pro-inflammatoires résidentes du TA *via* leurs sécrétions ou par des mécanismes de contact. Les sécrétions d'IL-6 et de TNF- α (tableau 1) par l'adipocyte induisent la différenciation des monocytes en macrophages de type M1, pro-inflammatoires¹⁶⁰. La sécrétion de leptine peut, elle-aussi, activer la sécrétion d'IL-6 et de TNF- α par les monocytes et les macrophages, ainsi que d'IL-2 et d'INF- γ par les lymphocytes T¹⁹⁴ et contribuer ainsi à amplifier leurs effets pro-inflammatoires.

Enfin, les AG libérés par les adipocytes participent également au contrôle de l'activité des cellules immunitaires. La présence d'AG saturés tels que le palmitate et l'oléate dans le TA permet le « switch » des macrophages M2 vers un phénotype M1¹⁹⁵. Le rôle des AG sur les macrophages a également été suggéré dans une étude qui compare l'effet des adipocytes bruns à celui des adipocytes blancs sur le profil inflammatoire des macrophages *in vitro*. En présence d'adipocytes bruns, les macrophages synthétisent et sécrètent moins de cytokines inflammatoires par rapport à une co-culture avec des adipocytes blancs¹⁹⁶. Les auteurs proposent que cette différence soit due à une libération moins importante d'AG dans le milieu de culture par les adipocytes bruns que par les adipocytes blancs.

De manière très intéressante, il a également été récemment suggéré que les adipocytes peuvent se comporter comme des cellules présentatrices d'antigènes¹⁶⁰. Les adipocytes exprimeraient un Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I (CMH I) qui permettrait l'activation des lymphocytes T CD8, mais il n'a cependant pas été montré d'interaction

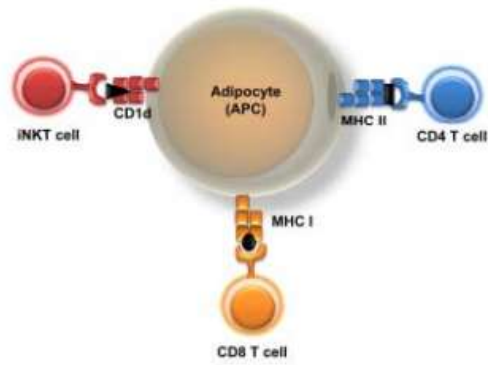


Figure 10 : L'adipocyte, cellule présentatrice d'antigène

Les adipocytes pourraient activer les lymphocytes T CD8 via leur CMH de classe I et les lymphocytes T CD4 via leur CMH de classe II, ils peuvent également activer les lymphocytes NKT grâce au CD1d.

D'après Huh et al., Molecules and Cells, 2014.

directe entre les adipocytes et ces lymphocytes¹⁹⁷. Les adipocytes exprimeraient également le CMH de classe II, permettant l'activation des lymphocytes T CD4¹⁹⁸, ainsi qu'un CD1d permettant la présentation d'un antigène lipidique et l'activation des lymphocytes NKT invariants¹⁹⁹ (fig.10). En dépit de ces découvertes, la contribution de ces interactions dans la réponse inflammatoire du TA chez l'obèse n'a jamais été étudiée.

Ces données permettent de proposer un véritable rôle immuno-modulateur des adipocytes, capables de réguler localement la réponse inflammatoire à la fois par des mécanismes de sécrétion mais également par des mécanismes d'interaction cellulaire directe.

En conclusion, le maintien de l'homéostasie du TA est un équilibre subtil entre différents types cellulaires, régulé par une combinaison complexe de signaux qui ne sont pas encore complètement caractérisés. Il est à noter que lors de la mise en place d'une inflammation, cet équilibre est perturbé et mène à des modifications à la fois qualitatives et quantitatives des populations immunitaires du TA. Normalement, ces modifications sont contre-balançées par les cellules immunitaires anti-inflammatoires, permettant ainsi une résolution de l'inflammation et un retour à l'équilibre homéostatique du tissu. On peut supposer que l'intérêt évolutif de cette réponse inflammatoire est la mise en compétition de deux systèmes pour l'accès aux substrats énergétiques : d'un côté le TA stockerait les substrats énergétiques, assurant la survie de l'organisme en situation de jeûne. De l'autre le système immunitaire, en cas d'inflammation, bloquerait ce stockage pour fournir de l'énergie aux cellules immunitaires afin de lutter contre les infections. L'activation au niveau des adipocytes de mécanismes pro-inflammatoires, par les cellules immunitaires (polynucléaires neutrophiles, macrophages M1, lymphocytes T CD8 et CD4 Th1) du TA induit un recrutement de ces mêmes cellules immunitaires pro-inflammatoires et auto-entretient cette réponse inflammatoire. Chez l'obèse, cet équilibre est dérégulé du fait d'une inflammation chronique au niveau du TA. *In fine*, l'emballement du système et l'auto-entretient de la réponse inflammatoire dépasserait un seuil à partir duquel la résolution de l'inflammation ne serait plus possible. Il est donc crucial de comprendre quels sont les mécanismes responsables de la mise en place de ce cercle vicieux, et d'agir avant le point de non-retour, dans un but thérapeutique des maladies métaboliques.

Le métabolisme énergétique et le système immunitaire font partie des exigences les plus fondamentales pour la survie des organismes vivants. Le premier permet la conservation de l'énergie pour assurer la survie et la fonction des organes vitaux, le second permet la lutte contre les organismes pathogènes. Beaucoup de voies de signalisation métabolique et immunitaire ont ainsi été conservées à travers l'évolution des espèces et sont interconnectées. Cette interface peut être envisagée comme un mécanisme central de l'homéostasie de l'organisme, dont le dysfonctionnement peut mener à des désordres métaboliques²⁰⁰ et immunitaires. Il est en effet de plus en plus connu que l'obésité et/ou le diabète de type 2 sont associés à une perturbation du système immunitaire²⁰¹.

Chapitre 3 : L'hématopoïèse

L'hématopoïèse est le processus permettant la production des cellules sanguines de l'organisme tout au long de la vie de l'individu. Ce processus permet la production de 1000 milliards de cellules par jour, dont 70 milliards de globules rouges ou érythrocytes, à partir d'une population de Cellules Souches Hématopoïétiques (ou CSH) localisée dans la moelle osseuse (MO)²⁰².

I. Ontogénie de l'hématopoïèse

Au cours du développement embryonnaire, le système hématopoïétique se développe en plusieurs vagues successives et dans différents organes avant la mise en place de l'hématopoïèse définitive dans la MO. Dans cette partie, j'ai choisi de développer l'hématopoïèse embryonnaire chez la souris et l'homme, qui sont les deux modèles que j'ai utilisés pendant ma thèse, avant d'évoquer les autres espèces animales utilisées dans ce domaine de recherche.

Chez la souris, l'hématopoïèse embryonnaire a été étudiée par la purification de populations cellulaires dans différents tissus de l'embryon et la caractérisation de leur capacité à reconstituer à long terme l'hématopoïèse chez des animaux adultes irradiés²⁰³. Une activité hématopoïétique est observée dès 7 JPC (Jours Post-Coït) dans la région extra-embryonnaire du sac vitellin. Cette activité hématopoïétique est assurée par une population cellulaire exprimant les facteurs de transcription Scl/Tal1 et Gata-1, des gènes caractéristiques des CSH. Elle génère uniquement des érythrocytes et des macrophages et disparaît à partir de 9 JPC^{204,205}. Néanmoins, récemment, il a été montré que des progéniteurs hématopoïétiques produits dans le sac vitellin sont retrouvés dans les tissus à l'âge adulte et participent au renouvellement d'une partie des macrophages tissulaires²⁰⁶. Chez l'adulte, les macrophages tissulaires sont ainsi un mélange de macrophages d'origine embryonnaire vitelline et de macrophages d'origine médullaire²⁰⁷. A l'heure actuelle on ne connaît pas précisément les proportions, les caractéristiques et les rôles de ces macrophages d'origine embryonnaire.

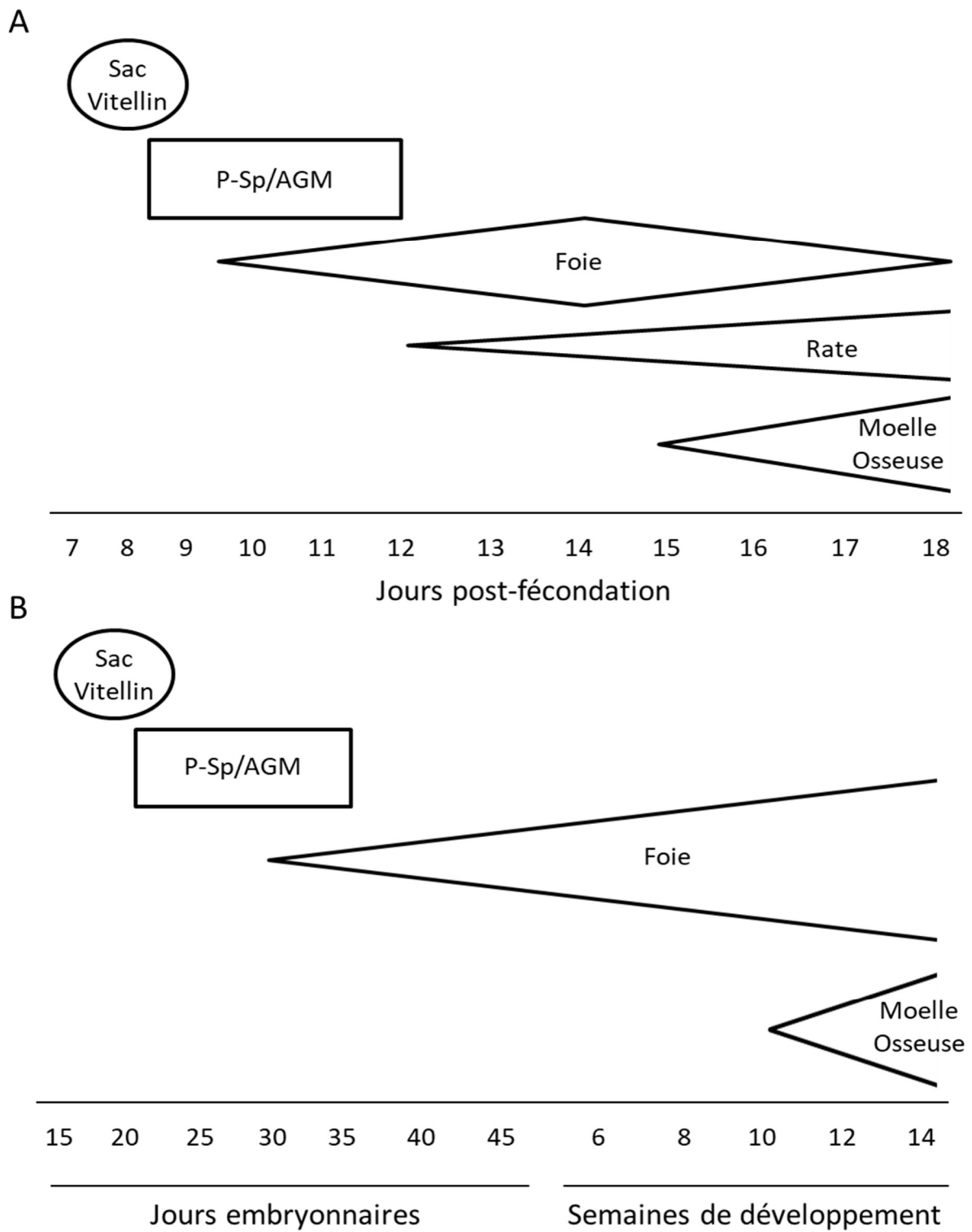


Figure 11 : Cinétique d'apparition de l'activité hématopoïétique dans les différents tissus durant l'embryogenèse chez (A) la souris et (B) l'homme

Adapté de Galloway et Zon, *Developmental Biology*, 2003

Toujours chez la souris, à partir de 9 JPC, des CSH apparaissent à partir de cellules souches appelées hémangioblastes dans la région dorsale de l'aorte ou p-Sp/AGM (Para-aortic Splanchnopleure/Aorte Gonade Mésonéphros)²⁰⁸. Il a été montré que les CSH dérivant de la zone p-Sp/AGM sont en fait produites à partir d'un endothélium hémogénique. L'endothélium hémogénique correspond à une population de l'aorte dorsale embryonnaire ayant un potentiel à la fois angiogénique et hématopoïétique^{209,210}. Cette activité hématopoïétique persiste jusqu'à 13 JPC grâce à des CSH de phénotype c-Kit⁺/CD34⁺²¹¹.

En parallèle de l'activité hématopoïétique dans la zone p-Sp/AGM, une activité hématopoïétique embryonnaire au niveau du placenta se met en place. Cette activité a été mise en évidence dès 1961 par Till et McCulloch, grâce à l'identification de CFU dans la rate de souris greffées avec des tissus placentaires²¹². *In vitro*, la co-culture de CSH d'origine placentaire avec une lignée de cellules stromales médullaire OP9 montre qu'elles sont multipotentes et ont des capacités de différenciation vers les lignages myéloïde, érythroïde, mais surtout lymphoïde. Ces cellules diffèrent des populations transitoires de progéniteurs hématopoïétiques présentes dans le sac vitellin qui ne produisent que des cellules myéloïdes et des érythrocytes²¹³. Ces CSH placentaires sont générées *de novo* en même temps que celles de la zone p-Sp/AGM²¹⁴. Elles proviendraient d'un endothélium hémogénique présent dans le placenta mais ne contribueraient pas à l'hématopoïèse de l'embryon²¹⁵. Il a été proposé que le placenta soit en fait un site d'amplification des CSH embryonnaires avant la colonisation du foie fœtal²¹⁶.

A partir de 10 JPC, le foie fœtal est colonisé par des CSH provenant à la fois du sac vitellin et de la région p-Sp/AGM²¹⁷. Cette colonisation engendre une activité hématopoïétique hépatique essentiellement érythroblastique pendant quelques jours avant de disparaître. La transition entre l'hématopoïèse embryonnaire et l'hématopoïèse définitive est assurée par une colonisation de la rate des embryons à 12 JPC, bien que cette hématopoïèse splénique ne démarre qu'à partir de 16 JPC²¹⁸. L'hématopoïèse définitive dans la MO est observée à 18 JPC grâce à la présence de CSH médullaires²¹⁸. Cependant, des précurseurs de lymphocytes B et T sont observés dans la MO à 15 et 17 JPC respectivement, suggérant que des progéniteurs produits précocément dans d'autres organes peuvent coloniser la MO pour y terminer leur maturation²¹⁹. La cinétique de la mise en place de l'hématopoïèse chez la souris est schématisée en figure 11A.

Chez l'homme, la caractérisation de l'HEM embryonnaire a été réalisée par immunohistochimie sur des tissus embryonnaires à différents stades de développement. Le schéma est relativement similaire à celui de la souris, avec une hématopoïèse primitive érythroblastique débutant dans le sac vitellin à 18,5 jours de développement²²⁰. Cette activité disparaît à 24 jours de développement²²¹ et est remplacée par une hématopoïèse dans la région p-Sp/AGM entre 24 et 34 jours. Cette hématopoïèse est assurée par des CSH ayant un potentiel de différenciation myéloïde et lymphoïde²²². Comme chez la souris, le placenta humain est également un organe hématopoïétique durant la vie embryonnaire, servant de réservoir permettant la prolifération des CSH, sans que celles-ci ne s'engagent dans une différenciation²¹⁵. Le foie est ensuite colonisé par des CSH CD34⁺ actives, à partir du 30^{ème} jour de développement. Ces CSH prolifèrent et leur nombre augmente jusqu'au 45^{ème} jour. Le foie reste alors le principal site hématopoïétique de l'embryon jusqu'à la naissance où son activité hématopoïétique cesse²²¹. Il n'y a pas d'hématopoïèse dans la rate lors du développement embryonnaire humain. L'hématopoïèse médullaire, quand à elle, apparaît à la dixième semaine de développement et persiste durant toute la vie de l'organisme. La cinétique de mise en place de l'hématopoïèse chez l'homme est schématisée en figure 11B.

L'ontogenèse du système hématopoïétique est un processus très conservé au cours de l'évolution chez les vertébrées, et différentes espèces animales ont servi de modèles d'études afin de mieux comprendre le développement de l'hématopoïèse chez l'homme.

Du fait de la facilité à le manipuler, l'embryon de poulet est le plus ancien modèle utilisé dans la compréhension de la biologie du développement. Le développement de chimères caille-poulet en 1969 par Nicole Le Douarin a permis de réaliser des expériences de traçage cellulaire *in vivo*²²³. Ces chimères permirent de découvrir que comme chez les mammifères, l'hématopoïèse embryonnaire démarre dans le sac vitellin²²⁴. Il y a ensuite une génération de CSH *de novo* au niveau au niveau de la zone aortique à partir de cellules endothéliales, avec la formation de foyers hématopoïétiques intra-aortiques (équivalent de la zone p-Sp/AGM des mammifères)²²⁵. L'activité hématopoïétique se poursuit enfin jusqu'à la naissance dans l'allantoïde, un appendice se formant dans la partie caudale de l'embryon à partir de l'intestin²²⁶. Chez le poulet, l'allantoïde produit également des CSH grâce à une population d'hémangioblastes, ces CSH iront ensuite coloniser la MO peu avant la naissance lors de la mise en place de l'hématopoïèse définitive²²⁷. Cet appendice est également

présent chez la souris et contient des progéniteurs hématopoïétiques, mais la présence de CSH dans l'allantoïde chez la souris n'a pas été observé²²⁸. L'utilisation d'embryon de poulet a également permis de mettre en évidence l'existence des lymphocytes B²²⁹. Depuis 2004, les modèles aviaires sont entrés dans l'ère de la génétique avec le séquençage du génome de poulet, des modèles transgéniques de cailles sont maintenant développées afin de réaliser de l'imagerie *in vivo*²³⁰.

Depuis une dizaine d'année, le poisson zèbre est devenu un modèle de choix dans l'étude de l'hématopoïèse au niveau embryonnaire. Bien qu'éloigné phylogénétiquement des mammifères ou des oiseaux, le développement embryonnaire de l'hématopoïèse y est assez similaire : les CSH apparaissent dans le mésoderme ventral dérivé de la masse cellulaire interne, elle-même dérivée du mésoderme latéro-postérieur²³¹. Des CSH sont ensuite générées au niveau de la région ventrale de l'aorte dorsale, aussi appelé AGM²³². Ces CSH migrent ensuite vers le tissu hématopoïétique caudal (CHT)²³³. Les CSH des zones AGM et CHT vont ensuite migrer vers la moelle rénale, l'équivalent de la moelle osseuse des mammifères, et donner l'hématopoïèse définitive larvaire et adulte²³³. Bien que les sites hématopoïétiques chez le poisson diffèrent d'avec les mammifères, ces modèles partagent les différents lignages de cellules hématopoïétiques matures, rendant les découvertes faites chez le poisson transposables aux mammifères²³⁴. L'avantage du poisson zèbre comme modèle réside dans sa facilité d'utilisation en terme d'élevage, de manipulation génétique, de screening pharmacologique, d'imagerie ainsi que de transplantation et a permis de nombreuses avancées dans la compréhension du contrôle moléculaire de l'hématopoïèse²³⁵⁻²³⁷.

II. Les CSH de la moelle osseuse

Les CSH sont des cellules souches adultes multipotentes et capables d'auto-renouvellement²³⁸. La multipotence des CSH a été mise en évidence *in vitro* par la production de clones des différents lignages, aussi appelée Colony Forming Unit (CFU)²³⁹. Plus tard, cette caractéristique a été mieux étudiée par la capacité des CSH à reconstituer les différents lignages hématopoïétiques après transplantation dans des souris irradiées²⁴⁰. L'auto-renouvellement permet la formation de deux cellules filles identiques et confère la

A

Phénotype	Fréquence de CSH
Lin ⁻ /Sca-1 ⁺	1/50
Lin ⁻ /Sca-1 ⁺ /c-kit ⁺ (KLS)	1/25
Lin ⁻ /Sca-1 ⁺ /c-kit ⁺ /Flk2 ⁻ (KLSF)	1/10
Lin ⁻ /Sca-1 ⁺ /c-kit ⁺ /Flk2 ⁻ /Thy1.1 ^{low} (KLSFT)	1/6
Lin ⁻ /Sca-1 ⁺ /c-kit ⁺ /Flk2 ⁻ /CD34 ⁻ (KLSF34 ⁻)	1/5
Lin ⁻ /Sca-1 ⁺ /c-kit ⁺ /Flk2 ⁻ /CD150 ⁺ /CD48 ⁻ (CSH)	1/2
Lin ⁻ /Sca-1 ⁺ /c-kit ⁺ /Flk2 ⁻ /CD150 ⁺ /CD48 ⁻ /CD34 ⁻ /CD135 ⁻ (CSH)	1,3/2

B

Phénotype	Fréquence de CSH
CD34 ⁺	
Lin ⁻ /CD34 ⁺ /CD90 ⁺	
CD34 ⁺ /CD38 ⁻	1/1600
Lin ⁻ /CD34 ⁺ /CD38 ⁻ /Rho ^{low}	1/30
Lin ⁻ /CD34 ⁺ /CD38 ⁻ /CD90 ⁺ /CD45RA ⁻	1/10

Tableau 3 : Phénotypes utilisés pour la caractérisation et la purification de populations cellulaires hétérogènes enrichies en CSH dans la MO chez la souris (A) et l'homme (B)

D'après Warr et al., WIREs. Systems Biology and Medicine, 2011

capacité d'une seule cellule à reconstituer à long-terme l'hématopoïèse d'un animal irradié à dose létale. Cela permet donc le maintien du processus hématopoïétique tout au long de la vie de l'organisme. L'auto-renouvellement des CSH est évalué lors de transplantations secondaires par la survie d'animaux irradiés et transplantés avec les CSH d'un animal issu d'une première transplantation.

Les CSH sont les cellules souches adultes multipotentes les plus étudiées. Ce sont cependant des cellules rares puisqu'elles représentent, dans la MO chez la souris, 1 cellule sur 20 000. Les différents phénotypes membranaires utilisés lors de l'identification des CSH permettent en fait l'obtention d'une population cellulaire hétérogène plus ou moins enrichie en CSH (tableau 3). De manière générale, ces populations sont définies par l'absence du panel de marquage Lin (Lineage Panel) qui est un cocktail d'anticorps détectant les antigènes de surface exprimés par les cellules hématopoïétiques matures (monocytes, granulocytes, érythrocytes, LB et LT), ainsi que par l'expression, chez la souris, des marqueurs de surface Sca-1 et c-Kit. Ce phénotype $\text{Lin}^-/\text{c-Kit}^+/\text{Sca-1}^+$, appelé KLS, est couramment utilisé pour purifier et/ou identifier une population de cellules souches/progénitrices enrichie en CSH. Ce phénotype permet un bon compromis entre simplicité d'identification et fréquence de CSH dans la population KLS (tableau 3A). L'utilisation du phénotype membranaire $\text{Lin}^-/\text{c-kit}^+/\text{Sca-1}^+/\text{Flk2}^-/\text{CD150}^+/\text{CD48}^-$ conduit à la détection et la purification d'une population de cellules immatures très enrichie en CSH dans la MO²⁴¹. Dans cette population de CSH, environ 30% des cellules sont $\text{CD34}^-/\text{CD135}^-$ ²⁴². Chez l'homme, le phénotype standard des CSH dans la MO est $\text{Lin}^-/\text{CD34}^+/\text{CD38}^-/\text{CD90}^+/\text{CD45RA}^-$ mais les populations CD34^+ , $\text{Lin}^-/\text{CD34}^+/\text{CD90}^+$, $\text{CD34}^+/\text{CD38}^-$ et $\text{Lin}^-/\text{CD34}^+/\text{CD38}^-/\text{Rho}^{\text{low}}$ sont également utilisées dans les expériences de transplantation dans des souris immuno-déficientes²⁴³ (tableau 3B). Chez l'homme comme chez la souris, l'expression ou pas du marqueur CD34 permet la distinction, respectivement, entre des CSH dites « à court-terme » (ST-CSH, CD34^+), et des CSH « à long-terme » (LT-CSH, CD34^-)²⁴⁴.

L'activité proliférative des LT-CSH est décrite comme faible par rapport à celle des ST-CSH. Les LT-CSH resteraient majoritairement dans un état de quiescence, les protégeant des dommages à l'ADN, ce qui en fait une population cellulaire relativement stable d'un point de vue génétique²⁴⁵. Jusqu'à récemment, les LT-CSH étaient considérées comme des cellules qui produisaient néanmoins régulièrement des progéniteurs se différenciant ensuite

immédiatement dans les différentes lignées cellulaires du système hématopoïétique. Cependant, le développement de techniques de marquage et de traçage très spécifiques *in vivo* (grâce à des recombinaisons aléatoires de l'ADN permettant un marquage génétique au niveau clonal) et permettant un suivi de l'hématopoïèse dans des situations plus physiologiques que des animaux irradiés, a remis en cause cette notion. Une étude récente²⁴⁶ montre, en effet, que les LT-CSH sont bien plus quiescentes que ce que l'on pensait, avec un taux de prolifération inférieur à 1 cycle cellulaire par an). Elles proliféreraient en fait beaucoup moins qu'attendu, et se différencieraient très peu en progéniteurs hématopoïétiques multipotents (MPP). Les MPP correspondraient, eux, aux ST-CSH, avec un taux de prolifération bien supérieur mais aussi une durée de vie plus longue que ce qui était jusqu'à présent envisagé. Ce sont eux qui permettraient le maintien de l'activité hématopoïétique en situation physiologique, au contraire des LT-CSH qui interviendraient en cas de besoin d'une production massive de cellules immunitaires (situation pathologique). Les auteurs expliquent que c'est ce système qui permettrait aux LT-CSH de conserver leur capacité de reconstitution hématopoïétique durant toute la vie de l'individu.

Ainsi, les CSH constituent une population cellulaire hétérogène. Bien que classiquement décrite sur la base de son phénotype membranaire, l'identification d'une CSH repose sur la mise en évidence, expérimentalement, de ses fonctions (multipotence, auto-renouvellement). La plupart des études se base sur des expériences de reconstitution du système hématopoïétique de souris préalablement irradiées et une analyse, *a posteriori*, de la descendance. L'association de ces « fonctions souches » avec des phénotypes membranaires a permis de mettre au point des techniques d'étude du système hématopoïétique et de proposer différents modèles de différenciation des cellules immunitaires.

III. Modèles de l'hématopoïèse

De manière générale, le modèle hiérarchique de l'hématopoïèse inclut une CSH au sommet de l'arbre de différenciation. Cette CSH va ensuite générer des progéniteurs des lignages lymphoïde et myéloïde. Les progéniteurs lymphoïdes produisent les lymphocytes T, B et NK.

Les progéniteurs myéloïdes produisent les cellules sanguines anucléées (érythrocytes et thrombocytes), ainsi que les monocytes/macrophages et les granulocytes²¹² (fig. 12A). La différenciation des cellules myéloïdes à partir des progéniteurs myéloïdes a été étudiée *in vitro* par la production de clones des différents lignages, aussi appelée Colony Forming Unit (CFU). Cette différenciation passe par plusieurs étapes mettant en jeu des progéniteurs unipotents ou bipotents de chaque type cellulaire²³⁹ (fig. 12B). Ces deux modèles permettent de rendre compte de la multipotence des CSH mais demeurent tout de même assez simples.

Un autre modèle (fig. 12C) plus complexe complète ces modèles et propose que les CSH soient réparties en CSH à long-terme (LT-CSH) quiescentes et rares et en CSH à court-terme (ST-CSH) plus prolifératives, plus fréquentes et provenant des LT-CSH. Les cellules myéloïdes auraient un progéniteur commun, CMP (Common Myeloid Progenitor), de même pour les cellules lymphoïdes avec un CLP (Common Lymphoid Progenitors). Dans ce modèle, les CMP produisent des progéniteurs multipotents et non unipotents des différents lignages myéloïdes. Les érythrocytes et les thrombocytes partageraient ainsi un progéniteur commun issu du CMP, mais distinct du progéniteur commun des granulocytes et des monocytes. Les CLP produiraient, eux, des progéniteurs unipotents des lymphocytes²⁴⁰ (fig. 12C).

Plus récemment, il a été montré que les différents progéniteurs de chaque lignage conserveraient la capacité à se différencier en monocytes²⁴⁷ (fig. 12D). La CSH aurait la capacité de se différencier, en plus d'une différenciation monocyttaire directe, en progéniteur commun monocyte-érythrocyte (CMEP) et en progéniteur commun monocyte-lymphocyte (Common Monocyte Lymphocyte Progenitor ou CMLP), ce progéniteur commun donnerait des précurseurs lymphocytaires bipotents (Monocytes et lymphocytes T ou Monocytes et lymphocytes B) (fig. 12D).

Parmi les cellules granuleuses, l'origine du progéniteur mastocytaire reste sujet à controverse (fig. 13). Il a été proposé qu'il soit produit directement à partir des MPP (Multi Potent Progenitors) commun aux CMP et CLP²⁴⁸, ou alors uniquement à partir des CMP²⁴⁹. D'autres proposent que les progéniteurs mastocytaires proviennent d'un progéniteur commun avec les polynucléaires basophiles présents dans la rate²⁵⁰ ou dans la MO²⁵¹.

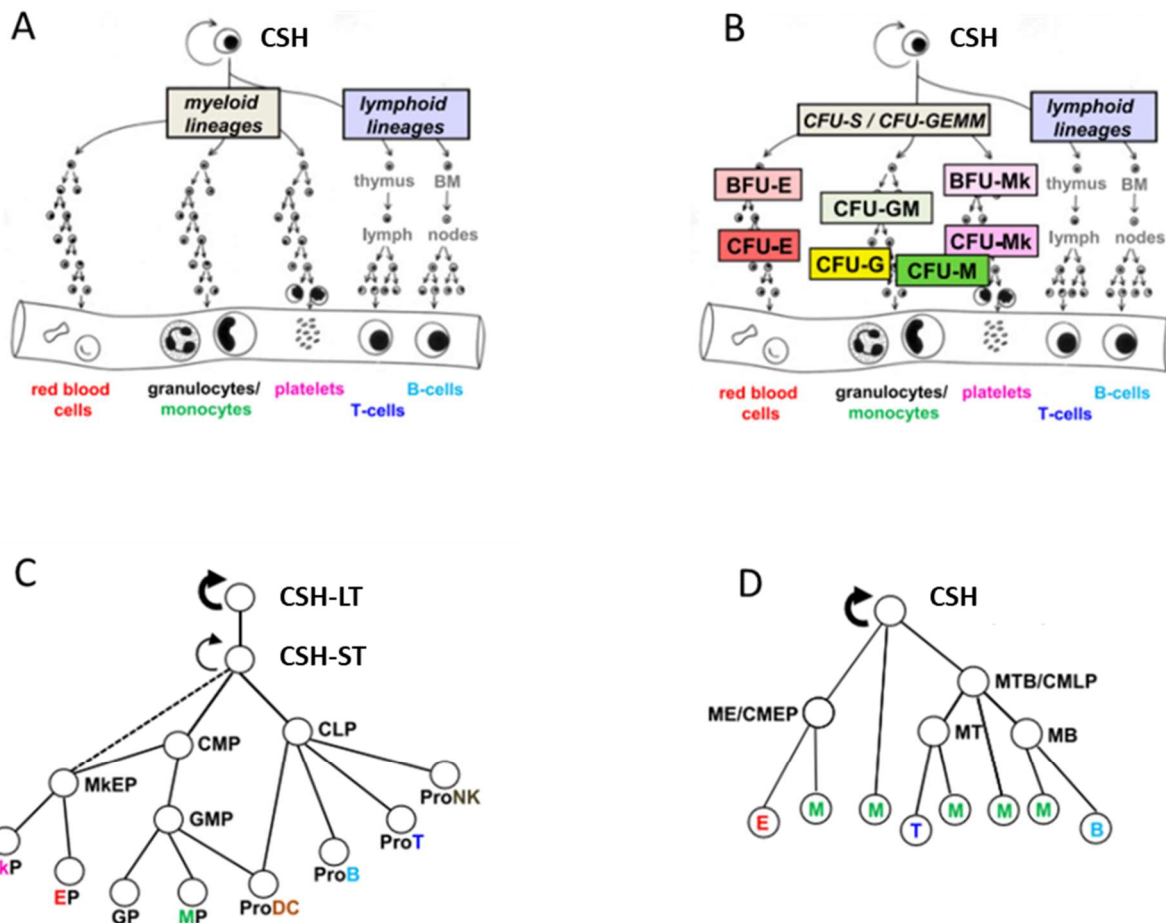


Figure 12 : Différents modèles hiérarchiques de l'hématopoïèse

A : premier modèle proposé (Till et Mc Culloch, 1961), la CSH donne des progéniteurs myéloïdes produisant les globules rouges, les monocytes, les granulocytes et les plaquettes, et des progéniteurs lymphoïdes donnant les lymphocytes T et B. **B** : Kondo et al. en 2003 proposent à partir des études in vitro, que les progéniteurs myéloïdes initiaux multipotents (CFU-GEMM) donnent des progéniteurs unipotents (BFU-E et BFU-Mk) ou bipotents (CFU-GM). **C** : modèle plus complexe (Seita et Weissman, 2010) proposé à partir des études in vivo : les CSH à long-terme donnent des CSH à court-terme qui produisent les progéniteurs communs lymphoïdes (CLP) et les progéniteurs communs myéloïdes (CMP). **D** : dernier modèle proposé Kawamoto et al., 2010 où les progéniteurs de chaque lignage conserveraient néanmoins un potentiel à la différenciation monocytaire

BFU-E = Burst Forming Unit-Erythrocyte ; BFU-Mk = Burst Forming Unit-Megakaryocyte ; CMEP = Common Monocyte Erythrocyte Progenitor ; CFU-E = Colony Forming Unit-Erythrocyte ; CFU-G = Colony Forming Unit-Granulocyte ; CFU-M = Colony Forming Unit-Monocyte ; CFU-Mk = Colony Forming Unit-Megakaryocyte ; CCMLP = Common Monocyte Lymphocyte Progenitor ; ME = Monocyte Erythrocyte ; METB = Monocyte Erythrocyte lymphocyte T et B ; MT = Monocyte et lymphocyte T ; MB = Monocyte et lymphocyte B ; MTB = Monocyte lymphocyte T et B.

D'après Eaves et al., Blood, 2015

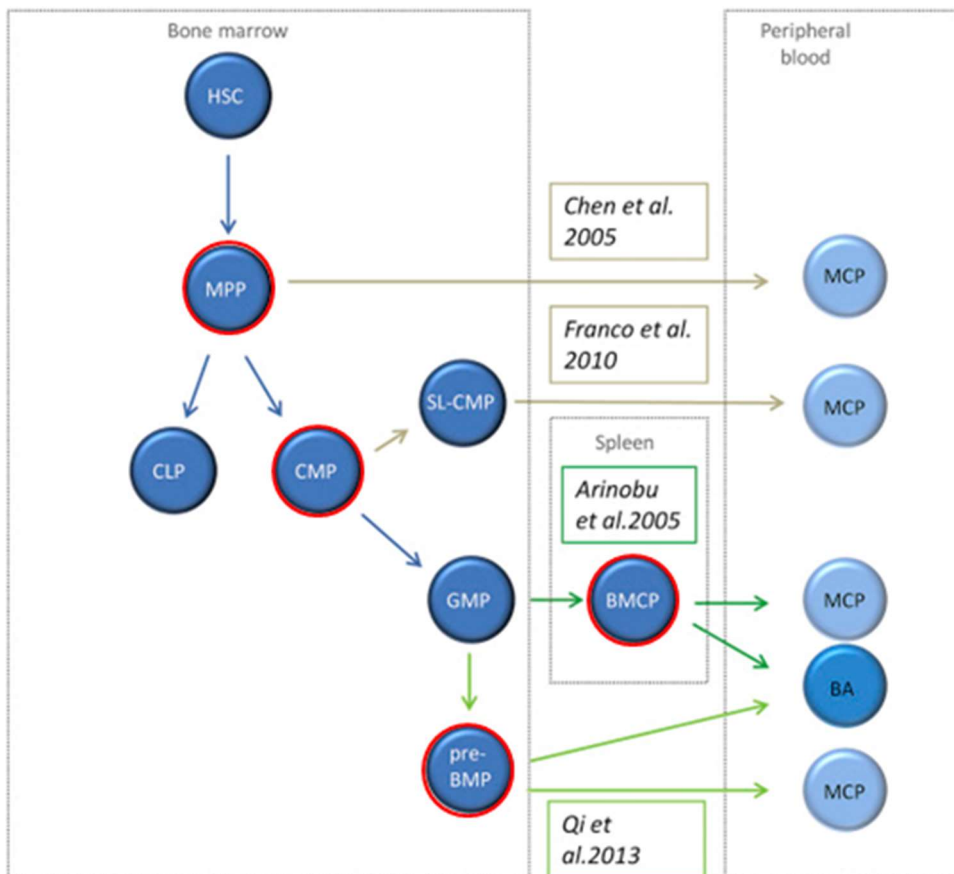


Figure 13 : Origine des progéniteurs mastocytaires (MCP) circulant

Dans le modèle classique, les MCP proviennent soit des progéniteurs multipotents (MPP), soit des progéniteurs myéloïde communs (CMP) (flèches grises). Il a également été proposé qu'ils puissent partager un progéniteur commun avec les basophiles (BMCP) présent dans la rate et provenant des progéniteurs multipotents granuleux (GMP) ou alors d'un pré-progéniteur commun résidant dans la MO et donnant les basophiles et les MCP (flèches vertes).

D'après Schmetzer et al., European Journal of Pharmacology ; 2016

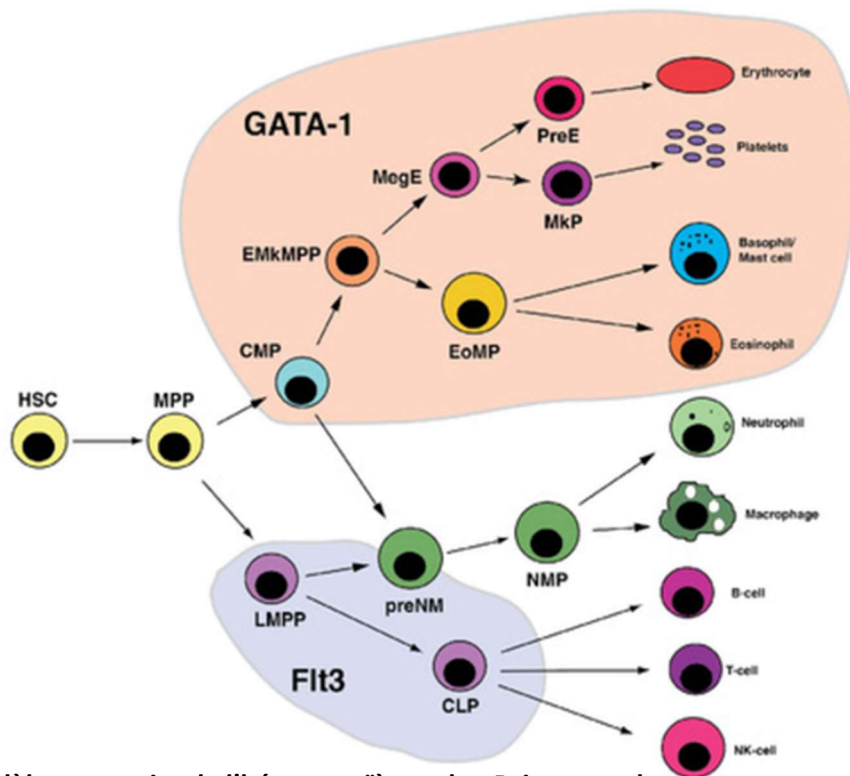


Figure 14 : Modèle composite de l'hématopoïèse selon Drissen et al.

Les CSH produisent des progéniteurs multipotents donnant les lignages myéloïdes et lymphoïdes et exprimant des facteurs de transcriptions spécifiques. Contrairement aux précédents modèles, les macrophages et les neutrophiles dérivent d'un progéniteur commun issue des CMP et des CLP, alors que les éosinophiles, basophiles et mastocytes dérivent d'un progéniteur commun aux érythrocytes et thrombocytes.

CLP : Common Lymphoid Progenitor ; CMP : Common Myeloid Progenitor ; EoMP : Eosinophil-Mast cell Progenitor ; EMkMPP : Erythroid-Megakaryocyte primed Multipotent Progenitor ; HSC : Hematopoietic Stem Cells ; LMPP : Lymphoid Multipotent Progenitor ; MegE : megakaryocyte Erythroid ; MkP : Megakaryocyte Progenitor ; MPP : Multipotent Progenitor ; NMP : Neutrophil Monocyte Progenitor ; PreE : Pre-Erythrocyte ; preNM : pre-Neutrophil Monocyte

D'après Drissen et al., Nature Immunology, 2016

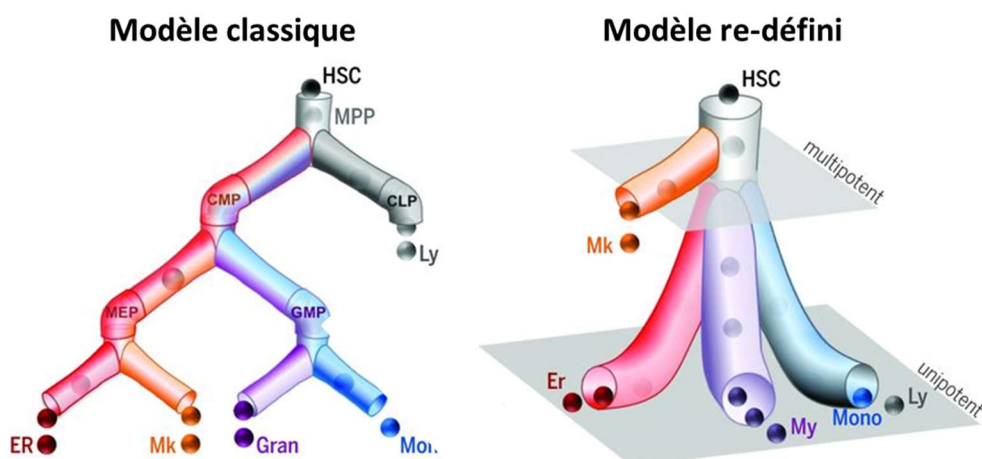


Figure 15 : Nouveau modèle de l'hématopoïèse après analyse PCR sur cellule unique

Contrairement au modèle classique de l'hématopoïèse décrit avec différentes vagues successives de progéniteurs multipotents, ce modèle propose une distinction entre un compartiment souche multipotent et un compartiment de progéniteurs unipotents

CLP : Common Lymphoid Progenitor ; CMP : Common Myeloid Progenitor ; Er : Erythrocyte ; HSC : Hematopoietic Stem Cells ; GMP : Granulocyte Monocyte Progenitor ; Gran : Ganulocytes ; Ly : Lymphocytes MEP : Megakaryocyte Erythroid Progenitor ; Mk : Megakaryocyte ; Mono : Monocytes

D'après Notta et al., Science, 2016

Finalement, l'analyse transcriptomique à l'échelle d'une cellule a permis de proposer des modèles hiérarchiques de l'hématopoïèse différents des précédents (fig. 14). Contrairement aux hypothèses décrites précédemment d'une séparation précoce des lignages lymphoïde et myéloïde et d'un progéniteur commun à toutes les cellules myéloïdes, il a été proposé que les monocytes et les neutrophiles puissent provenir du lignage myéloïde comme du lignage lymphoïde²⁵². Encore plus récemment, il a été proposé un dernier modèle qui remet en question le modèle hiérarchique (fig. 15). Au lieu d'un modèle par branchements successifs, restriction du potentiel de différenciation et points de non-retour, les auteurs proposent l'existence de deux compartiments: un compartiment souche multipotent, et un compartiment de progéniteurs unipotents²⁵³. Ce modèle permet de définir une fonction souche de plus en plus restreinte au fur et à mesure de la différenciation des CSH lors du processus hématopoïétique. Grâce à l'analyse transcriptomique sur cellule unique, les données récentes de la littérature montrent que d'un point de vue hiérarchique, ce modèle redéfini de l'hématopoïèse est similaire à l'hématopoïèse embryonnaire, avec des progéniteurs multipotents et des progéniteurs unipotents. Le processus d'hématopoïèse embryonnaire correspond aussi à la différenciation de plusieurs vagues de progéniteurs multipotents dont le potentiel est de plus en plus restreint²⁵³.

En conclusion, les modèles hiérarchiques de l'hématopoïèse impliquent une différenciation d'un compartiment cellulaire très immature vers les différents lignages lymphoïde et myéloïde. Les données récentes suggèrent qu'il existe néanmoins au sein de chaque lignage des cellules plastiques capables de se différencier en cellules d'un lignage différent.

Chaque étape de différenciation est contrôlée par des facteurs de croissance hématopoïétiques et des cytokines spécifiques à chaque lignage. Le détail de ces facteurs est représenté dans la figure 16²⁵⁴. Initialement, la sélection vers le lignage myéloïde se fait en réponse au Stem Cell Factor (SCF) et à la Thrombopoïétine (TPO), le GM-CSF oriente ensuite les CMP vers le lignage granuleux/monocytaire alors que la persistance du signal SCF/TPO additionné à l'IL-3 les oriente vers les lignages mégacaryocytaire/érythrocytaire. L'orientation initiale vers le lignage lymphoïde se fait par la signalisation à l'IL-7. L'IL-7 est ensuite impliquée dans la différenciation des CLP en LT, l'IL-15 dans la différenciation en cellules NK et l'IL-4 dans la différenciation en LB. Il a également été montré que le M-CSF

permet une différenciation directe des CSH en monocytes, ce mécanisme permettrait une réponse hématopoïétique rapide en réponse à un stress de l'organisme²⁵⁵.

Chez la souris, en réponse au LPS, les CSH peuvent également proliférer *via* l'activation du récepteur TLR4 (Toll-Like Receptor 4) et la mise en jeu d'une voie de signalisation dépendante des ROS (Reactive Oxygen Species) et des MAPK²⁵⁶.

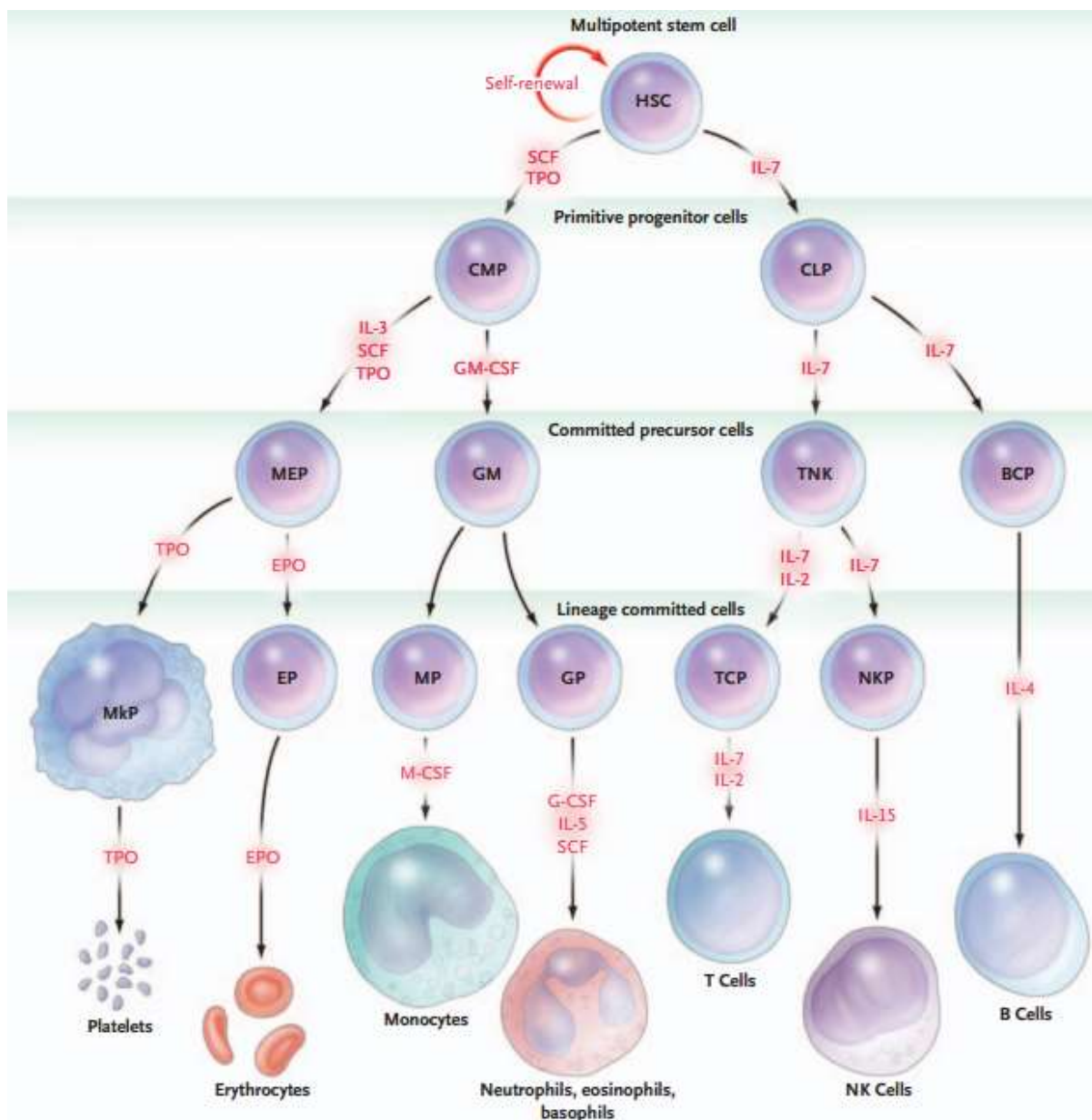


Figure 16 : Facteurs de croissances contrôlant la différenciation des CSH dans les différents lignages hématopoïétiques

HSC = Hematopoietic Stem Cells ; CMP = Common Myeloid Progenitor ; CLP = Common Lymphoid Progenitor ; MEP = Megakaryocyte Erythrocyte Progenitor ; GM = Granulocyte Monocyte ; TNK = T and Natural Killer ; BCP = B Cell Progenitor ; MkP = Megakaryocyte Progenitor ; EP = Erythrocyte Progenitor ; MP = Monocyte Progenitor ; GP = Granulocyte Progenitor ; TCP = T Cell Progenitor ; NKP = Natural Killer Progenitor

IV. Les niches hématopoïétiques

Historiquement, les premières expériences de reconstitution hématopoïétique d'animaux irradiés, avec des CSH isolées à partir de MO ont permis la mise en évidence de nodules dans la rate des animaux receveurs. La transplantation secondaire de ces nodules induit un taux de reconstitution hématopoïétique dans la souris receveuse, inférieur à celui obtenu après une transplantation primaire, suggérant un rôle joué par l'environnement splénique sur les propriétés des CSH. Cette observation est à l'origine de la notion de niche.

En 1975, Lord observe une localisation préférentielle des CSH au contact de l'os dans la MO²⁵⁷. Peu après, l'équipe du Dr Dexter observe qu'*in vitro* les CSH de MO ne peuvent survivre qu'en co-culture avec des cellules stromales de MO. Ce résultat confirme ainsi la nécessité de la présence de cellules nourricières pour la survie des CSH²⁵⁸. Schofield théorise alors en 1978, le concept de la niche hématopoïétique. Cette niche serait un environnement limité dans l'espace dans lequel résideraient les CSH et qui régulerait l'activité de ces cellules (auto-renouvellement, quiescence, différenciation) *via* une combinaison de signaux solubles et d'adhérence²⁵⁹. Cette niche permettrait le maintien des cellules à l'état quiescent, et donc leur potentiel de cellules souches, et limiterait ainsi l'apparition de mutations génétiques. La mise en place du concept de la niche, associé à la localisation de ces cellules au contact de l'os permirent alors aux chercheurs de faire l'hypothèse d'une niche hématopoïétique au contact de l'os dans la MO, dénommée niche endostéale.

1) Techniques de caractérisation de la niche hématopoïétique

Il a fallu attendre une trentaine d'années après l'hypothèse de l'existence d'une niche endostéale pour les CSH pour que les progrès technologiques permettent l'étude de cette niche. Les premières démonstrations d'un contrôle de l'activité des CSH par la niche ont été réalisées en modifiant le nombre des populations cellulaires *à priori* présentes dans la niche hématopoïétique, et en évaluant les conséquences sur l'activité des CSH²⁶⁰⁻²⁶². L'identification de la niche a également été réalisée par la localisation des CSH *in situ* et l'identification des cellules au voisinage. Cette localisation a été abordée par des méthodes de transplantation et de *tracking* de CSH marquées par des colorants membranaires^{263,264},

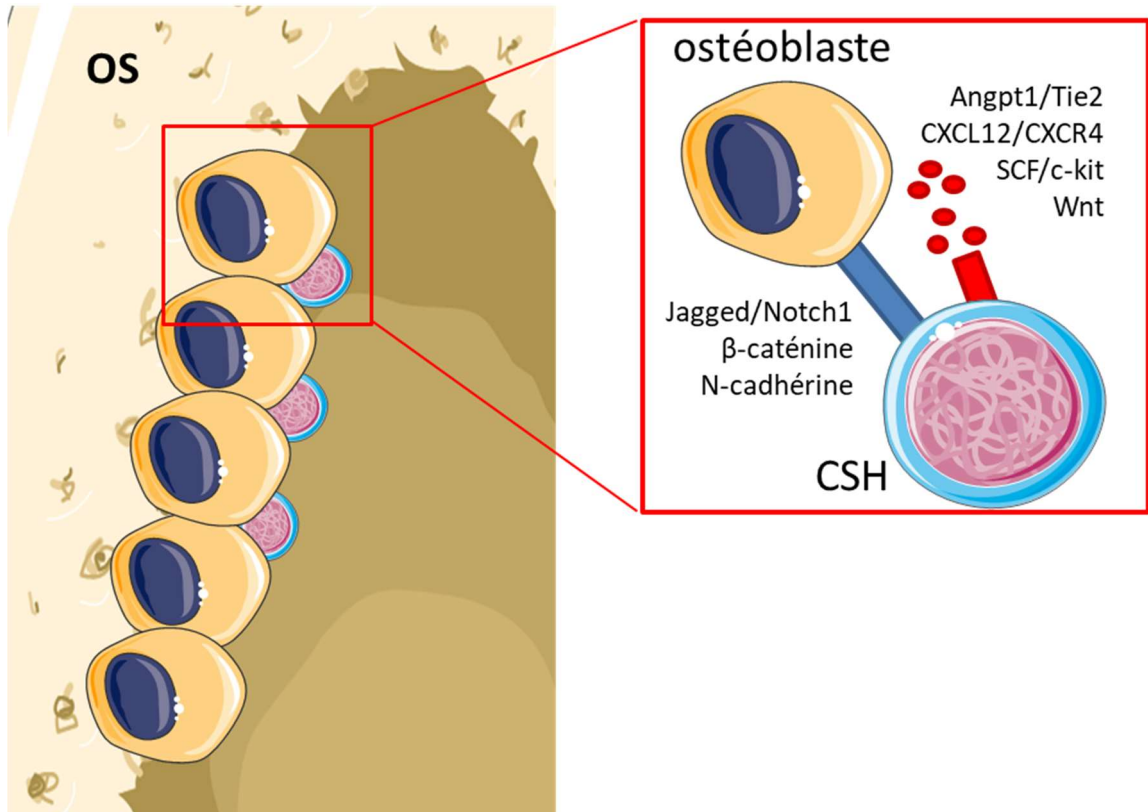


Figure 17 : Schéma de la niche endostéale et des voies de signalisation régulant la quiescence des CSH dans la niche

D'après Adams et Scadden, Nature Immunology, 2006

ou de CSH exprimant une protéine fluorescente²⁶⁵⁻²⁶⁷. La localisation des CSH *in situ* sans transplantation a été faite par immuno-fluorescence grâce à des marquages membranaires multiples et l'identification de cellules de phénotype CD150⁺/CD48⁻/CD41⁻ dans la MO^{241,268}. Enfin, plus récemment, le marquage de tranches de MO par des anticorps fluorescents, l'imagerie de toute la longueur de ces tranches et la localisation des CSH ont été permises par des techniques de cytométrie à scan laser. Cette technique de microscopie est basée sur l'utilisation d'anticorps et de lasers de cytométrie pour analyser rapidement un grand nombre d'échantillons avec de multiples marquages, de visualiser un grand nombre de CSH simultanément et de caractériser leurs différents micro-environnements^{269,270}.

2) La niche endostéale

La validation de l'importance de la niche hématopoïétique endostéale dans le contrôle des CSH ne fut possible que grâce au développement de souris transgéniques exprimant un récepteur à la parathormone spécifiquement dans les ostéoblastes. Chez ces souris, le nombre d'ostéoblastes est modifié et ces modifications d'accompagnent d'une modification du nombre de CSH²⁶⁰. De plus, l'utilisation de ces souris a permis de montrer que les ostéoblastes permettent le maintien des CSH à proximité de l'os par une interaction dépendante de la voie Notch²⁶⁰. La présence d'une niche endostéale au niveau des ostéoblastes de la MO a été confirmée la même année par une étude montrant que les CSH sont associées aux ostéoblastes par les molécules d'adhérence N-cadhérine et β -caténine, localisées de façon asymétrique sur la membrane cellulaire entre les CSH et les ostéoblastes²⁶¹ (fig. 17).

La niche endostéale permet le maintien des CSH dans un état quiescent : les CSH seraient ancrées dans la niche endostéale grâce aux molécules d'adhérence déjà citées précédemment (N-cadhérine, β -caténine), à la glycoprotéine de surface CD44 exprimée par les CSH²⁷¹ et au récepteur à l'ion calcium (CaR). En effet, une délétion totale de ce récepteur diminue en effet fortement la localisation des CSH dans l'os et augmente le nombre de CSH circulantes et spléniques chez l'embryon²⁷². Leur quiescence serait maintenue par des facteurs solubles sécrétés par les ostéoblastes tels que l'angiopoïétine-1, le CXCL12, le SCF et les protéines Wnt²⁷¹ (fig. 17). Il est intéressant de noter que la sécrétion de CXCL12 est sous

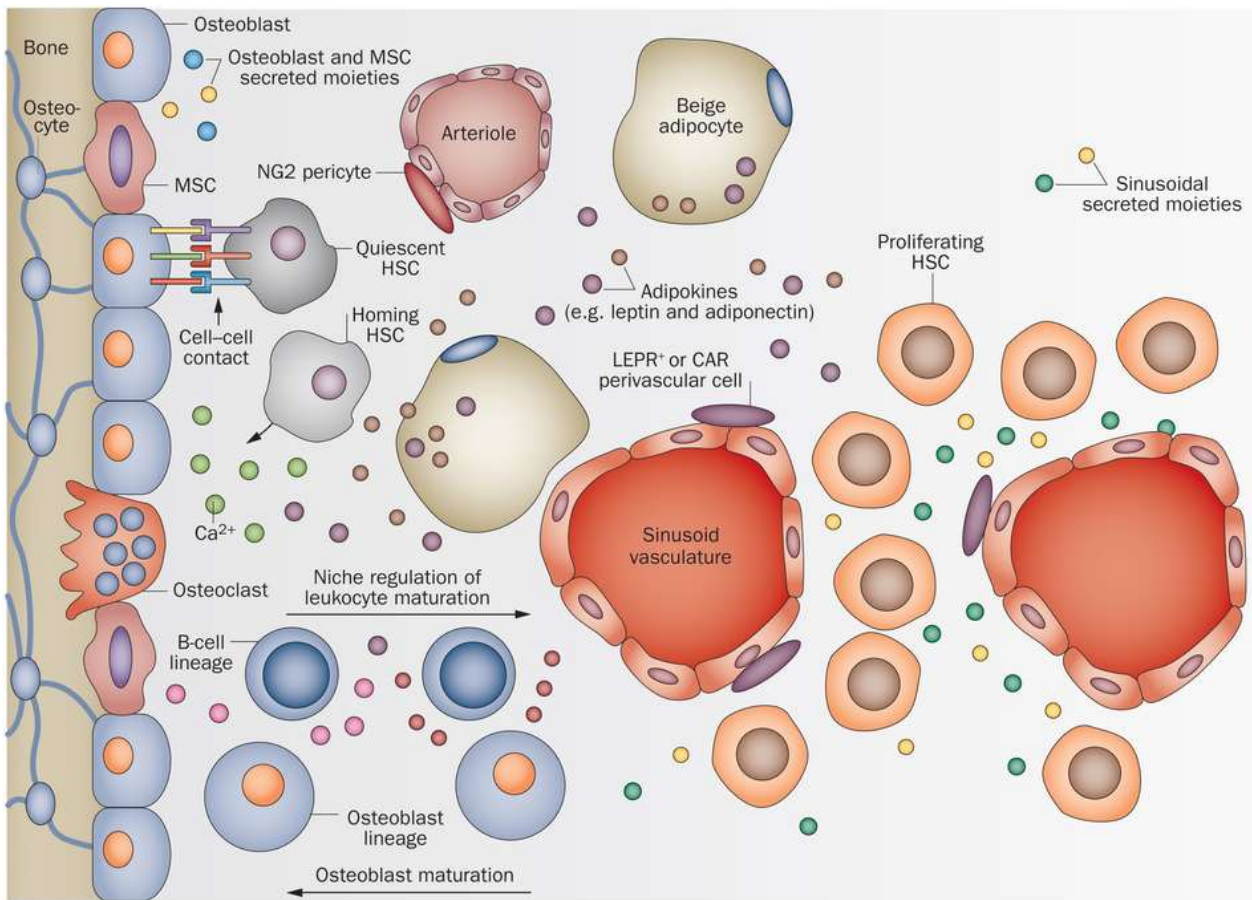


Figure 18 : Schéma récapitulatif des différentes niches hématopoïétiques médullaires

Les CSH sont attirés vers les ostéoblastes via leur récepteurs CaR à l'ion calcium, un récepteur à 7 domaines transmembranaire permettant la localisation des CSH vers la niche endostéale en fonction de la concentration en calcium. Elles sont localisées au niveau endostéal à proximité des ostéoblastes et des MSC qui régulent leur quiescence via des molécules d'adhérences et des facteurs solubles. Les artérioles maintiennent également la quiescence des CSH grâce à leurs cellules périvasculaires. Les CSH en cours de prolifération sont retrouvées au niveau des vaisseaux sinusoides où elles sont attirées par des CAR cells. Des adipocytes sécrétant des adipokines sont également présents dans la MO.

D'après Adler et al., Nature Reviews Endocrinology, 2014.

le contrôle de l'innervation sympathique. Les oscillations circadiennes de libération de noradrénaline dans la MO induisent une diminution rythmique de cette sécrétion, conduisant à une mobilisation circadienne des CSH²⁷³.

Du fait de sa faible vascularisation, la zone endostéale de l'os est majoritairement une zone hypoxique, dans laquelle les CSH se localiseraient préférentiellement²⁷⁴. *In vivo*, les CSH sont, en effet, positives à un marquage au pimonidazole, spécifique de cellules en hypoxie²⁷⁵. De plus, la prolifération et la différenciation des CSH sont régulées négativement par Hif-1 α , le facteur de transcription impliqué dans la réponse transcriptionnelle à un environnement hypoxique²⁷⁶. La localisation des CSH dans des zones hypoxiques de la niche endostéale expliquerait leur caractère quiescent. En effet, le lactate issu du métabolisme anaérobie des cellules présentes dans ces zones hypoxiques stabilise le facteur de transcription Hif-1 α , permettant le maintien de la quiescence des CSH en régulant l'expression de gènes du cycle cellulaire²⁷⁷.

Le rôle de la niche endostéale sur le maintien des CSH à l'état quiescent et la régulation de leur prolifération et leur différenciation est fondamental. Il a notamment été montré que des perturbations de l'homéostasie osseuse peuvent déréguler la prolifération des CSH et augmenter le risque de tumorigenèse et ainsi l'apparition de leucémie aigüe myéloïde²⁷⁸. Une étude récente a également montré que la perte de l'expression de la β -caténine par les ostéoblastes est suffisante pour déréguler le maintien de la quiescence des CSH, entraînant leur prolifération et augmentant ainsi le risque de mutation à l'origine de cancers²⁷⁹.

3) La niche vasculaire

Avec l'amélioration des techniques de localisation *in situ* des CSH, il a été montré que les CSH se localisent, également, à proximité de vaisseaux sanguins dans la MO²⁴¹. Une perturbation de la vascularisation est associée à une diminution du nombre de CSH dans la MO après reconstitution hématopoïétique²⁶². Les CSH résideraient ainsi dans deux niches de la MO : une niche endostéale composée d'ostéoblastes et une niche vasculaire composée de cellules endothéliales et périvasculaires (fig. 18).

Le rôle de la niche vasculaire sur l'activité des CSH est resté assez longtemps controversé. Certains auteurs montrent que les CSH localisées près des vaisseaux sont, en fait, en cours

de différenciation suggérant que la niche vasculaire ne soit qu'un environnement transitoire permettant la différenciation des CSH en progéniteurs hématopoïétiques²⁸⁰⁻²⁸². Au contraire, d'autres auteurs montrent que les CSH localisées à proximité des vaisseaux restent à l'état quiescent et que la niche vasculaire aurait par conséquent un rôle dans le maintien de la quiescence des CSH²⁷⁰.

Cette ambiguïté du rôle de la niche vasculaire a été levée par la caractérisation plus précise de la vascularisation de la MO. Il a en effet été montré que les vaisseaux médullaires sont organisés en sinusoides et en artérioles qui sont des vaisseaux plus petits et plus difficilement identifiables. Les CSH quiescentes seraient localisées à proximité des artérioles dans des zones hypoxiques, alors que les CSH en cours de différenciation seraient localisées à proximité des vaisseaux sinusoides (fig. 18). Cette localisation différente des CSH est associée à différents types de péricytes associés aux cellules endothéliales (péricytes NG2⁺ au voisinage des artérioles vs péricytes exprimant le récepteur à la leptine à proximité des sinusoides)²⁷⁰. De plus il a été montré que la niche vasculaire sinusoidale représente quantitativement le plus grand réservoir de CSH dans la MO : 85% des CSH (toutes niches confondues) résideraient en effet à proximité des vaisseaux sinusoidaux. Cette localisation préférentielle pourrait être due à une sécrétion plus importante de CXCL12 par les péricytes exprimant le récepteur à la leptine^{281,283,284}. Ces péricytes sont aussi appelés CAR-cells pour CXCL12 Abundant Reticular Cells^{268,285}.

Ces études révèlent qu'en plus de la dichotomie entre niche endostéale et niche vasculaire, la niche vasculaire est hétérogène et qu'il existe différents micro-environnements vasculaires avec des rôles différents sur le fonctionnement des CSH (fig. 18). Cette hétérogénéité est probablement due à la présence d'autres types cellulaires dans les différentes niches.

4) Autres types cellulaires dans les niches endostéales et vasculaires

A côté des ostéoblastes, cellules endothéliales et péricytes, d'autres cellules sont présentes, parmi lesquelles les cellules stromales mésenchymateuses (MSC)²⁸⁶. Le rôle de ces cellules dans la niche hématopoïétique est abondamment décrit²⁸⁷. Ces MSC, localisées à la fois dans la niche endostéale et dans la niche vasculaire, participeraient au maintien des CSH à l'état quiescent par la sécrétion de CXCL12²⁸⁸. Certaines études suggèrent que les CAR-cells

seraient, en fait, une sous-population de MSC résidant près des cellules endothéliales des vaisseaux sinusoides de la niche vasculaire, mais aussi près des ostéoblastes de la niche endostéales^{268,285}. Les MSC participeraient également à l'ancrage des CSH dans la niche par des molécules d'adhérence comme la nestine²⁸⁶. En plus du rôle direct dans la régulation de l'activité des CSH, les MSC participent également au renouvellement des autres cellules de la niche^{289,290}. Les MSC, notamment celles exprimant le récepteur à la leptine, sont capables de se différencier en d'ostéoblastes²⁹¹, cellule faisant partie de la niche endostéale décrite par Schofield, mais aussi en adipocytes, une autre population cellulaire dont on parlera au paragraphe suivant.

Il existe de plus en plus d'acteurs cellulaires impliqués dans le contrôle de la quiescence/prolifération des CSH. Il a notamment été montré que les mégacaryocytes *via* l'expression du protein-C type lectin-like receptor 2 (CLEC2) permettent le maintien de la quiescence des CSH²⁹²⁻²⁹⁴. Des macrophages CD169⁺ sont également retrouvés dans la MO et contribueraient à l'ancrage et au maintien de la quiescence des CSH dans leur niche^{295,296}. Les auteurs ne précisent pas dans quelle niche se trouvent les CSH régulées par ces macrophages. Ils montrent cependant que les macrophages agiraient directement sur les MSC nestine⁺. Les macrophages auraient également un rôle au cours de l'hématopoïèse embryonnaire en formant une niche permettant la différenciation des CSH embryonnaires, cependant cela n'a été démontré que chez le poisson-zèbre²⁹⁷.

Enfin, l'équipe du professeur Frenette a démontré un rôle joué par les cellules de Schwann non myélinisantes associées aux terminaisons nerveuses sympathiques de la MO : ces cellules sont capables de maintenir les CSH dans un état quiescent grâce à l'activation du TGF- β par clivages des formes latentes et inactives présentes dans la matrice extracellulaire²⁹⁸.

5) Les adipocytes : une niche oubliée ?

La présence d'adipocytes médullaires a été caractérisée dans les années 1960 au niveau de la moelle jaune, qui est faiblement active d'un point de vue hématopoïétique^{7,299}. Chez l'adulte (souris et homme), le nombre d'adipocytes est corrélé négativement avec l'activité hématopoïétique dans la MO³⁰⁰⁻³⁰², ce qui a longtemps été interprété comme le reflet d'un rôle plutôt délétère de ces adipocytes sur le processus hématopoïétique. Il a pourtant été

montré que des adipocytes médullaires réapparaissent dans la MO après irradiation au moment où commence la prolifération hématopoïétique³⁰³. Ces différentes observations apparemment contradictoires ont amené de nombreuses équipes à étudier le rôle des adipocytes médullaires dans le contrôle de l'hématopoïèse. Des effets positifs comme négatifs ont été rapportés à la suite d'études *in vitro* ou *in vivo*, chez la souris ou l'homme.

Plusieurs études se sont intéressées aux sécrétions des adipocytes médullaires et à leurs effets sur les CSH. L'adipocyte médullaire sécrète par exemple de l'adiponectine qui, chez la souris, stimule la prolifération des CSH tout en maintenant leur multipotence *in vitro*³⁰⁴. De plus, la transplantation de CSH pré-traitées avec de l'adiponectine chez une souris irradiée permet une meilleure reconstitution hématopoïétique³⁰⁴. A l'inverse, les souris déficientes en adiponectine présentent un défaut de reconstitution hématopoïétique après traitement par chimiothérapie³⁰⁵. Chez l'homme, toujours *in vitro*, l'adiponectine inhibe la différenciation myéloïde et lymphoïde^{306,307}.

Les adipocytes médullaires sécrètent en outre des cytokines hématopoïétiques telles le TNF- α ³⁰⁸. Ce dernier inhibe la prolifération des CSH murines *in vitro*, en induisant l'arrêt du cycle cellulaire³⁰⁹. Chez l'homme, des effets stimulateurs et inhibiteurs de la prolifération des CSH par le TNF- α ont été décrits³¹⁰⁻³¹², de même qu'un effet inhibiteur de leur différenciation³¹³. D'autres cytokines sécrétées par les adipocytes médullaires comme l'IL-6 et l'IL-8 stimulent au contraire la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques humains³¹⁴⁻³¹⁶.

Enfin, la leptine est sécrétée par les adipocytes médullaires³¹⁷ et stimule la prolifération des progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes murins et leur différenciation *in vitro*³¹⁸⁻³²⁰.

Outre leurs effets sécrétoires, les adipocytes médullaires semblent également contrôler les CSH *via* des mécanismes contact-dépendants, bien que ceux-ci ne soient pas clairement identifiés. En co-culture avec des CSH, les adipocytes médullaires augmentent en effet la prolifération et/ou la survie des CSH de souris, cet effet n'étant cependant pas observé *in vivo*³²¹. Chez l'homme, les résultats sont plus contradictoires puisque des effets inhibiteurs et activateurs sur la différenciation des CSH ont été rapportés³²²⁻³²⁴.

L'ensemble de ces données montre clairement que les adipocytes médullaires régulent le processus hématopoïétique, mais de façon très diverse. Cette diversité peut peut-être

s'expliquer par l'hétérogénéité des adipocytes médullaires (cf. Chapitre 1, partie I. 4). Une autre explication pourrait être le contexte physiopathologique. En effet une étude très récente montre que dans des conditions physiologiques les adipocytes médullaires, contrairement à ceux du tissu adipeux blanc périgonadique (PGAT), sécrètent du SCF, stimulant la prolifération des CSH³²⁵. Les auteurs montrent également qu'il existe un processus d'adipogenèse médullaire après irradiation, participant probablement à la stimulation de l'hématopoïèse dans ces conditions. Ils proposent ainsi que l'adipogenèse médullaire constitue une réponse d'urgence favorisant une récupération rapide de l'hématopoïèse en réponse à une perturbation de l'intégrité de la MO. L'adipogenèse serait le moyen le plus rapide pour augmenter la production de facteurs de stimulation pour des CSH. Cependant, ce rôle positif des adipocytes médullaires dépendrait de l'os dans lequel ils se trouvent, avec un effet positif dans les os longs et un effet négatif dans les vertèbres³²⁵.

6) La niche est-elle si importante ?

La multipotentialité des CSH et des progéniteurs les plus immatures correspond à un état d'équilibre entre quiescence et différenciation des CSH, régi par les taux intra-cellulaires de facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de la différenciation vers les différents lignages hématopoïétiques. Par exemple, la co-expression en faible quantité de PU.1 et CEBP α (impliqués respectivement dans les différenciations monocytaire et granulocytaire) assure le maintien de progéniteurs bipotents des deux lignages³²⁶. En fonction des signaux de la niche, le niveau d'expression de chacun des facteurs de transcription est modifié (le M-CSF induit par exemple une augmentation de l'expression de PU.1 aux dépens de C/EPB α), ce qui induit alors une différenciation spécifique dans un des deux lignages cellulaires.

Le modèle de contrôle des CSH essentiellement par la niche a été remis en cause par le développement de techniques permettant le traçage *in vivo* des CSH et de leur descendance au niveau clonal³²⁷. Cette étude révèle qu'individuellement, chaque CSH produit des proportions définies et spécifiques des différentes cellules immunitaires matures (lymphocytes, monocytes, polynucléaires...), ce qui renforce l'idée d'une hétérogénéité au sein de la population de CSH. La caractérisation génomique de cellules individuelles a montré que les cellules qui se différencient spécifiquement dans un lignage particulier sont « pilotées » par un épigénome unique. Cet épigénome bloque l'expression de gènes

spécifiques de la différenciation vers un ou plusieurs lignages donnés. La différenciation des CSH se fait donc vers le ou les lignages « non verrouillés ». La niche n'aurait alors qu'un rôle déclencheur ou pas du programme de différenciation de chaque CSH³²⁸.

Ces conclusions remettent en question la prépondérance du rôle de la niche puisque les propriétés de différenciation pourraient être définies au moins en partie, de manière intrinsèque à chaque cellule.

V. L'hématopoïèse extra-médullaire

L'hématopoïèse extra-médullaire (HEM) correspond à l'existence d'une activité hématopoïétique hors de la MO. L'HEM est présente durant le développement embryonnaire, avant la mise en place de l'hématopoïèse médullaire définitive. Elle peut également être présente à l'âge adulte dans certaines situations particulières, et plus récemment encore, des données de la littérature montrent que certains organes présentent une activité hématopoïétique intrinsèque en situation physiologique.

1) L'hématopoïèse extra-médullaire en situation pathologique

A l'âge adulte, une insuffisance de l'hématopoïèse médullaire peut donner lieu à la réactivation de foyers hématopoïétiques embryonnaires inactifs afin de compenser l'activité hématopoïétique médullaire insuffisante. Cette activité hématopoïétique peut apparaître dans une multitude d'organes et de tissus, hématopoïétiques et non hématopoïétiques : rate, foie, ganglions lymphatiques, thymus, cœur, sein, prostate, ligament large, reins, glandes surrénales, plèvre, rétro-péritoine, peau et système nerveux³²⁹. C'est une complication fréquente des anémies hémolytiques telles que la β -thalassémie et la drépanocytose. Dans les formes légères de ces anémies, l'HEM compense suffisamment l'hématopoïèse médullaire déficiente et les patients n'ont pas besoin d'être transfusés. Cependant cela a pour conséquence une HEM très active et des symptômes dus à la compression des tissus par les foyers hématopoïétiques peuvent apparaître³³⁰. Un modèle d'étude de cette HEM chez la souris consiste en un traitement à la phénylhydrazine. Ce traitement induit en effet une réactivation de l'hématopoïèse hépatique avec la production d'érythrocytes et de macrophages³³¹.

Chez l'homme et la souris, lors d'un syndrome myéloprolifératif, la myélofibrose primaire touchant la MO altère la capacité de la niche à réguler correctement l'hématopoïèse³³². Une HEM se met alors en place dans le foie et la rate, sans toutefois pouvoir remplacer efficacement l'hématopoïèse médullaire³³³.

Enfin, lors de situations d'infection, alors que l'hématopoïèse médullaire fonctionne correctement, il est connu que des CSH de la MO peuvent être mobilisées dans la circulation et attirées sur les sites infectieux *via* les axes de signalisation SDF-1/CXCR4 et MCP-1/CCR2. Les CSH produisent alors, localement, des cellules immunitaires pro-inflammatoires³³⁴.

2) L'hématopoïèse extra-médullaire en situation physiologique

Jusqu'à récemment, la recherche en hématologie considérait de manière dogmatique que l'hématopoïèse définitive adulte se produisait exclusivement dans la MO chez le mammifère. L'hématopoïèse extra-médullaire était un phénomène marginal n'apparaissant qu'en situation de défaut de l'hématopoïèse médullaire, ou dans des situations particulières associées à une inflammation tissulaire.

Or des résultats très originaux, obtenus dans notre équipe suggèrent qu'une hématopoïèse pourrait avoir lieu dans d'autres organes, dans des conditions physiologiques. Notre équipe a en effet montré, dans un premier temps, que l'injection de cellules de la SVF permet la survie d'animaux irradiés à dose létale³³⁵. Dans ces expériences, les cellules du TA sont capables d'assurer la survie des animaux en reconstituant au moins partiellement l'hématopoïèse. La caractérisation, dans le TA, de cellules de phénotype CD34⁺/CD45⁺ capables de produire des clones hématopoïétiques en culture en milieu semi-solide a permis de montrer pour la première fois que le TA renferme une population de cellules progénitrices hématopoïétiques.

Notre équipe a ensuite montré que le TA contient une population de progéniteurs mastocytaires capables de produire des mastocytes retrouvés dans la peau et l'intestin¹⁴⁴. Cette population de progéniteurs mastocytaires dériverait en fait d'une population de CSH présentes dans le TA murin sous-cutané de phénotype KLS Lin⁻/c-kit⁺/Sca-1⁺³³⁶.

Dans le TA, les CSH n'expriment pas le marqueur membranaire CD150, et l'expression du CD34 par ces cellules est hétérogène. *In vitro*, les CSH du TA sont capables de se différencier

en cellules lymphoïdes et myéloïdes. *In vivo*, en revanche, elles se différencient majoritairement en cellules myéloïdes. En effet, dans le TA, les CSH participent au renouvellement à 100 % des mastocytes, 80 % des macrophages et 70% des cellules NK du TA, mais ont une faible activité de lymphopoïèse. Des expériences de transplantation secondaire ont permis de montrer qu'elles sont également douées d'auto-renouvellement. Enfin, lors de ces expériences de reconstitution hématopoïétique, les CSH du TA ne colonisent pas les organes hématopoïétiques³³⁶. On retrouve en revanche leur descendance dans les différents TA, mais également dans la peau et l'intestin¹⁴⁴, le poumon, le foie et le muscle (données du laboratoire). L'ensemble de ces données montre que les CSH du TA constituent une population différente des CSH de la MO d'un point de vue fonctionnel et phénotypique.

Notre équipe a ensuite démontré que cette activité hématopoïétique du TA n'est pas restreinte au TA sous-cutané (SCAT), mais est également retrouvée dans le TA péri-gonadique (PGAT), suggérant que tous les TA de l'organisme sont potentiellement capables d'exercer une activité hématopoïétique locale³³⁷. De manière intéressante, l'activité hématopoïétique diffère entre les deux dépôts étudiés. *In vitro*, la SVF de SCAT produit plus de clones hématopoïétiques que celle du PGAT. *In vivo*, la transplantation de CSH de TA produit un plus grand nombre de cellules dans le SCAT que dans le PGAT, quelle que soit le TA dont sont issues les CSH. Notre équipe a également montré que les ASC du SCAT et du PGAT expriment différemment des molécules impliquées dans le contrôle de la prolifération et la différenciation des CSH. Les ASC du SCAT expriment par exemple plus fortement les gènes codant pour *Spp1*, le GM-CSF et l'IL-15. A l'inverse, les ASC du PGAT expriment plus fortement le LIF que les ASC du SCAT³³⁷. Ces données montrent que l'activité des CSH diffère lorsqu'elles résident dans des environnements différents, suggérant un contrôle de ces cellules par leur environnement.

En collaboration avec une équipe parisienne, notre équipe a également montré que les mastocytes produits spécifiquement par les CSH du TA peuvent être mobilisés vers le cœur en réponse à un infarctus du myocarde, sans contribution majeure de l'hématopoïèse médullaire. Cette mobilisation est associée à une meilleure récupération de la fonction cardiaque post-infarctus³³⁸.

Ces résultats montrent pour la première fois que le TA est doté d'une fonction hématopoïétique spécifique permettant de renouveler directement une partie de ses cellules immunitaires résidentes, contrairement au modèle dogmatique d'une hématopoïèse adulte restreinte à la MO. Les CSH des différents dépôts adipeux semblent avoir des activités différentes, suggérant un contrôle de cette activité hématopoïétique par un micro-environnement particulier. Cette hématopoïèse est, de plus, capable de produire au moins des mastocytes à destination d'autres organes comme l'intestin, la peau ou le cœur après infarctus. Ces résultats permettent de proposer un rôle nouveau pour le TA dans la production de cellules immunitaires susceptibles de coloniser différents organes.

L'existence d'une HEM chez l'adulte dans des conditions physiologiques a été confirmée par des travaux récents qui montrent une production locale de plaquettes à partir de mégacaryocytes résidents dans le poumon ³³⁹. De manière très surprenante, les auteurs montrent que cette thrombopoïèse participe à hauteur de 50% à la production de plaquettes par l'organisme avec 10 millions de cellules produites par heure. De plus, en cas de déficience du nombre de CSH dans la MO, les auteurs montrent que ces progéniteurs hématopoïétiques pulmonaires peuvent recoloniser la MO et normaliser le taux de plaquettes circulantes.

Il semble donc que l'hématopoïèse dans l'organisme adulte ne soit pas un processus exclusivement médullaire. Nos données montrent que l'activité hématopoïétique du TA permet le renouvellement d'une partie des cellules immunitaires résidentes du TA, et est capable de produire des cellules à destination d'autres organes, en condition physiologique mais également en contexte lésionnel. Compte tenu de la quantité de TA dans l'organisme, cette activité hématopoïétique représente une source non négligeable de cellules immunitaires potentiellement impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques de l'organisme.

Objectifs Scientifiques

Compte tenu de l'importance des cellules immunitaires du TA sur la physiologie de ce tissu et de l'organisme, et de l'importance de l'activité hématopoïétique locale du TA dans le renouvellement de ces cellules, les objectifs scientifiques de cette thèse ont été les suivants :

1) Caractériser le rôle de l'hématopoïèse du TA dans le développement du syndrome métabolique. Compte tenu de l'activité de myélopoïèse des CSH du TA et du rôle des cellules immunitaires myéloïdes dans l'inflammation associée à l'obésité, nous avons fait l'hypothèse que l'activité hématopoïétique du TA contribuait à cette inflammation et au déclenchement du syndrome métabolique.

2) Caractériser l'environnement des CSH du TA et la régulation de leur prolifération et de leur différenciation par cet environnement. La prolifération et la différenciation des CSH de la MO sont en effet finement régulées par leur niche. Les CSH de différents dépôts adipeux ayant des propriétés différentes *in vitro* et *in vivo*, nous avons fait l'hypothèse qu'il existait une niche hématopoïétique au sein du TA. Nous avons abordé la caractérisation de cette niche par deux approches parallèles : une approche d'imagerie afin de localiser les CSH et d'identifier les cellules constituant leur micro-environnement, et une approche fonctionnelle afin de caractériser le rôle de cette niche dans la régulation de la prolifération et la différenciation des CSH du TA.

3) Caractériser l'activité hématopoïétique du TA chez l'homme. Nous avons fait l'hypothèse que le TA humain, comme chez la souris, était le siège d'une activité hématopoïétique locale. Nous avons donc cherché à caractériser cette activité par des expériences *in vitro* et *in vivo*.

MATERIELS ET METHODES

Animaux

Les souris utilisées sont des souris mâles des lignées C57Bl/6J Ly5.1 (Charles River), C57Bl/6J Ly5.2 (Envigo), C57Bl/6J Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo} (mT/mG) (The Jackson Laboratory, lignée 007676), ou des souris NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) (The Jackson Laboratory, lignée 005557). Les animaux sont hébergés dans le service de zootechnie (UMS006/INSERM) par cage de 6 maximum, sur portoir ventilé, à une température contrôlée de 22°C et avec un cycle lumière/obscurité de 12h. Les souris mT/mG et NSG sont élevées dans le service de production de l'UMS006 (ENI-CREFRE Oncopole, Toulouse). Les animaux ont un accès *ad libitum* à l'eau et la nourriture. Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale.

Pour les expériences d'immunofluorescence, les souris subissent une anesthésie médicamenteuse profonde non létale par un mélange de kétamine (100 mg/kg) et de xylazine (10 mg/kg). Dans le cas où un marquage de la vascularisation est envisagé, les souris sont alors maintenues en plus de l'anesthésie médicamenteuse dans une boîte à anesthésie gazeuse à isoflurane. Lorsque l'anesthésie profonde est atteinte (vérifiée par un pincement de la région interdigitale) une injection rétro-orbitale de 200 µL de lectine biotinyllée est réalisée. 20 minutes après, une injection de 200 µL de streptavidine couplée à un Alexa 488 est réalisée. Dans tous les cas, une perfusion intra-cardiaque de formaldéhyde 4% est réalisée. Les tissus sont ensuite prélevés puis post-fixés pendant 4h. Les protocoles d'expérimentation ont été approuvés par le comité d'éthique.

Récupération des échantillons de tissu adipeux humains

Le TA sous-cutané (10g) est obtenu à partir de patients subissant une dermolipéctomie abdominale (patients âgés de 20 à 60 ans avec un indice de masse corporelle inférieur à 28, n = 12). Le TA profond est prélevé à l'occasion de chirurgies viscérales. Aucun refus à l'utilisation des tissus à des fins de recherche n'a été exprimé par les patients en accord avec la loi de bioéthique numéro 2004-800 du 6 août 2004.

Expériences de reconstitution hématopoïétique.

Les souris receveuses exprimant l'allèle Ly5.2 du marqueur membranaire CD45 (CD45.2) sont irradiées à dose létale (10Gy) par une source de ¹³⁷Cs sur un irradiateur BioBeam (service

ENI-UMS006 Ranguéil). Le lendemain 2.10^3 CSH triées à partir de TA de souris C57Bl/6J exprimant l'allèle Ly5.1 du marqueur membranaire CD45 (CD45.1) ou de souris mT/mG sont co-injectées avec 2.10^5 cellules de MO totale provenant de souris Ly5.2 dans le plexus vasculaire rétro-orbital des souris irradiées. Une surveillance particulière des animaux est réalisée durant le temps de la reconstitution. Deux mois après la greffe, le TA est prélevé et utilisé pour des expériences d'immuno-fluorescence ou de cytométrie. Pour les expériences de « tracking cellulaire », 5.10^3 CSH de TA mT/mG sont injectés seules directement dans le TA sous-cutané après laparotomie et mise à nue du SCAT sous anesthésie gazeuse. La présence de cellules fluorescentes est évaluée dans la SVF de SCAT 6, 12 ou 48h après.

Pour les expériences de transplantations de CSH de TA humain, le protocole est similaire à celui utilisé dans les expériences de reconstitutions hématopoïétiques avec des CSH de TA murin : les souris receveuses NSG sont traitées avec du Busulfan 20mg/kg (Busilvex, Pierre Fabre, France) 24h avant la greffe. 2.10^3 CSH triées à partir de TA humain sont co-injectées en intra-veineux dans le signus rétro-orbital avec 2.10^5 cellules de MO totale de souris NSG.

Préparation des cellules pour la culture ou la cytométrie

Les dépôts adipeux sous-cutanés (SCAT), périgonadiques (PGAT) ou brun interscapulaire (BAT) sont prélevés chez la souris. Pour le SCAT, le ganglion lymphatique est systématiquement retiré. Le TA est dissocié mécaniquement et digéré à 37°C sous agitation et en présence de collagénase NB4 (0,4 U/mL, SERVA) pendant 30 minutes. Le digestat est ensuite filtré sur filtre de 25µm et l'action de la collagénase est arrêtée par l'ajout de DMEM (Gibco Life Technologies) contenant 10% de NCS (Newborn Calf Serum, Gibco Life Technologies). Les cellules de MO sont récupérées à partir de fémurs *flushés* avec du PBS, puis filtrées sur filtre de 100µm. Les cellules sont ensuite centrifugées à 600g pendant 10 minutes, le culot est récupéré dans du PBS et incubé dans du tampon de lyse des érythrocytes (140mM NH₄Cl, 20mM Tris, pH 7.6) pendant 5 minutes à 4°C. Les cellules sont à nouveau centrifugées à 600g pendant 5 minutes, le culot est alors repris dans un tampon pour la cytométrie (PBS, 5% NCS, 2mM EDTA) pour la cytométrie, ou du milieu DMEM-F12 (Gibco Life Technologies) pour la culture.

Nom	Couplage	Réactivité	Clone	Fournisseur	
Lin	V450	Souris	Polyclonal	BD	
Lin	APC		Polyclonal	BD	
CD34	FITC		RAM34	eBioscience	
Sca-1	FITC		E13-161.7	BD	
Sca-1	PE		E13-161.7	BD	
CD117	PE-Cy7		2B8	BD	
CD45.1	PE		A20	BD	
CD45.1	PE-Cy7		A20	BD	
FcεRI	APC		MAR-I	eBioscience	
CD45	APC-Cy7		30-F11	BD	
CD45.2	Alexa 700		104	BD	
Lin1	FITC		Humain	polyclonal	BD
CD11b	FITC			BEAR1	Beckman Coulter
CD38	PE	HIT2		BD	
CD14	PerCP	MOP9		BD	
CD3	PE-Cy7	SK7		BD	
CD34	PE-Cy7	581		BD	
CD19	APC	HIB19		BD	
CD45	APC	HI30		BD	
CD45	APC-vio770	5B1		Miltenyi	

Tableau 4 : anticorps utilisés pour la cytométrie en flux

Pour les échantillons humains, les 10g de TA sont dissociés mécaniquement et digérés à 37°C sous agitation en présence de collagénase NB4 (0,4U/mL), pendant 45 minutes. Le digestat est ensuite filtré sur filtre de 40 µm et l'action de la collagénase arrêtée par de l'α-MEM (Gibco, Life Technologies) additionné de 10% de FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco Life Technologies). De la même manière que pour les cellules de TA murin, la suspension cellulaire est ensuite centrifugée 300g pendant 10 minutes. Une fois les érythrocytes lysés, les cellules sont de nouveau centrifugées 300g pendant 5 minutes et reprises dans du PBS 5% FBS 2mM EDTA pour la cytométrie.

Cytométrie

Les cellules de la SVF ou de la MO sont incubées 20min à 4°C avec du FcR Block (anticorps monoclonaux de rat anti-CD16 et CD32, BD), de manière à bloquer l'accrochage non spécifique des anticorps par leur fragment Fc. Les cellules sont ensuite incubées 30min à 4°C, à l'abri de la lumière, avec différents mélanges d'anticorps couplés à différents fluorochromes (tableau 5). Les contrôles négatifs sont réalisés avec des isotypes de chaque anticorps. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS. Un marquage nucléaire est réalisé extemporanément avec du DAPI (5 min à 4°C) et les différents marquages sont quantifiés sur un cytomètre LSR Fortessa (BD). Les résultats sont analysés sur le logiciel Kaluza (Beckman Coulter). Pour le tri cellulaire, les cellules de la SVF de TA ou de MO sont marquées selon le même protocole mais de façon stérile avec des anticorps anti-CD117 couplé PE-Cy7, anti-Sca1 couplé FITC, un cocktail Lineage Panel couplé APC et triées avec un cytomètre trieur cellulaire (Influx ou Aria, BD, Plateau de Cytométrie, Toulouse Réseau Imagerie ; Plateau E Cell France, STROMALab). Pour les cellules humaines, les protocoles sont identiques à ceux utilisés pour les cellules murines. Les anticorps utilisés pour les tris sont les suivants : Lin1-FITC (BD), CD38-PE (BD), CD34-PECy7 (BD), CD45-APC (BD). Les analyses du chimérisme après transplantations dans les souris NSG sont réalisées avec les anticorps listés dans le tableau 2.

Co-cultures

Les stromas de co-cultures sont préparés à partir de cellules de la SVFensemencées à 20.10^3 cellules/puit en plaques 12 puits dans du DMEM-F12 (Gibco) contenant 18µM d'acide penthoténique, 100µM d'acide ascorbique, 16µM de biotine, 0.25µg/mL d'amphotéricine B,

Cible	Hôte	Fournisseur	Clone	Couplage	Dilution
Sca1	Rat	BD	D7	X	1/100
c-kit	Chèvre	R & D	Polyclonal		
Lineage Panel	Rat	BioLegend		FITC	1/20
IgG Rat	Chèvre	Molecular Probes		Alexa 488	1/200
IgG Rat	Poulet	Molecular Probes		Alexa 647	1/100
IgG Chèvre	Âne	Molecular Probes		Alexa 594	1/200
Produit	Cible	Fournisseur	Couplage	Emission	Dilution
Lectine	Endothélium	AbCys	Biotine	/	1/100
Streptavidine	Biotine	Invitrogen	Alexa 647		665 nm
DAPI	Noyaux	Sigma	X	450-490 nm	1/10000

Tableau 5 : Anticorps et produits utilisés pour les expériences d'immuno-fluorescence

0.05µg/mL de streptomycine, 0.05U/mL de pénicilline, et 10% de NCS. Les cultures sont rincées au PBS 6h plus tard afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Les co-cultures sont réalisées lorsque le stroma atteint la pré-confluence, environ 6 jours après l'ensemencement. Les CSH triées à partir de SVF de TA ou de MO sont ensemencées sur les stromas dans du Myélocult M5300 (StemCell Technologies) supplémenté en hydrocortisone 1µM. Les co-cultures sont maintenues dans un incubateur à 33°C, 5% CO₂ et 20% O₂. La moitié du milieu est changée tous les 3 jours. Après 5 semaines de co-culture, les cellules du surnageant sont récupérées, centrifugées et ensemencées en milieu clonogénique semi-solide de méthylcellulose M3434 (StemCell Technologies).

Expériences de clonogénie à partir de SVF

Le potentiel clonogénique de la SVF a été étudié en ensemençant de la SVF totale dans 1,5mL de méthylcellulose M3434 pour la SVF de souris ou H4435 pour la SVF humaine dans des boîtes de petri P30 à une densité de 20.10³ cellules par mL. La méthylcellulose a été supplémentée ou non en i) lactate à 5, 10 ou 25 mM, ii) LDL modérément oxydées, iii) palmitate (10µg/mL, collaboration avec le Dr Negre-Salavayre I2MC équipe 10, Toulouse) ou iv) oléate à une concentration de 10µg/mL (Collaboration avec le Dr Negre-Salavayre, I2MC équipe 10, Toulouse). Après deux semaines, les clones hématopoïétiques formés sont quantifiés et analysés par cytométrie en flux selon le même protocole que les cellules de la SVF.

Immuno-fluorescence

Les différents produits et anticorps utilisés pour ces expériences sont listés dans le tableau 5. Les TA adultes fixés sont inclus dans l'agarose 2% pour réaliser des coupes de 300µm d'épaisseur à l'aide d'un vibratome³⁴⁰. Les sites d'accrochage des anticorps par leur fragment Fc sont bloqués avec du PBS contenant 0.2% de triton et 2% de NHS (Normal Horse Serum) pendant 3h à température ambiante. Les tissus sont ensuite incubés avec les anticorps primaires et la lectine toute la nuit à température ambiante dans du PBS 0.2% triton 2% NHS et rincés le lendemain avec du PBS triton. Dans certains cas la lectine a été injecté en rétro-orbital aux animaux avant le prélèvement des TA. Les tissus sont ensuite incubés avec les anticorps secondaires. Dans le cas d'anticorps secondaires couplés à des fluorochromes, l'incubation se fait toute la nuit à 4°C dans du PBS 0.2% triton. Dans le cas

d'anticorps secondaires biotinylés, la révélation se fait avec de la streptavidine couplée à un fluorochrome dans du PBS 0.2% triton. Après rinçage, les noyaux sont marqués par du DAPI (fluorescence dans l'UV) à 1/10000 dans du PBS pendant 30 minutes. Les contrôles négatifs sont réalisés en incubant les tissus avec les anticorps secondaires en omettant les anticorps primaires. Les acquisitions sont effectuées sur un microscope confocal sur la plateforme d'imagerie Ranguel IFR150 (microscopes Zeiss LSM 780).

Pour les expériences de microscopie sur TA entier. Le TA prélevé après fixation par perfusion intra-cardiaque est transparisé par une solution de Benzyl-Alcool Benzyl Benzoate (BABB) et imagés grâce à un microscope SPIM à feuille de lumière (Selective Plane Illumination Microscopy) afin d'imager le TA dans sa globalité et en profondeur sans perte du signal⁵⁵

Tests statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism : test de Student pour les données paramétriques et test Wilcoxon pour les données non paramétriques ; tests ANOVA pour les comparaisons multiples de données paramétriques et Kruskal-Wallis pour les comparaisons multiples de données non paramétriques. Dans les deux derniers cas, le test post-hoc de Dunnet a été utilisé. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart type. Les résultats, présentés sous la forme de nuages de points ou d'histogrammes sont considérés significatifs lorsque $p < 0.05$ (*) ; $p < 0.01$ (**) et $p < 0.001$ (***) .

RESULTATS

Chapitre 1 : Rôle physio(patho)logique de l'hématopoïèse du TA chez la souris

Article

Corrupted adipose tissue endogenous myelopoiesis initiates diet-induced metabolic disease.

Elodie Luche, Virginie Robert, Vincent Cuminetti, Celine Pomié, Quentin Sastourné-Arrey, Aurélie Waget, Emmanuelle Arnaud, Audrey Varin, Elodie Labit, Patrick Laharrague, Remy Burcelin, Louis Casteilla and Beatrice Cousin. *Elife*. 2017 Jun 28;6. pii: e23194. doi: 10.7554/eLife.23194.

Corrupted adipose tissue endogenous myelopoiesis initiates diet-induced metabolic disease

Elodie Luche¹, Virginie Robert¹, Vincent Cuminetti¹, Celine Pomié², Quentin Sastourné-Arrey¹, Aurélie Waget², Emmanuelle Arnaud¹, Audrey Varin³, Elodie Labit¹, Patrick Laharrague¹, Remy Burcelin^{2†}, Louis Casteilla^{1†}, Beatrice Cousin^{1*}

¹STROMALab, Université de Toulouse, CNRS ERL 5311, EFS, INP-ENVT, Inserm U1031, UPS, Toulouse, France; ²INSERM U1048, Université de Toulouse, EFS, INP-ENVT, Inserm U1031, UPS, Toulouse, France; ³STROMALab, Université de Toulouse, EFS, INP-ENVT, Inserm U1031, UPS, Toulouse, France

Abstract Activation and increased numbers of inflammatory macrophages, in adipose tissue (AT) are deleterious in metabolic diseases. Up to now, AT macrophages (ATM) accumulation was considered to be due to blood infiltration or local proliferation, although the presence of resident hematopoietic stem/progenitor cells (Lin-/Sca+/c-Kit+; LSK phenotype) in the AT (AT-LSK) has been reported. By using transplantation of sorted AT-LSK and gain and loss of function studies we show that some of the inflammatory ATM inducing metabolic disease, originate from resident AT-LSK. Transplantation of AT-LSK sorted from high fat diet-fed (HFD) mice is sufficient to induce ATM accumulation, and to transfer metabolic disease in control mice. Conversely, the transplantation of control AT-LSK improves both AT-inflammation and glucose homeostasis in HFD mice. Our results clearly demonstrate that resident AT-LSK are one of the key point of metabolic disease, and could thus constitute a new promising therapeutic target to fight against metabolic disease.

DOI: [10.7554/eLife.23194.001](https://doi.org/10.7554/eLife.23194.001)

*For correspondence: beatrice.cousin@inserm.fr

†These authors contributed equally to this work

Competing interests: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 12

Received: 09 January 2017

Accepted: 28 June 2017

Published: 28 June 2017

Reviewing editor: Michael Czech, University of Massachusetts Medical School, United States

© Copyright Luche et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Introduction

Over the last two decades a critical role of adipose tissue macrophages (ATM) in the initiation of the metabolic inflammation, commonly found in highly prevalent chronic diseases such as obesity, has been largely documented (*Chawla et al., 2011*). At the onset of high-fat diet (HFD)-induced metabolic disease, accumulating ATM exhibit an inflammatory phenotype characterized by CD11c expression and this contributes to adipocyte dysfunction and insulin resistance (*Lumeng et al., 2007; Lumeng et al., 2008*). In addition, an increased number of ATM worsens features of metabolic disease (*Hirasaka et al., 2007; Kamei et al., 2006*), whereas a reduced number of ATM is associated with a reduced metabolic inflammation and an improved metabolic status (*Kanda et al., 2006*). Although most of the literature supports the idea that ATM cause disease, accumulating evidences recently show that these ATM also have beneficial effects in obesity. Different molecular tools such as lipid storage (*Aouadi et al., 2014*), autophagy (*Fitzgibbons and Czech, 2016*), or program of lysosomal metabolism (*Xu et al., 2013*) are used by the ATM to buffer and process excessive amounts of lipids and maintain adipose tissue (AT) homeostasis, in the context of metabolic disease. In addition, an acute inflammatory response in the AT would be essential for adipose remodeling and adipocyte differentiation, and thus for a healthy AT expansion (*Cinti et al., 2005; Wernstedt Asterholm et al., 2014; Ye and McGuinness, 2013*).

It is of common knowledge that macrophages invading the AT originate from the bone marrow (BM) via blood circulation (*Weisberg et al., 2003*) notably in response to AT inflammation which has been shown to trigger the proliferation of BM hematopoietic progenitors and myelopoiesis, that in turn perpetuate local maladaptive inflammatory response (*Nagareddy et al., 2014, 2013; Singer et al., 2014, 2015*). In addition to monocyte recruitment, recent studies suggest a local regulation and proliferation of ATM, independently of BM precursors. Reduced apoptosis, local proliferation, as well as reduced migration capacity of resident ATM may also lead to their accumulation in obesity (*Amano et al., 2014; Hill et al., 2015; Ramkhelawon et al., 2014*).

In physiological state, we and others recently demonstrated the presence of a peculiar functional resident hematopoietic stem/progenitor cells (LSK) population in the AT (*Han et al., 2010; Poglio et al., 2012, 2010*) that can renew innate immune cells and especially macrophages in the AT, via in situ differentiation. We thus hypothesized that accumulating ATM in metabolic disease could partly originate from AT-endogenous hematopoietic activity. To study the role of AT-LSK in the initiation of metabolic inflammation, we transplanted the corresponding cells from diabetic or control mice to their counterpart recipient mice, exploring therefore their capacity to transfer the metabolic phenotype and demonstrate their causal role. We show here that some of the inflammatory ATM that induce metabolic disease development, originate from resident AT-LSK, demonstrating that AT-LSK are one of the key point of metabolic disease. Altogether our results provide a new mechanism for the increase in pro-inflammatory ATM in metabolic diseases and point out AT-LSK as novel regulator of these pathologies.

Results

Inflammatory ATM derived from subcutaneous (sc) AT-LSK differentiate and accumulate in HFD mice

To investigate whether some of the inflammatory macrophages in the AT could originate from AT-LSK during metabolic disease, chimeric mice were generated by using standard repopulation assays as previously described (*Poglio et al., 2012*) by injecting 2.10^3 sorted scAT-LSK mixed with 2.10^5 congenic BM cells isolated from congenic CD45 variants. Injection of BM cells ensure the survival of the recipient, as previously described (*Miller et al., 2008*). Two months after transplantation, chimeric mice were fed either a normal chow (NC) or a HFD during 12 weeks (*Figure 1a*). This diet has been previously described to induce insulin resistance and dysglycemia in mice (*Burcelin et al., 2002; Fernández-Real et al., 2011*).

We first characterized the metabolic and inflammatory profiles of these chimeric mice. As expected, after 12 weeks on HFD, body weight (*Figure 1b*) and scAT weight (*Figure 1c*) were slightly increased. Chimeric mice became glucose intolerant as revealed by intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT) (*Figure 1d*), their fasting glucose and insulin levels were significantly higher from that of normal chow fed mice (*Figure 1d and e*), and their scAT exhibited insulin resistance as shown by reduced glucose utilization in response to insulin (*Figure 1f*). In HFD chimeric mice, the ATM number (identified as F4/80⁺/MHCII⁺) significantly increased in the scAT (*Figure 1g*), and was associated with a higher expression of inflammatory cytokines (Il-1b, PAI1 and CCL2) (*Figure 1h*), confirming that HFD induces a metabolic inflammation in the scAT of chimeric mice.

To assess the reconstitution efficiency, the chimerism (percentage of CD45.1⁺ donor cells among total CD45⁺ cells) was determined by flow cytometry in the scAT (*Figure 1i*) and the BM (*Figure 1j*), as well as in other metabolic tissues such as visceral AT (pgAT), liver and muscles. The chimerism was similar in the scAT in both control and HFD chimeric mice, whereas in the pgAT it was slightly decreased in HFD group compared to NC (*Figure 1k*). In the liver and muscles, the chimerism was very low (*Figure 1k*), suggesting no significant impact of CD45.1⁺ cells in these organs. As expected and previously described (*Poglio et al., 2012*), no CD45.1⁺ cells were identified in the BM (*Figure 1k*). To validate however the animal model of hematopoietic reconstitution, chimerism was also quantified in chimeric mice obtained after transplantation of 2.10^3 sorted BM-LSK mixed with 2.10^5 congenic BM cells isolated from congenic CD45 variants. In these mice, CD45.1⁺ cells were observed in both the scAT and the BM as expected (*Poglio et al., 2012*), and the chimerism was not significantly modified by the diet (*Figure 1—figure supplement 1*).

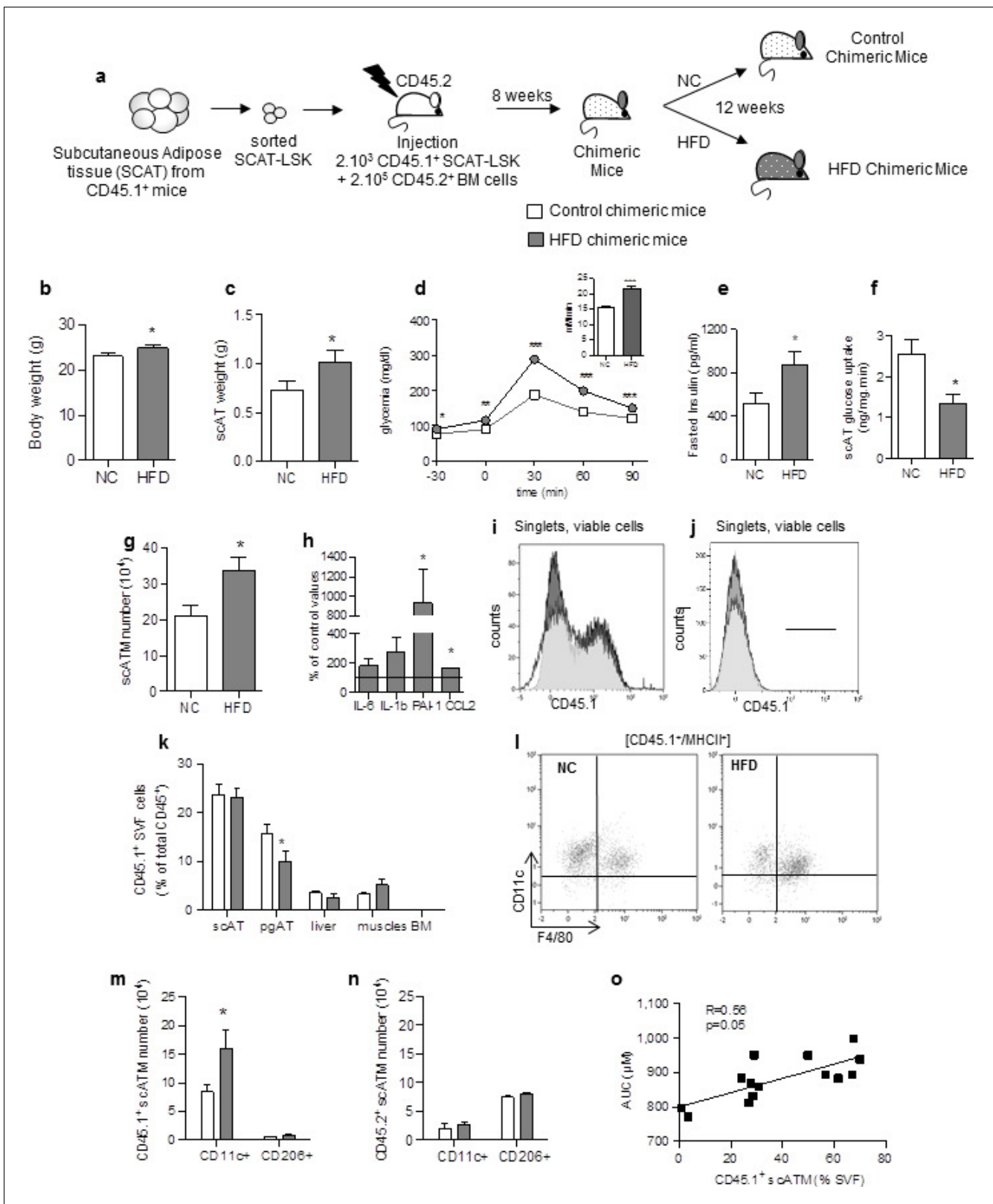


Figure 1. Accumulating subcutaneous Adipose Tissue Macrophages (scATM) in HFD-chimeric mice originate from scAT-LSK. (a) Schematic representation of experimental procedure: lethally irradiated CD45.2⁺ recipients mice were co-injected with sorted scAT-LSK and total BM cells isolated respectively from CD45.1 and CD45.2 expressing donor mice, and were then fed a normal Chow (NC) or a high fat diet (HFD) for 12 weeks. Metabolic profile was investigated in chimeric mice by (b) body weight, (c) scAT weight, (d and insert) IPGTT and AUC, (e) quantification of fasted insulin and (f) Figure 1 continued on next page

Figure 1 continued

scAT-glucose uptake (ng/mg.min). (g) Quantification of ATM identified as F4/80⁺/MHCII⁺ in the scAT. (h) Expression of genes encoding for inflammatory cytokines analyzed by qRT-PCR in the scAT and expressed as a percent of control values obtained in NC mice. (i–n) Flow cytometry was performed on SVF and BM cells from NC and HFD mice to identify CD45.1⁺ populations. Representative histograms of CD45.1⁺ cells in the scAT (i), and the BM (j). (k) Total chimerism in the scAT, pgAT, liver, muscles and BM expressed as percent of total CD45⁺ cells. (l) Representative dot plots of flow cytometry analysis showing CD11c⁺/F4/80⁺/MHCII⁺ cells in a CD45.1⁺ cell population gated on single live cells. Quantification of scAT-LSK-derived (m) and BM-derived (n) pro-inflammatory (MHCII⁺/F4/80⁺/CD11c⁺) and anti-inflammatory scATM populations (MHCII⁺/F4/80⁺/CD206⁺) expressed in absolute numbers. (o) Correlation between CD45.1⁺ ATM content (expressed in % of SVF) and AUC. Results are expressed as mean ± sem of 4 to 26 individual animals in control (white symbols) and HFD (grey symbols) groups. Comparisons between groups were made with the nonparametric Mann-Whitney test. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

DOI: [10.7554/eLife.23194.002](https://doi.org/10.7554/eLife.23194.002)

The following figure supplements are available for figure 1:

Figure supplement 1. Validation of the animal model of hematopoietic reconstitution.

DOI: [10.7554/eLife.23194.003](https://doi.org/10.7554/eLife.23194.003)

Figure supplement 2. Absence of accumulation of LSK-derived ATM in the pgAT of chimeric HFD mice.

DOI: [10.7554/eLife.23194.004](https://doi.org/10.7554/eLife.23194.004)

The origin and the nature of ATM were then determined by analysis of F4/80, MHCII, CD11c and CD206 expression in CD45.1 population (**Figure 1l**). After 12 weeks of HFD, the population of ATM deriving from scAT-LSK (CD45.1⁺) significantly increased in the scAT, accounting for 56 ± 6% of total scAT-ATM. This accumulation of ATM in the scAT was mainly and specifically due to an increase in inflammatory CD45.1⁺/CD11c⁺ macrophage number without any change in anti-inflammatory CD45.1⁺/CD206⁺ ATM content (**Figure 1m**). In addition, no change in pro- and anti-inflammatory ATM originating from the BM, was observed in the scAT of HFD fed chimeric mice (**Figure 1n**). In the pgAT, both CD11c⁺ and CD206⁺ ATM numbers originating from donor mice were similar in NC and HFD mice (**Figure 1—figure supplement 2a**). Accordingly, the expression of pro-inflammatory cytokines in pgAT was not significantly modified by the HFD (**Figure 1—figure supplement 2b**). Finally a significant positive correlation between scAT CD45.1⁺ ATM content (derived from scAT-LSK) and glucose intolerance was drawn (**Figure 1o**) suggesting a relationship between scAT-LSK hematopoietic activity and metabolic disease.

These results showed that HFD-induced diabetes is associated with an over production of inflammatory ATM in the scAT, originating in part from scAT-LSK differentiation.

ATM derived from scAT-LSK accumulate in AT of HFD mice due to early proliferation of progenitor cells

The increase in donor ATM in HFD chimeric mice could be due to increased proliferation and/or differentiation of progenitor cells, and/or to proliferation of mature macrophages. LSK and myeloid progenitors were therefore quantified in SVF cells from NC and HFD chimeric mice, based on the phenotype described previously (*van Galen et al., 2014*) and macrophage proliferation was assessed by staining with an antibody against the proliferation marker Ki67 (*Amano et al., 2014*). The numbers of CD45.1⁺ LSK cells (**Figure 2—figure supplement 1a**), CD45.1⁺ Multipotent Progenitors (MPP) (**Figure 2—figure supplement 1b**), and CD45.1⁺ Common Myeloid Progenitors (CMP) (**Figure 2—figure supplement 1c**), and the percentage of proliferating (Ki67⁺) ATM (**Figure 2—figure supplement 1d**) were similar in chimeric mice fed a HFD for 3 months, compared to NC. These results suggest that the dynamic phase of the scAT ATM accumulation occurred earlier in the pathogenesis. CD45.1⁺ LSK cells and myeloid progenitors were therefore quantified in chimeric mice fed a HFD for 3±7 days. As shown in **Figure 2**, a few days of HFD were sufficient to induce an increase in CD45.1⁺ LSK (**Figure 2a**), MPP (**Figure 2b**) and CMP (**Figure 2c**) numbers, whereas the number CD45.1⁺ scATM was not yet significantly modified (**Figure 2d**). This accumulation of CD45.1⁺ LSK and myeloid progenitor cells in the scAT of HFD mice was due to an enhanced proliferation as revealed by Ki67 staining (**Figure 2e**). In contrast, the proliferation of CD45.1⁺ ATM was low and unchanged by the diet (**Figure 2f**).

These results demonstrate that accumulation of ATM deriving from scAT-LSK in the scAT of HFD mice is due to an increase in myeloid progenitor proliferation that occurs very early in the diabetes development.

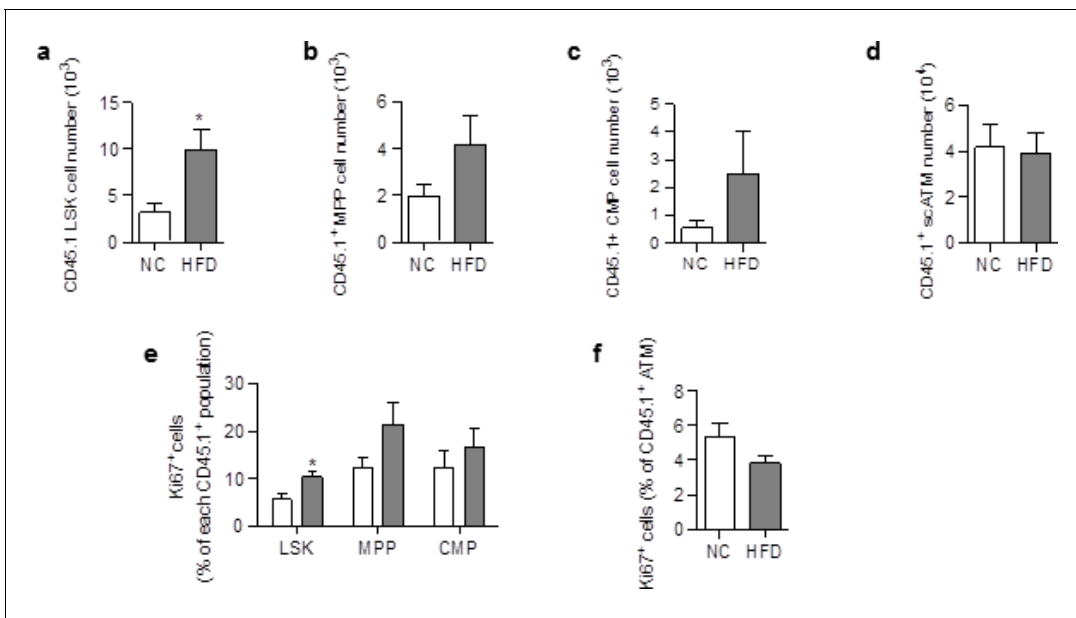


Figure 2. ATM accumulation in the scAT of HFD mice is due to enhanced proliferation of myeloid progenitors at the onset of the disease. Flow cytometry was performed on SVF cells from mice fed a NC or a HFD for 3 to 6 days, to identify myeloid progenitors and ATM. Quantification of LSK cells (a); Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺, Multipotent Progenitors (b); MPP; Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺/CD34⁺; Common Myeloid Progenitors (c); CMP; Lin⁻/Sca-1⁻/c-Kit⁺/CD34⁺ and ATM (d); MHCII⁺/F4/80⁺) within the CD45.1⁺ population, expressed in absolute numbers. Proliferation was assessed by Ki67 staining in CD45.1⁺ LSK and myeloid progenitors (e) as well as in CD45.1⁺ ATM (f), and expressed as percent of each CD45.1⁺ population. Results are expressed as mean ± sem of 4 to 8 individual animals in control (white symbols) and HFD (grey symbols) groups. Comparisons between groups were made with the nonparametric Mann-Whitney test. *p<0.05.

DOI: 10.7554/eLife.23194.005

The following figure supplement is available for figure 2:

Figure supplement 1. Differentiation and proliferation of ATM are unchanged in the scAT of chimeric mice after 3 months of HFD.

DOI: 10.7554/eLife.23194.006

Specific depletion of ATM derived from scAT-LSK improves glucose metabolism

To confirm the role of inflammatory scATM derived from scAT-LSK in metabolic inflammation, an hematopoietic repopulation assay was performed, using scAT-LSK isolated from CD45.2⁺ mice expressing the diphtheria toxin receptor (DTR) under control of the full CD11c promoter (Patsouris et al., 2008), and transplanted into lethally irradiated CD45.1⁺ recipient mice. After 12 weeks of HFD, chimeric mice received diphtheria toxin (DT) in order to specifically remove CD11c⁺ ATM deriving from scAT-LSK (Figure 3a).

Treatment with DT did not significantly modify body- and scAT weights (Figure 3b and c). Reconstitution efficiency was measured by flow cytometry in the scAT (Figure 3d). As expected, a significant decrease in CD45.2⁺ cell number was observed after DT-treatment due to removal of CD45.2⁺ ATM. Indeed, chimerism reached 67.8 ± 1% in the scAT of HFD mice versus 42.3 ± 3.5% of total CD45⁺ cells in the scAT of HFD mice treated with DT (p=0.015, nonparametric Mann-Whitney test). No CD45.2⁺ cells were detected in the BM (Figure 3e). DT treatment induced a specific and drastic depletion in inflammatory scATM derived from scAT-LSK (CD11c⁺/F4/80⁺/MHCII⁺/CD45.2⁺) (Figure 3f and g), but not in those derived from the BM (Figure 3h). This was associated with a significant decrease in the expression of inflammatory cytokines compared to HFD non treated mice (Figure 3i). CD11c is also highly expressed in dendritic cells. A slight decrease in DC number originating from scAT-LSK was observed after DT treatment in the scAT whereas BM-derived DC number remained unchanged (Figure 3j and k). Since HFD did not modify donor-derived DC number in the scAT (9.2 ± 2.6 10³ in NC vs 11.5 ± 2.1 10³ in HFD group), it is however unlikely that the decrease observed after DT treatment plays a key role in the pathogenesis.

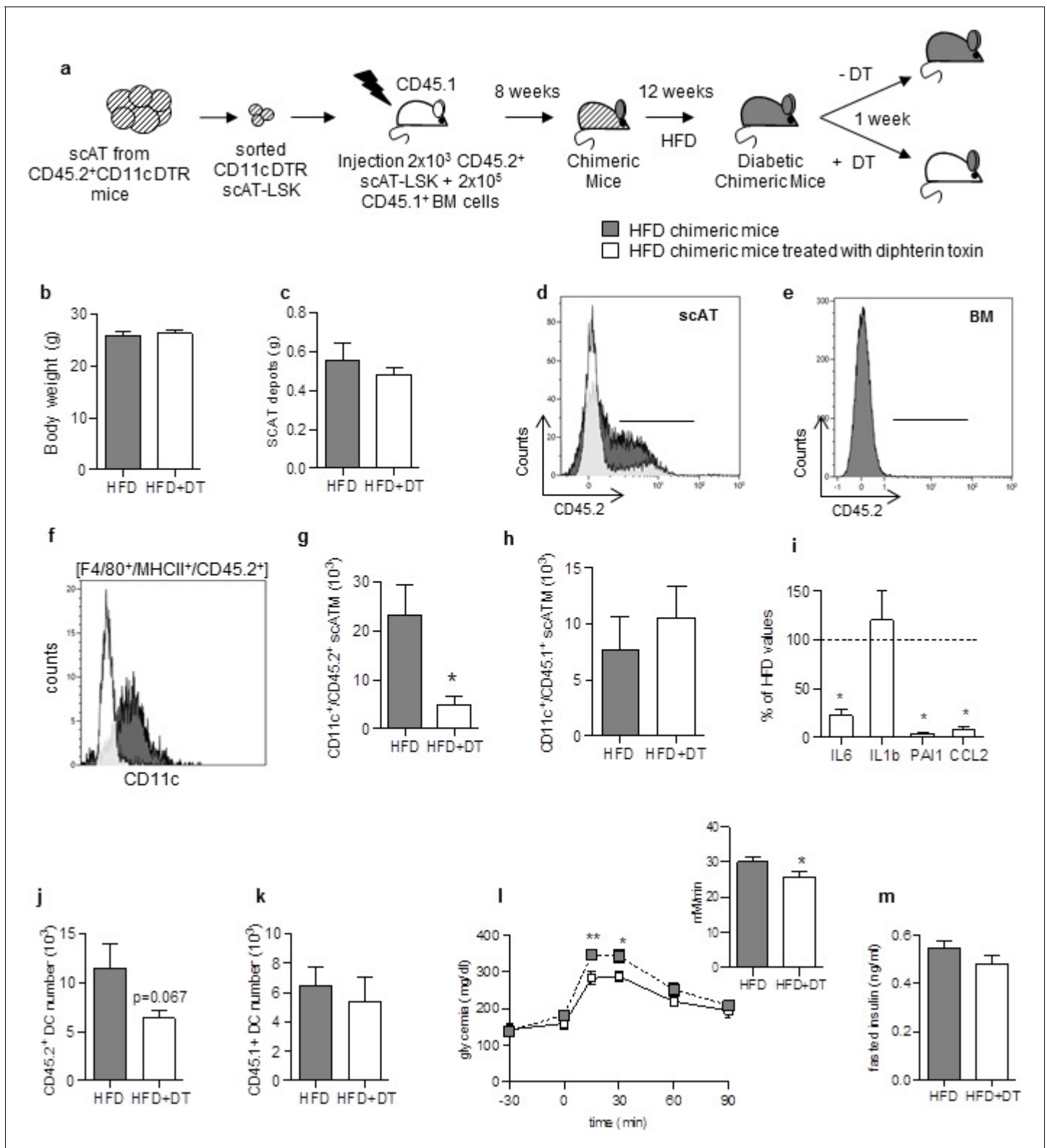


Figure 3. Specific depletion in inflammatory macrophages derived from scAT-LSK improves glucose metabolism in HFD mice. (a) Schematic representation of experimental procedure: lethally irradiated CD45.1⁺ recipient mice were co-injected with sorted scAT-LSK and total BM cells isolated respectively from CD45.2⁺ CD11c-DTR and CD45.1⁺ donor mice, and were then fed a high fat diet (HFD) for 12 weeks, before treatment with diphtheria toxin (DT) for 1 week. (b) Body weight and (c) scAT weight of chimeric mice measured at the end of the DT treatment. (d, e) Representative histograms of CD45.2 expression in the scAT and the BM of chimeric mice. (f–h) Representative histogram (f) and quantification of the numbers of inflammatory macrophages (g, h) in the scAT of chimeric mice. (i) Quantification of the levels of inflammatory markers in the serum of chimeric mice. (j–k) Quantification of the numbers of DCs in the scAT of chimeric mice. (l) Glycemia and insulin levels in chimeric mice. (m) Fasted insulin levels in chimeric mice. *Figure 3 continued on next page*

Figure 3 continued

ATM derived from scAT-LSK (g) or BM (h) identified as CD45.2⁺ or CD45.1⁺ F4/80⁺/MHCII⁺/CD11c⁺ cells respectively in HFD untreated (grey histogram) and DT-treated (white histogram) mice. (i) Expression of genes encoding for inflammatory cytokines analyzed by qRT-PCR in the scAT and expressed as a percent of control values obtained in untreated mice (dotted line). (j, k) Quantification of dendritic cells (F4/80⁺/CD11c⁺/MHCII⁺) derived from scAT-LSK (j) or the BM (k). Metabolic phenotype determined with (l) GTT and AUC and (m) insulin levels. Results are expressed in mean \pm sem of 4 to 8 individual animals in HFD untreated (grey symbols) or DT treated (white symbols) groups. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, nonparametric Mann-Whitney test. DOI: 10.7554/eLife.23194.007

The DT treatment slightly but significantly improved glucose tolerance (Figure 3l), without any change in fasting glucose and insulin levels (Figure 3l and m).

Altogether this *in vivo* approach demonstrates that the depletion of scAT-LSK-derived inflammatory ATM improves both inflammatory and metabolic status in HFD mice. This suggested that a modification of scAT-LSK hematopoietic activity may be one of the regulatory mechanism in this pathogenesis.

Adoptive transfer of metabolic disease by transplantation of scAT-LSK sorted from HFD mice

To test whether scAT-LSK may play a causal role in the development of metabolic disease, repopulation assays were performed with scAT-LSK sorted from either HFD or control CD45.1⁺ mice and transplanted in control CD45.2⁺ recipients. Both groups of chimeric mice were then maintained on normal diet after reconstitution (Figure 4a).

Body and scAT weights were similar in mice transplanted with control or HFD-primed scAT-LSK (Figure 4b and c). Total chimerism was similar in the scAT of both groups of mice (Figure 4d). No CD45.1⁺ cell was observed in the BM (Figure 4e).

Transplantation of scAT-LSK sorted from HFD mice induced a significant increase in scAT-LSK derived ATM in the scAT (Figure 4f and g), and this increased was due to an increase in CD11c⁺ ATM number, without any change in CD206⁺ ATM (Figure 4g). An increased expression of inflammatory cytokines such as IL-6, PAI-1 and CCL2 in the scAT was associated with changes in scATM content (Figure 4h). Mice transplanted with scAT-LSK sorted from HFD mice were glucose intolerant (Figure 4i), with increased fasted plasmatic glucose (Figure 4i) and insulin (Figure 4j) levels compared to mice transplanted with control scAT-LSK. A 2–3 fold decrease in glucose utilization was observed in the scAT (Figure 4k), demonstrating that these chimeric mice tend to be insulin resistant and corroborates the glucose tolerance data.

Altogether these data demonstrate that scAT-LSK sorted from HFD mice are able to induce the onset of metabolic disease when transplanted *in vivo* in control mice maintained on normal diet, via their sustained potential to generate inflammatory ATM.

Beneficial effect of healthy AT-LSK transplantation in HFD mice

Finally, to test whether transplantation of control AT-LSK could improve the metabolic profile of HFD mice, we performed repopulation assays with scAT-LSK sorted from HFD or control donor mice grafted in HFD recipient mice. The chimeric mice were then maintained on HFD for 2 additional weeks (Figure 5a). No difference in body (Figure 5b) and scAT weights (Figure 5c) was observed between both groups of chimeric HFD mice. Transplantation of scAT-LSK sorted from control mice into HFD mice induced an improvement in glucose tolerance (Figure 5d), a decrease in fasting insulin levels (Figure 5e), as well as an improvement of scAT-glucose utilization rate (Figure 5f). These data demonstrated that transplantation of control scAT-LSK in HFD mice improves significantly scAT insulin resistance and glucose tolerance.

Discussion

We have previously demonstrated the presence in AT of an endogenous functional hematopoietic process, based on the presence of a peculiar resident LSK population (Poglio *et al.*, 2012; Luche *et al.*, 2015). In steady state, AT-LSK are able to reconstitute a part of the immune cell compartment in AT or other organs except classic hematopoietic ones (Poglio *et al.*, 2012, 2010). Here we show the crucial role of AT-LSK in the development of metabolic disease. Indeed, the transfer of

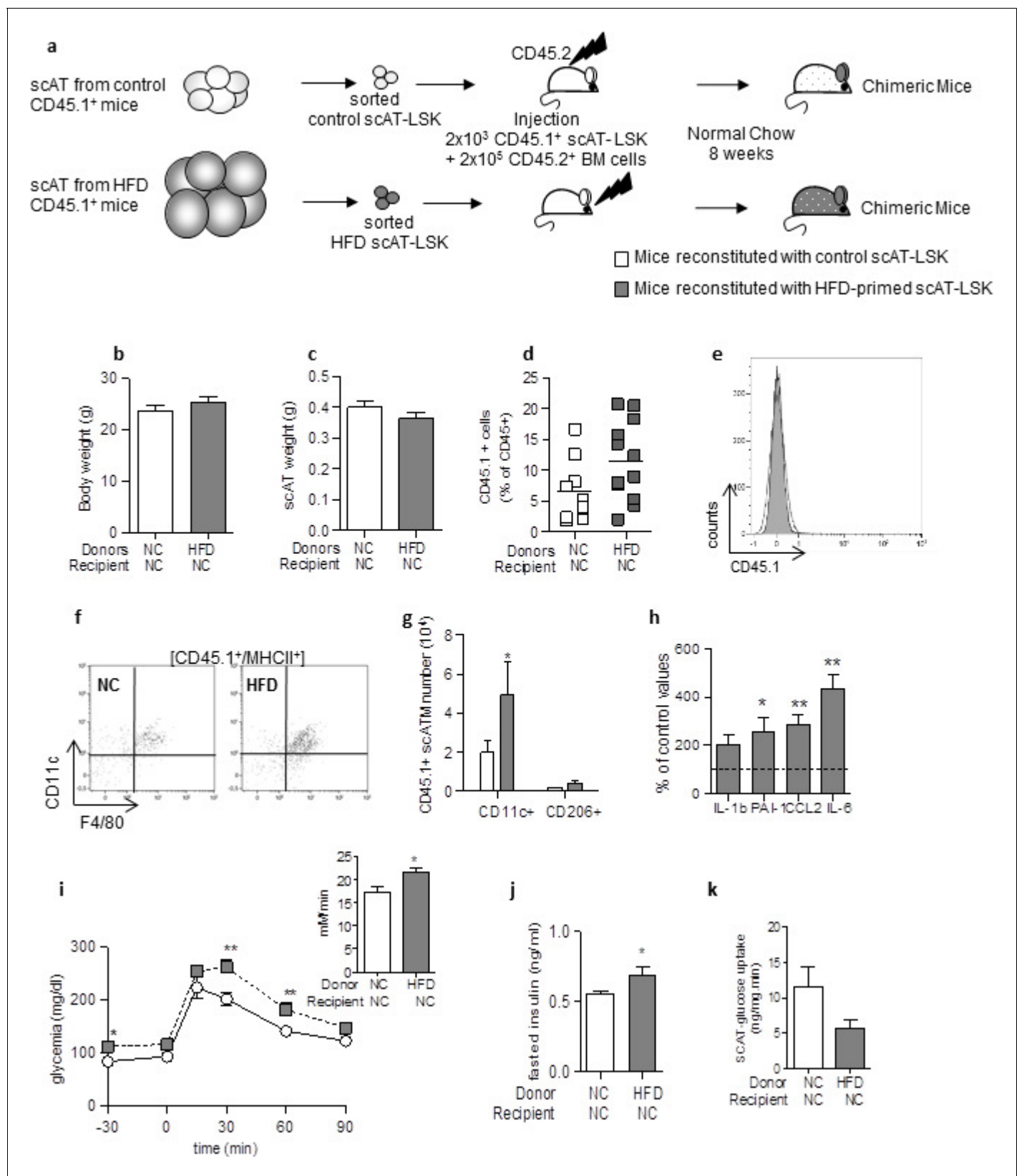


Figure 4. Adoptive transfer of metabolic disease with injection of scAT-LSK sorted from HFD mice into control animals. (a) Schematic representation of experimental procedure: lethally irradiated CD45.2⁺ recipient mice were co-injected with sorted scAT-LSK isolated from control or HFD CD45.1⁺ donor mice and total BM cells isolated from control CD45.2⁺ mice. Chimeric mice were then maintained on normal chow for 8 weeks. Body (b) and scAT (c) weight of donor and recipient mice. (d) CD45.1⁺ cells (% of CD45⁺) of donor and recipient mice. (e) Flow cytometry histogram of CD45.1 expression. (f) Flow cytometry plots of CD11c vs F4/80 for [CD45.1⁺/MHCII⁺] cells. (g) CD45.1⁺ scATM number (10⁴) for CD11c⁺ and CD206⁺ cells. (h) % of control values for IL-1b, PAI-1, ICCL2, and IL-6. (i) Glycemia (mg/dl) and mM/min over time (min). (j) Fasted insulin (ng/ml). (k) scAT-glucose uptake (ng/mg/min).

Figure 4 continued on next page

Figure 4 continued

weights (c) measured in chimeric mice. (d) chimerism was quantified in the scAT and expressed as percent of total CD45⁺ cells. (e) Representative histogram showing the absence of CD45.1⁺ cells in the BM. (f) Representative dot plots showing scATM identified as CD11c⁺/F4/80⁺/MHCII⁺ cells in a CD45.1⁺ cell population gated on singlet live cells. (g) Quantification of CD45.1⁺ pro-inflammatory (CD11c⁺) or anti-inflammatory (CD206⁺) ATM expressed in absolute numbers. (h) Expression of genes encoding for inflammatory cytokines analyzed by qRT-PCR in the scAT, and expressed as a percent of values obtained in mice reconstituted with control scAT-LSK (dotted line). Metabolic phenotype was determined with (i) GTT and AUC, (j) fasted insulin level and (k) scAT-glucose uptake. Results are expressed in mean ± sem of 5–8 individual mice transplanted with scAT-LSK sorted from either control (white symbols) or HFD (grey symbols) mice. *p<0.05, **p<0.01; nonparametric Mann-Whitney test.

DOI: 10.7554/eLife.23194.008

scAT-LSK sorted from HFD mice into control mice induces AT inflammation and metabolic disease, demonstrating that alteration of endogenous myelopoiesis in the AT controls, at least in part, glucose homeostasis and insulin resistance.

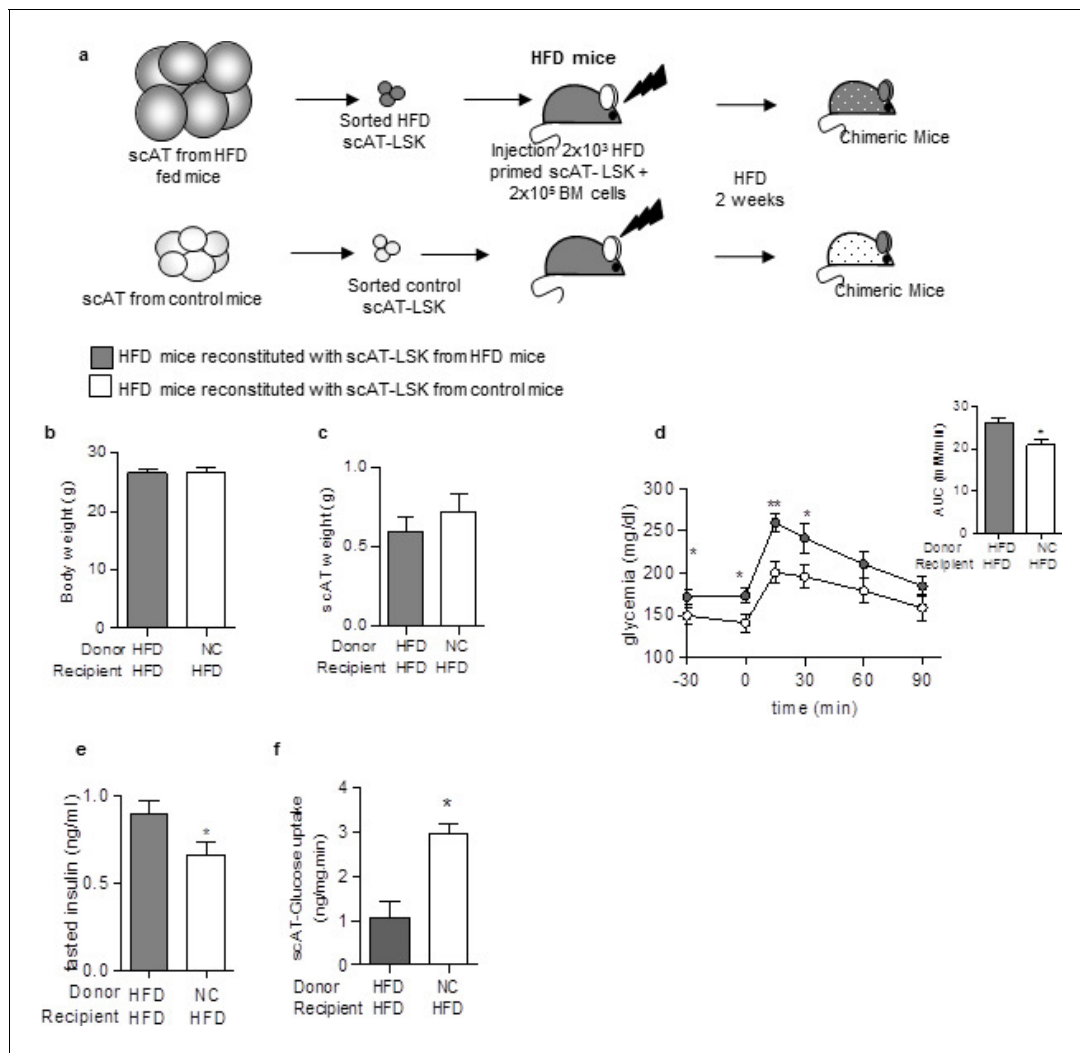


Figure 5. Beneficial effect of scAT-LSK transplantation in HFD mice. (a) Schematic representation of experimental procedure: HFD lethally irradiated CD45.2⁺ recipient mice were co-injected with sorted scAT-LSK isolated from HFD or control CD45.1⁺ donor mice and total BM cells from NC CD45.2⁺ mice, and maintained on HFD for 2 additional weeks. (b) Body weight and (c) scAT weight were measured in chimeric mice at the end of the diet period. Metabolic phenotype was determined with (d) GTT and AUC, (e) fasted insulin levels and (f) scAT-glucose uptake. Results are expressed in mean ± sem of 4–14 individual animals transplanted with scAT-LSK sorted from either HFD (grey symbols) or control (white symbols) mice. *p<0.05, **p<0.01; Comparisons between groups were made with the unpaired two-sided Student's t-test (b, d–f) or the nonparametric Mann-Whitney test.

DOI: 10.7554/eLife.23194.009

Measurement of reconstitution efficiency in all chimeric mice transplanted with scAT-LSK confirmed our previous study (Poglio *et al.*, 2012). Indeed, by showing no chimerism in the BM, we confirmed that the progeny of scAT-LSK in the AT did not arise from the BM.

In diabetic context, scAT-LSK generates pro-inflammatory ATM that exhibit deleterious effects on metabolism. The induction of AT inflammation and glucose intolerance has already been described after transfer of activated antigen-presenting cells into normal mice (Moraes-Vieira *et al.*, 2014). However we underline here the specific role of scAT-LSK derived-ATM, since their specific depletion in diabetic mice ameliorates metabolic features. In chimeric mice transplanted with CD11c-DTR scAT-LSK and treated with DT, the improvement of glucose tolerance was not associated with a decrease in fasting blood glucose and insulin concentrations. This set of data is in line regarding the etiology and kinetic of insulin resistance since both features are the consequences of a highly integrated set of mechanisms. Indeed, over the time course of HFD-induced hyperglycemia and insulin resistance, absorptive hyperglycemia develops first after one week then followed by fasting hyperglycemia 4 weeks later (Garidou *et al.*, 2015). Fasting hyperinsulinemia follows the same kinetic. Therefore, the improvement of glucose tolerance after only one week of DT treatment was expected, while the improvement of fasting glycemia and insulinemia should require a longer period of treatment.

Our results demonstrate that the accumulation of ATM in HFD mice, which is a largely described hallmark of obesity and diabetes (Lumeng *et al.*, 2007, 2008; Weisberg *et al.*, 2003; Cani *et al.*, 2007; Fujisaka *et al.*, 2009) originates at least in part from resident AT-LSK and occurs very early in the disease development and is mainly due to enhanced progenitor proliferation. Although our data point out an important role for these ATM derived from endogenous AT-hematopoiesis, they do not rule out a possible role for other cell/macrophages subsets originating from the medullar hematopoiesis, or other cell processes. Indeed, in HFD chimeric mice, ATM derived from AT-LSK account for approximately 50% of total ATM, showing that in the AT, macrophages arise from different sources. This is in line with the recent literature showing that beside the contribution of circulating myeloid progenitors originating from the BM, in situ ATM proliferation can be responsible at least in part, for accumulating ATM in obesity (Amano *et al.*, 2014). Other evidences suggest the possible involvement of preadipocytes that exhibit characteristics of macrophages (Charrière *et al.*, 2003; Cousin *et al.*, 1999) and that upon appropriate signals may efficiently and rapidly adapt to function as macrophages (Boutens and Stienstra, 2016). The specific contribution of these heterogeneous AT-immune cell subsets to development of glucose intolerance and insulin resistance will need further study.

In conclusion our data demonstrate the pivotal role of resident AT-LSK in the induction of metabolic disease, and underline the importance of ATM originating from endogenous AT hematopoietic activity. These data add thus new insights in the actual debate around macrophage ontogeny, and the contribution of different macrophage populations in tissue homeostasis (Ginhoux and Guilliams, 2016). Considering the abundance of AT in the body, and the generalized presence of AT-LSK in all deposits (Luche *et al.*, 2015), close to most of the major vital organs, the involvement of endogenous AT hematopoietic process in disease needs further investigation.

Materials and methods

Animal models and dietary treatments

Experiments were performed on 6- to 8- week-old male C57BL/6J CD45.2 mice and congenic male C57BL/6J CD45.1 mice. Animals were housed in a controlled environment (12 hr light/dark cycles at 21°C) with unrestricted access to water and diet. Mice were fed with a normal chow diet (NC; 12% fat, 28% protein, and 60% carbohydrate) or a high-fat diet (HFD, 72% fat, 28% protein, and <1% carbohydrate) for 3 days to 12 weeks. For AT-CD11c⁺ cell depletion, mice transplanted with scAT-LSK sorted from CD11c-DTR transgenic mice were injected i.p. with diphtheria toxin at a dose of 10 ng/g body weight at day -4, -2 and 0 before the GTT and flow cytometry analyses. Before removal of tissues, mice were killed by cervical dislocation.

Isolation of AT, BM liver and muscle cells

Bone Marrow (BM) cells were flushed from the femurs with α -MEM medium (Life Technologies). Subcutaneous inguinal adipose tissue (scAT), perigonadal adipose tissue (pgAT), and liver were dissected and mechanically dissociated. scAT, pgAT and liver fragments were digested with collagenase NB4 (Serva Electrophoresis) for 30 min at 37°C under agitation. Cells from liver and AT-stroma-vascular fraction (SVF) were collected by centrifugation after elimination of undigested fragments by filtration as described previously (Poglio *et al.*, 2010). Red blood cells were removed by incubation in hemolysis buffer. The quadriceps was excised and bones and tendons were removed. The muscle tissue was thoroughly minced and then digested at 37°C with 0.5 U/mL of collagenase B (Sigma) and 2.4 U/mL of Dispase II (Roche) for 30 min at 37°C under agitation. The tissue was triturated briefly by using a 18G needle. The digestion round was repeated and cell suspension was then passed through a 34 μ M filter. Cells were then collected by centrifugation. Cells were counted and used for flow cytometric analysis or LSK sorting.

Competitive repopulation assays

Competitive repopulation assays were conducted as described previously (Poglio *et al.*, 2012, 2010). Briefly, 2×10^3 Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺ (LSK) cells sorted from the scAT or the BM of donor mice were mixed with 2×10^5 competitor BM total cells. In all the experiments, control and experimental LSK were sorted from animals of equal age. The mixed population was intra-venously injected into lethally irradiated (10Gy, 137Cs source) recipient mice of equal age. Reconstituted mice were then allowed to recover during 2 months unless otherwise indicated. To allow monitoring of the LSK progeny, we used the CD45.1/CD45.2 mismatch system. scAT- or BM-LSK expressing either CD45.1 or CD45.2 were transplanted respectively in CD45.2 or CD45.1 expressing mice together with BM cells that have the same genotype that the recipient mice. Chimerism was assessed by quantifying CD45.1⁺ or CD45.2⁺ cells among total CD45⁺ cells in the SVF.

Flow cytometry analysis and cell sorting

Flow cytometry was used to characterize adipose tissue macrophages (ATM) as described previously (Poglio *et al.*, 2010). Freshly isolated SVF cells were stained in PBS containing FcR-blocking reagent. Phenotyping was performed by immunostaining with conjugated rat anti-mouse mAbs and comparing with isotype-matched control mAb (Supplementary file 1a). For Ki67 staining, cells were fixed and permeabilized with Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD Bioscience) according the manufacturer's instructions. Cells were then incubated with FITC-conjugated Ki67 (Miltenyi) or isotype control mAbs for 45 min. Cells were washed in PBS and analyzed on a FACS Canto II or Fortessa flow cytometer. Data acquisition and analysis were performed using Kalusa Version 1.2 software.

For LSK cell-sorting experiments, SVF cells were stained with FITC-conjugated Ly-6A/E (Sca-1), PE-Cy7-conjugated CD117 (c-Kit) antibodies, and APC-conjugated Lineage Panel. Cells negative for lineage markers were gated, and Sca-1 and CD117 double-positive cells were sorted. The degree of the enrichment of HSC determined by flow cytometry was between 92% and 97%.

Monitoring metabolic parameters

For the intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT) mice fasted for overnight or 6 hr were injected with a 20% glucose solution at a dose of 1 g glucose/kg body weight. Glycemia was determined by the use of a glucose meter on samples of blood collected from the tip of the tail vein. The area under the curve (AUC) was determined. Plasma insulin concentration was assessed from blood collected from fasted (for 6 hr) mice by ELISA according to the manufacturer's instructions. Euglycemic hyperinsulinemic clamps were performed (Burcelin *et al.*, 2004). Briefly, the mice were fasted for 6 hr and were infused at a rate of 18 or 4 mU.kg⁻¹.min⁻¹ of insulin for 3 hr. Simultaneously, a 20% glucose solution was infused to maintain a steady glycemia. To determine an index for the individual glucose use rate, a flash injection through the femoral vein of 30 μ Ci per mouse of D-2- [3 hr]deoxyglucose was performed 60 min before the end of the infusions. Individual tissue glucose uptake measurement in scAT and pgAT was determined as previously described (Kamohara *et al.*, 1997).

RNA extraction and Real-Time PCR

Total RNA from mouse tissues was isolated by Qiazol extraction and purification was done using RNeasy minicolumns. For quantitative real-time PCR analysis, RNA was reverse transcribed using a cDNA Reverse Transcription kit, SYBR Green PCR Master Mix, and 300 nmol/L primers on an Applied Biosystem StepOne instrument. Relative gene expression was calculated by the $\Delta\Delta CT$ method, normalized to 36B4, and expressed in percent of control values. Primers are listed in [Supplementary file 1b](#).

Statistical analyses

Experiments done previously were used to determine animal sample size with adequate statistical power. The number of animals used in each study is indicated in the figure legends. Studies were not randomized, and analyses were blinded to investigators. Chimeric mice exhibiting a chimerism <1% were excluded from the analysis. All results are given as means \pm sem. Normality was checked using the D'Agostino and Pearson omnibus normality test. Variance between groups was compared. Statistical differences were measured using an unpaired two-sided Student's t-test, or a nonparametric test (Mann–Whitney) when data did not pass the normality test, or when variances between groups were different. All statistical analyses were performed in GraphPad Prism 5.0 software and a two-tailed *P* value with 95% confidence interval was acquired. $p < 0.05$ was considered as significant. The following symbols for statistical significance were used throughout the manuscript: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Study approval

Animals were maintained in accordance to guidelines of the European Community Council. All experimental procedures were done in compliance with European regulations for animal experimentation. The authors have received requested approval from their Institutional Ethic Committee, and from Ministry of National Education, Higher Education and Research (# 2691–2015110616015905) for all the experiments performed.

Acknowledgements

The authors thank the US006/CREFRE INSERM/UPS (Toulouse, France) and specifically the Non-Invasive Exploration service for giving access to the gamma-irradiator BioBeam 8000, and the zootechnical core facility for animal care; the Toulouse RIO Imaging and flow cytometry core facility (Toulouse, France) for cell sorting, C Evra, V Marin, A Pecastaing P Guillou, A Balguerie, and A Giry for their technical assistance. Our research was supported by a grant from Aviesan/AstraZeneca, « Diabetes and the vessel wall injury » program, by a grant from the Société Francophone du Diabète, and by the French ANR Project «WAT-HEART» (ANR 16-CE14-0006-01). Rémy Burcelin is a recipient of grants from the 7th European Framework Program (Florinash), the Agence Nationale de la Recherche (ANR: Floradip, Transflora, Bactimmunodia). Céline Pomié is recipient of grant from the Société Francophone du Diabète. Virginie Robert is recipient of grant from French ANR Project «WAT-HEART».

Additional information

Funding

Funder	Grant reference number	Author
Aviesan/AstraZeneca		Louis Casteilla Beatrice Cousin
Société Francophone du Diabète		Beatrice Cousin
Agence Nationale de la Recherche	ANR 16-CE14-0006-01	Beatrice Cousin

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

ELu, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing—original draft, Project administration; VR, Formal analysis, Investigation, Writing—original draft; VC, ELA, Formal analysis, Investigation; CP, EA, Formal analysis, Investigation, Methodology; QS-A, AW, Formal analysis; AV, Formal analysis, Investigation, Writing—original draft, Experimentation; PL, Supervision, Writing—original draft, Project administration; RB, Conceptualization, Supervision, Methodology, Writing—original draft; LC, Conceptualization, Resources, Supervision, Funding acquisition, Writing—original draft, Writing—review and editing; BC, Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Writing—original draft, Project administration, Writing—review and editing

Author ORCIDs

Beatrice Cousin,  <http://orcid.org/0000-0003-2952-4601>

Ethics

Animal experimentation: Animals were maintained in accordance to guidelines of the European Community Council. All experimental procedures were done in compliance with European regulations for animal experimentation. The authors have received requested approval from their Institutional Ethic Committee, and from Ministry of National Education, Higher Education and Research (# 2691-2015110616015905) for all the experiments performed.

Additional files

Supplementary files

- Supplementary file 1. Antibody (**Supplementary file 1a**) and Primer (**Supplementary file 1b**) lists. DOI: [10.7554/eLife.23194.010](https://doi.org/10.7554/eLife.23194.010)

References

- Amano SU, Cohen JL, Vangala P, Tencerova M, Nicoloso SM, Yawe JC, Shen Y, Czech MP, Aouadi M. 2014. Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. *Cell Metabolism* **19**:162–171. doi: [10.1016/j.cmet.2013.11.017](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.017), PMID: [24374218](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24374218/)
- Aouadi M, Vangala P, Yawe JC, Tencerova M, Nicoloso SM, Cohen JL, Shen Y, Czech MP. 2014. Lipid storage by adipose tissue macrophages regulates systemic glucose tolerance. *AJP: Endocrinology and Metabolism* **307**:E374–E383. doi: [10.1152/ajpendo.00187.2014](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00187.2014), PMID: [24986598](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24986598/)
- Boutens L, Stienstra R. 2016. Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia* **59**:879–894. doi: [10.1007/s00125-016-3904-9](https://doi.org/10.1007/s00125-016-3904-9), PMID: [26940592](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26940592/)
- Burcelin R, Crivelli V, Dacosta A, Roy-Tirelli A, Thorens B. 2002. Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **282**:E834–E842. doi: [10.1152/ajpendo.00332.2001](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00332.2001), PMID: [11882503](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11882503/)
- Burcelin R, Uldry M, Foretz M, Perrin C, Dacosta A, Nenniger-Tosato M, Seydoux J, Cotecchia S, Thorens B. 2004. Impaired glucose homeostasis in mice lacking the alpha1b-adrenergic receptor subtype. *Journal of Biological Chemistry* **279**:1108–1115. doi: [10.1074/jbc.M307788200](https://doi.org/10.1074/jbc.M307788200), PMID: [14581480](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14581480/)
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, et al. 2007. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* **56**:1761–1772. doi: [10.2337/db06-1491](https://doi.org/10.2337/db06-1491), PMID: [17456850](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17456850/)
- Charrière G, Cousin B, Arnaud E, André M, Bacou F, Penicaud L, Casteilla L. 2003. Preadipocyte conversion to macrophage: evidence of plasticity. *The Journal of Biological Chemistry* **278**:9850–9855. doi: [10.1074/jbc.M210811200](https://doi.org/10.1074/jbc.M210811200), PMID: [12519759](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12519759/)
- Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. 2011. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nature Reviews Immunology* **11**:738–749. doi: [10.1038/nri3071](https://doi.org/10.1038/nri3071), PMID: [21984069](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21984069/)
- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS. 2005. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of Lipid Research* **46**:2347–2355. doi: [10.1194/jlr.M500294-JLR200](https://doi.org/10.1194/jlr.M500294-JLR200), PMID: [16150820](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16150820/)
- Cousin B, Munoz O, Andre M, Fontanilles AM, Dani C, Cousin JL, Laharrague P, Casteilla L, Penicaud L. 1999. A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *FASEB Journal* **13**:305–312. PMID: [9973318](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9973318/)

- Fernández-Real JM**, Pérez del Pulgar S, Luche E, Moreno-Navarrete JM, Waget A, Serino M, Sorianoello E, Sánchez-Pla A, Pontaque FC, Vendrell J, Chacón MR, Ricart W, Burcelin R, Zorzano A. 2011. CD14 modulates inflammation-driven insulin resistance. *Diabetes* **60**:2179–2186. doi: [10.2337/db10-1210](https://doi.org/10.2337/db10-1210), PMID: [21700881](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21700881/)
- Fitzgibbons TP**, Czech MP. 2016. Emerging evidence for beneficial macrophage functions in atherosclerosis and obesity-induced insulin resistance. *Journal of Molecular Medicine* **94**:267–275. doi: [10.1007/s00109-016-1385-4](https://doi.org/10.1007/s00109-016-1385-4), PMID: [26847458](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26847458/)
- Fujisaka S**, Usui I, Bukhari A, Iktani M, Oya T, Kanatani Y, Tsuneyama K, Nagai Y, Takatsu K, Urakaze M, Kobayashi M, Tobe K. 2009. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes* **58**:2574–2582. doi: [10.2337/db08-1475](https://doi.org/10.2337/db08-1475), PMID: [19690061](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19690061/)
- Garidou L**, Pomié C, Klopp P, Waget A, Charpentier J, Aloulou M, Giry A, Serino M, Stenman L, Lahtinen S, Dray C, Iacovoni JS, Courtney M, Collet X, Amar J, Servant F, Lelouvier B, Valet P, Eberl G, Fazilleau N, et al. 2015. The gut Microbiota regulates intestinal CD4 T Cells Expressing ROR γ t and Controls Metabolic Disease. *Cell Metabolism* **22**:100–112. doi: [10.1016/j.cmet.2015.06.001](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.06.001), PMID: [26154056](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26154056/)
- Ginhoux F**, Williams M. 2016. Tissue-Resident macrophage ontogeny and homeostasis. *Immunity* **44**:439–449. doi: [10.1016/j.immuni.2016.02.024](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.024), PMID: [26982352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26982352/)
- Han J**, Koh YJ, Moon HR, Ryoo HG, Cho CH, Kim I, Koh GY. 2010. Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **115**:957–964. doi: [10.1182/blood-2009-05-219923](https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-219923), PMID: [19897586](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19897586/)
- Hill AA**, Anderson-Baucum EK, Kennedy AJ, Webb CD, Yull FE, Hasty AH. 2015. Activation of NF- κ B drives the enhanced survival of adipose tissue macrophages in an obesogenic environment. *Molecular Metabolism* **4**:665–677. doi: [10.1016/j.molmet.2015.07.005](https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.07.005), PMID: [26779432](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26779432/)
- Hirasaka K**, Kohno S, Goto J, Furochi H, Mawatari K, Harada N, Hosaka T, Nakaya Y, Ishidoh K, Obata T, Ebina Y, Gu H, Takeda S, Kishi K, Nikawa T. 2007. Deficiency of Cbl-b gene enhances infiltration and activation of macrophages in adipose tissue and causes peripheral insulin resistance in mice. *Diabetes* **56**:2511–2522. doi: [10.2337/db06-1768](https://doi.org/10.2337/db06-1768), PMID: [17601987](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17601987/)
- Kamei N**, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kowatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, et al. 2006. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *Journal of Biological Chemistry* **281**:26602–26614. doi: [10.1074/jbc.M601284200](https://doi.org/10.1074/jbc.M601284200), PMID: [16809344](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16809344/)
- Kamohara S**, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ. 1997. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* **389**:374–377. doi: [10.1038/38717](https://doi.org/10.1038/38717), PMID: [9311777](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9311777/)
- Kanda H**, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. 2006. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *Journal of Clinical Investigation* **116**:1494–1505. doi: [10.1172/JCI26498](https://doi.org/10.1172/JCI26498), PMID: [16691291](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16691291/)
- Luche E**, Sengenès C, Arnaud E, Laharrague P, Casteilla L, Cousin B. 2015. Differential hematopoietic activity in White adipose tissue depending on its localization. *Journal of Cellular Physiology* **230**:3076–3083. doi: [10.1002/jcp.25045](https://doi.org/10.1002/jcp.25045), PMID: [25989607](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25989607/)
- Lumeng CN**, Bodzin JL, Saltiel AR. 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation* **117**:175–184. doi: [10.1172/JCI29881](https://doi.org/10.1172/JCI29881), PMID: [17200717](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17200717/)
- Lumeng CN**, DelProposto JB, Westcott DJ, Saltiel AR. 2008. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes* **57**:3239–3246. doi: [10.2337/db08-0872](https://doi.org/10.2337/db08-0872), PMID: [18829989](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18829989/)
- Miller CL**, Dykstra B, Eaves CJ. 2008. Characterization of mouse hematopoietic stem and progenitor cells. *Current Protocols in Immunology* **Chapter 22**:Unit 22B 22. doi: [10.1002/0471142735.im22b02s80](https://doi.org/10.1002/0471142735.im22b02s80), PMID: [18432636](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18432636/)
- Moraes-Vieira PM**, Yore MM, Dwyer PM, Syed I, Aryal P, Kahn BB. 2014. RBP4 activates antigen-presenting cells, leading to adipose tissue inflammation and systemic insulin resistance. *Cell Metabolism* **19**:512–526. doi: [10.1016/j.cmet.2014.01.018](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.018), PMID: [24606904](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24606904/)
- Nagareddy PR**, Kraakman M, Masters SL, Stizaker RA, Gorman DJ, Grant RW, Dragoljevic D, Hong ES, Abdel-Latif A, Smyth SS, Choi SH, Korner J, Bornfeldt KE, Fisher EA, Dixit VD, Tall AR, Goldberg IJ, Murphy AJ. 2014. Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytosis in obesity. *Cell Metabolism* **19**:821–835. doi: [10.1016/j.cmet.2014.03.029](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.029), PMID: [24807222](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24807222/)
- Nagareddy PR**, Murphy AJ, Stizaker RA, Hu Y, Yu S, Miller RG, Ramkhalawon B, Distel E, Westerterp M, Huang LS, Schmidt AM, Orchard TJ, Fisher EA, Tall AR, Goldberg IJ. 2013. Hyperglycemia promotes myelopoiesis and impairs the resolution of atherosclerosis. *Cell Metabolism* **17**:695–708. doi: [10.1016/j.cmet.2013.04.001](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.04.001), PMID: [23663738](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23663738/)
- Patsouris D**, Li PP, Thapar D, Chapman J, Olefsky JM, Neels JG. 2008. Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metabolism* **8**:301–309. doi: [10.1016/j.cmet.2008.08.015](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.08.015), PMID: [18840360](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18840360/)
- Poglio S**, De Toni F, Lewandowski D, Minot A, Arnaud E, Barroca V, Laharrague P, Casteilla L, Cousin B. 2012. In situ production of innate immune cells in murine white adipose tissue. *Blood* **120**:4952–4962. doi: [10.1182/blood-2012-01-406959](https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-406959), PMID: [23071275](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23071275/)
- Poglio S**, De Toni-Costes F, Arnaud E, Laharrague P, Espinosa E, Casteilla L, Cousin B. 2010. Adipose tissue as a dedicated reservoir of functional mast cell progenitors. *Stem Cells* **28**:2065–2072. doi: [10.1002/stem.523](https://doi.org/10.1002/stem.523), PMID: [20845475](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20845475/)

- Ramkhelawon B**, Hennessy EJ, Ménager M, Ray TD, Sheedy FJ, Hutchison S, Wanschel A, Oldebeken S, Geoffrion M, Spiro W, Miller G, McPherson R, Rayner KJ, Moore KJ. 2014. Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity. *Nature Medicine* **20**:377–384. doi: [10.1038/nm.3467](https://doi.org/10.1038/nm.3467), PMID: [24584118](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24584118/)
- Singer K**, DelProposto J, Morris DL, Zamarron B, Mergian T, Maley N, Cho KW, Geletka L, Subbaiah P, Muir L, Martinez-Santibanez G, Lumeng CN. 2014. Diet-induced obesity promotes myelopoiesis in hematopoietic stem cells. *Molecular Metabolism* **3**:664–675. doi: [10.1016/j.molmet.2014.06.005](https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.06.005), PMID: [25161889](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25161889/)
- Singer K**, Maley N, Mergian T, DelProposto J, Cho KW, Zamarron BF, Martinez-Santibanez G, Geletka L, Muir L, Wachowiak P, Demirjian C, Lumeng CN. 2015. Differences in hematopoietic stem cells contribute to sexually dimorphic inflammatory responses to high Fat Diet-induced obesity. *Journal of Biological Chemistry* **290**:13250–13262. doi: [10.1074/jbc.M114.634568](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.634568), PMID: [25869128](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25869128/)
- van Galen P**, Kreso A, Mbong N, Kent DG, Fitzmaurice T, Chambers JE, Xie S, Laurenti E, Hermans K, Eppert K, Marciniak SJ, Goodall JC, Green AR, Wouters BG, Wienholds E, Dick JE. 2014. The unfolded protein response governs integrity of the haematopoietic stem-cell pool during stress. *Nature* **510**:268–272. doi: [10.1038/nature13228](https://doi.org/10.1038/nature13228), PMID: [24776803](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24776803/)
- Weisberg SP**, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* **112**:1796–1808. doi: [10.1172/JCI200319246](https://doi.org/10.1172/JCI200319246), PMID: [14679176](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14679176/)
- Wernstedt Asterholm I**, Tao C, Morley TS, Wang QA, Delgado-Lopez F, Wang ZV, Scherer PE. 2014. Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. *Cell Metabolism* **20**:103–118. doi: [10.1016/j.cmet.2014.05.005](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.05.005), PMID: [24930973](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24930973/)
- Xu X**, Grijalva A, Skowronski A, van Eijk M, Serlie MJ, Ferrante AW. 2013. Obesity activates a program of lysosomal-dependent lipid metabolism in adipose tissue macrophages independently of classic activation. *Cell Metabolism* **18**:816–830. doi: [10.1016/j.cmet.2013.11.001](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.001), PMID: [24315368](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24315368/)
- Ye J**, McGuinness OP. 2013. Inflammation during obesity is not all bad: evidence from animal and human studies. *AJP: Endocrinology and Metabolism* **304**:E466–E477. doi: [10.1152/ajpendo.00266.2012](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00266.2012), PMID: [23269411](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23269411/)

L'augmentation du nombre de macrophages et leur activation dans le tissu adipeux (TA) ont un effet délétère sur l'homéostasie énergétique de l'organisme et sont positivement corrélées au développement de maladies métaboliques¹⁶². Il est classiquement décrit que ces macrophages proviennent d'une infiltration de cellules circulantes produites dans la moelle osseuse (MO). D'autres études plus récentes ont mis en évidence que les macrophages tissulaires, et notamment ceux du TA, se renouvellent grâce à une prolifération locale^{167,175,341}.

Il a été démontré par notre équipe qu'il existe au sein du TA un processus d'hématopoïèse grâce à des cellules souches hématopoïétiques (CSH) résidentes de phénotype $c\text{-Kit}^+ / \text{Sca-1}^+ / \text{Lin}^-$ ³³⁶. Ce processus d'hématopoïèse *in situ* produit essentiellement des cellules myéloïdes, dont des macrophages.

Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'activité hématopoïétique du TA est modifiée au cours du développement des maladies métaboliques, au profit d'une production accrue de macrophages pro-inflammatoires, contribuant ainsi à la mise en place de l'inflammation.

Pour tester cette hypothèse, notre stratégie a consisté à réaliser des expériences de reconstitution hématopoïétique dans lesquelles les CSH injectées sont issues du TA de souris donneuses CD45.1, et sont co-injectées avec des cellules de MO totale de souris CD45.2 dans des receveuses CD45.2 irradiées à dose létale. Les cellules CD45.1 présentes dans le TA correspondent alors aux cellules produites spécifiquement par les CSH du TA, alors que les cellules CD45.2 correspondent aux cellules de l'hôte. 8 semaines après la greffe, les souris chimères ont été nourries avec un régime standard Normal Chow (NC) ou un régime gras (HFD) contenant 72% de lipides. Ce régime est connu pour induire un diabète caractérisé par une hyperglycémie à jeun et une intolérance au glucose après 3 mois de régime, sans toutefois augmenter significativement le poids des souris comparé à des souris contrôles³⁴².

Nous montrons par cytométrie en flux que les macrophages pro-inflammatoires CD11c^+ qui s'accumulent dans le TA en réponse à un régime diabétogène riche en lipides proviennent en partie de l'activité hématopoïétique des CSH du TA (fig. 1). Cette accumulation est due à une prolifération plus importante de progéniteurs myéloïdes (fig. 2).

Nous avons reproduit ces expériences en utilisant des CSH issues de TA de souris CD11c-DTR. Dans ce modèle, la descendance des CSH injectées exprime le récepteur à la toxine diphtérique sous contrôle de l'expression du marqueur CD11c. Les macrophages pro-inflammatoires CD11c⁺ produits spécifiquement dans le TA peuvent donc être supprimés par la toxine diphtérique chez la souris diabétique.

Dans cette expérience, les souris sous HFD traitées avec la toxine présentent une réduction significative du nombre de macrophages pro-inflammatoires provenant de l'hématopoïèse du TA (fig. 3g), associée à une diminution de l'expression de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires dans le TA en comparaison avec les souris sous HFD non traitées par la toxine (fig. 3h). En outre, sous HFD, les souris traitées à la toxine présentent une amélioration de la tolérance au glucose en comparaison avec des souris non traitées (fig. 3i). Ces résultats montrent le rôle spécifique des macrophages pro-inflammatoires produits par les CSH du TA dans le développement de l'intolérance au glucose.

Afin de déterminer si une dysfonction des CSH du TA peut être à l'origine du développement des maladies métaboliques, nous avons transplanté des CSH issues de TA de souris sous régime NC ou HFD à des souris receveuses maintenues sur régime normal (fig. 4a). 8 semaines après la greffe, le nombre de macrophages pro-inflammatoires produits *in situ* est augmenté chez les souris ayant reçu des CSH de souris sous HFD (fig. 4g). Cette augmentation s'accompagne d'une augmentation de l'expression de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires dans le TA (fig. 4h), d'une hyperinsulinémie à jeun et d'une intolérance au glucose (fig. 4j). Ces résultats indiquent que des CSH dont l'activité est modifiée par un régime gras peuvent transférer le désordre métabolique de la souris donneuse à la souris receveuse sous régime normal par une production locale de macrophages pro-inflammatoires.

Nous avons donc fait l'hypothèse qu'inversement, la restauration d'une hématopoïèse normale dans une souris diabétique permettrait l'amélioration des paramètres métaboliques. Nous avons donc transplanté des CSH issues de souris sous régime normal dans des souris receveuses sous HFD (fig. 5a). 2 semaines après la transplantation, et bien que les souris receveuses soient maintenues sur un régime HFD nous observons une amélioration de la tolérance au glucose (fig. 5d), de l'insulinémie à jeun (fig. 5e) et de

l'utilisation de glucose par le TA (fig.5f). En conclusion, ces données montrent le rôle clé des CSH du TA dans le déclenchement des désordres métaboliques *via* une augmentation de la production endogène de macrophages pro-inflammatoires dans le TA en réponse à un régime gras.

En conclusion, des expériences de gain de fonction en transplantant des CSH de TA issues de souris diabétiques dans des souris saines, et inversement des expériences de transplantation de CSH issues de souris saines dans des souris diabétiques induisent respectivement un transfert de la maladie ou une amélioration des paramètres métaboliques. Le transfert de la maladie est dû à une production plus importante de macrophages pro-inflammatoires par les CSH issues de souris diabétiques par rapport à des CSH issus d'animaux sains. Cette production plus importante résulte d'une prolifération des progéniteurs myéloïdes. Ces données permettent de proposer pour la première fois un rôle direct de l'hématopoïèse du TA dans le développement du diabète. De plus, les expériences de transplantation de CSH de TA de souris diabétiques sont suffisantes pour transférer la maladie, suggérant un effet des CSH transplantées indépendamment d'une régulation de ces CSH par la niche.

Chapitre 2 : Caractérisation du micro-environnement des CSH au sein du TA

En cherchant à comparer l'activité hématopoïétique du SCAT et du PGAT, notre équipe a montré que la transplantation de CSH issues de dépôts sous-cutanés (SCAT) ou profond périgonadique (PGAT) reconstitue plus fortement le compartiment hématopoïétique du SCAT que du PGAT, quelle que soit l'origine des CSH³³⁷. Le contenu en ASC qui sont des cellules capables de supporter l'hématopoïèse médullaire, est supérieur dans le SCAT par rapport au PGAT. De plus, ces ASC expriment différemment plusieurs facteurs connus pour réguler l'activité des CSH. L'ostéopontine, le GM-CSG et l'IL-15 sont exprimés plus fortement dans le SCAT que dans le PGAT, alors que le Leukemia Inhibitory Factor (LIF) est exprimé plus fortement dans le PGAT³³⁷. Ces résultats suggèrent que les activités hématopoïétiques des SCAT et PGAT sont différentes, et ces différences pourraient être dues à des micro-environnements différents. Compte tenu de l'importance du micro-environnement dans la régulation de l'activité des CSH de la MO, nous avons fait l'hypothèse que les CSH du TA résident dans un micro-environnement particulier qui contrôlerait leur activité.

Pour caractériser ce micro-environnement, nous avons réalisé deux approches en parallèle : une approche de localisation des CSH *in situ* afin d'identifier le micro-environnement local au niveau cellulaire, et une approche *in vitro* afin de déterminer les acteurs cellulaires et moléculaires capables de contrôler leur activité hématopoïétique.

I. Localisation *in situ* des CSH du TA.

1) Approche par *tracking* cellulaire

Afin de localiser les CSH du TA *in situ*, nous avons réalisé des expériences de *tracking* cellulaire. Pour cela, nous avons utilisé des CSH triées à partir du TA d'une lignée de souris transgénique mT/mG. Ces souris expriment constitutivement et de manière ubiquitaire la protéine fluorescente rouge tdTomato à la membrane de leurs cellules sous le contrôle d'un promoteur Rosa 26. Les cellules Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺ ont été triées suivant la stratégie de *gating*

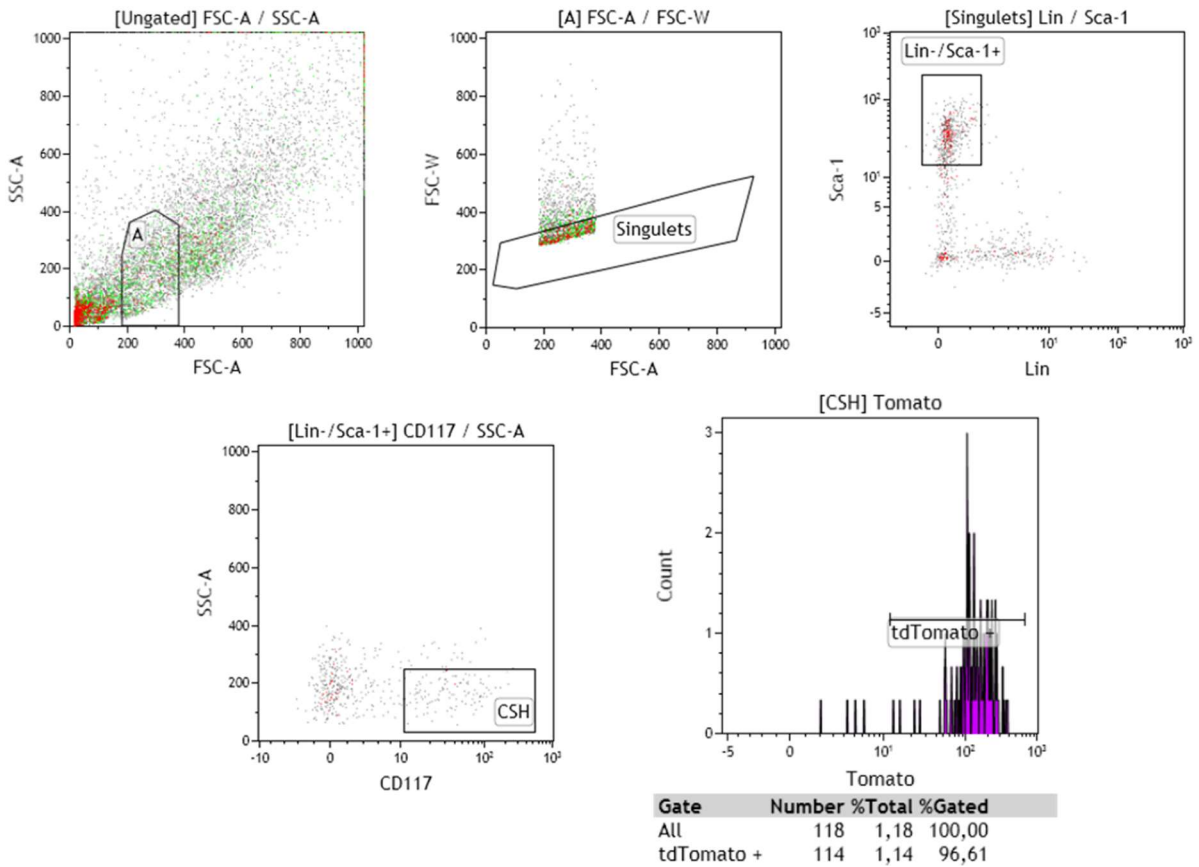


Figure 19 : stratégie de gating pour le tri par FACS des CSH dans la SVF de TA sous-cutané des souris mt/MG

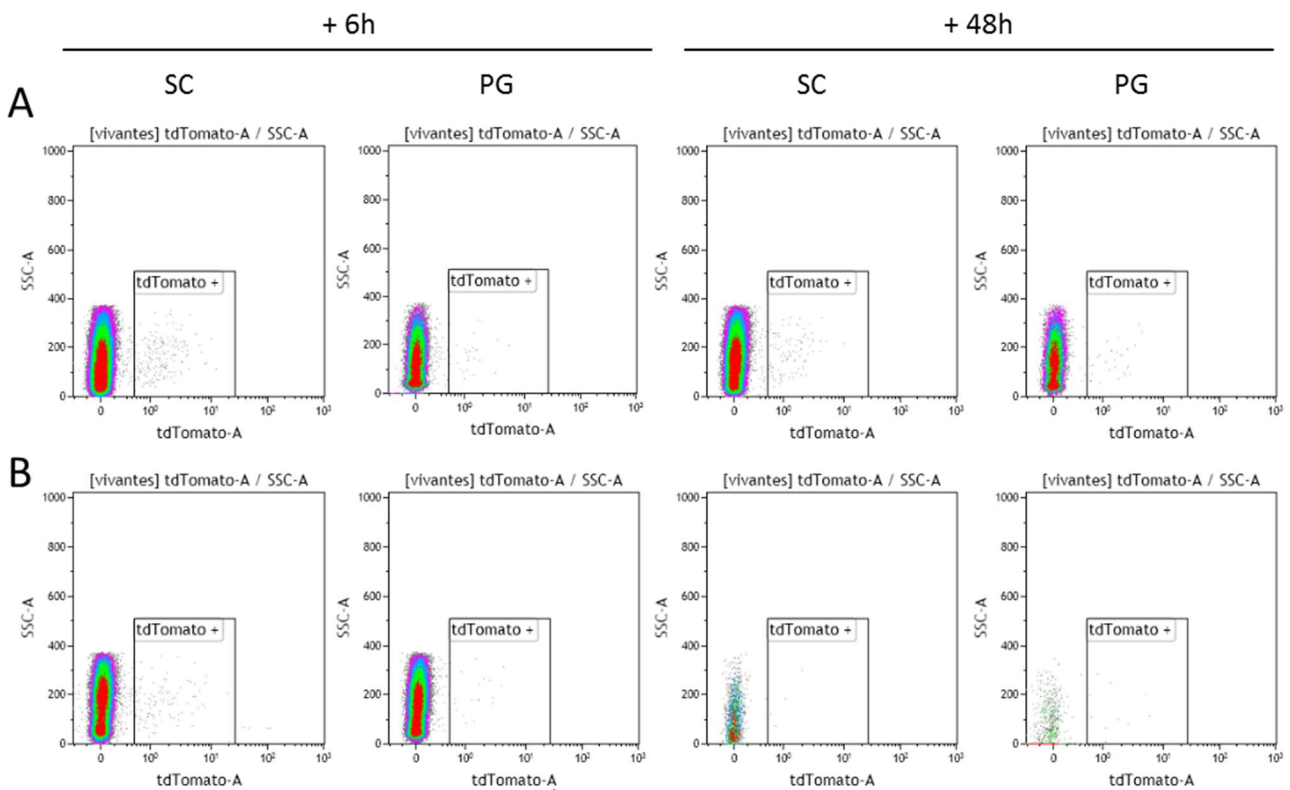


Figure 20 : Tests de greffes de CSH tdTomato⁺ en intra-veineux et analyse par cytométrie en flux de leur présence à court-terme dans le TA.

Analyse de la fluorescence tdTomato dans la SVF des TA sous-cutanés et péri-gonadiques 6h et 48h après injection de solvant (A) ou de 20 000 CSH (B) en intra-veineux dans le plexus rétro-orbitale à des souris irradiées léthalement.

présentée en Figure 19. Ces cellules expriment quasiment à 100% la protéine fluorescente rouge tdTomato (fig. 19). L'objectif initial était d'injecter ces CSH fluorescentes par voie intra-veineuse pour ensuite les localiser par microscopie confocale dans le TA et ainsi identifier les cellules de leur micro-environnement proche. Nous avons dans un premier temps injecté $20 \cdot 10^3$ CSH fluorescentes en i.v. dans des souris irradiées à dose létale, et nous avons recherché les CSH par cytométrie en flux dans la SVF des TA, et dans les organes hématopoïétiques 6h et 48h après l'injection, afin de valider la quantité de cellules et la cinétique d'observation. A ces deux temps, la fluorescence tdTomato basale retrouvée dans le TA des souris contrôles injectées avec le solvant (fig. 20A) n'est pas différente de celle quantifiée dans le TA des souris injectées avec les CSH fluorescentes (fig. 20B). La fluorescence tdTomato mesurée dans les tissus hématopoïétiques (MO, rate, ganglion, sang) des souris injectées avec des CSH fluorescentes n'est pas non plus différente de celle mesurée dans les organes hématopoïétiques des souris injectées avec le solvant (données non montrées). Ces résultats indiquent que dans ces conditions, nous ne sommes pas en mesure de détecter les CSH fluorescentes dans le TA 6h et 48h après injection dans la circulation.

Nous avons alors injecté les CSH fluorescentes directement dans le TA sous-cutané des souris. Là encore, nous n'avons pas été en mesure de détecter des cellules fluorescentes dans le TA injecté ou le dépôt contro-latéral 12h après l'injection (données non montrées). Les différentes conditions testées et les résultats de ces expériences de mise au point du tracking cellulaire des CSH après injection sont résumées dans le tableau 6.

Cette approche par *tracking* cellulaire consistant à localiser des CSH fluorescentes peu après leur injection n'a pas fonctionné. Il est possible que cet échec soit dû à un nombre de CSH injectées trop faible, à une cinétique inadaptée, ou encore à une dilution trop importante des CSH dans la circulation. Afin de localiser directement ces cellules *in situ*, nous avons mis alors en place une stratégie de localisation des CSH par des techniques d'immunofluorescence.

2) Approche par immunofluorescence

Les travaux de la littérature portant sur la niche des CSH médullaires se basent généralement sur une détection des CSH par leur phénotype. Les LT-CSH sont identifiées grâce au

Site d'injection	Nombre injecté	Temps d'analyse	Site analysé	Fluorescence tdTomato
IV	20 000	6h et 48h	SCAT, PGAT, MO, Rate, Ganglion inguinal, Sang	Non
Intra-SCAT	5 000	12h	SCAT injecté, SCAT controlatéral, PG	Non

Tableau 6 : Résumé des différentes conditions testées pour le tracking des CSH fluorescentes

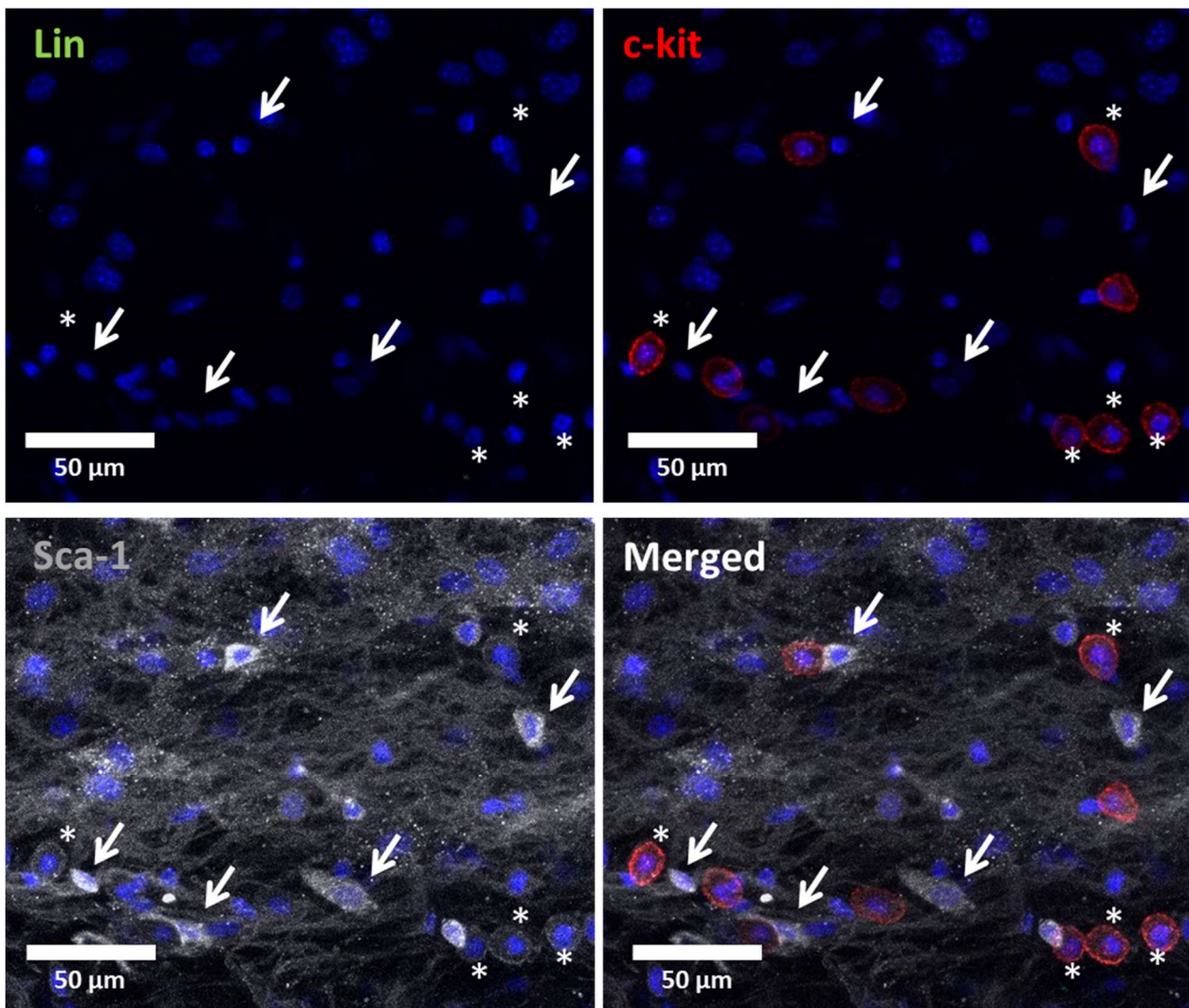


Figure 21 : Mise au point du triple marquage Lin/c-kit/Sca-1 par immuno-fluorescence sur tranches de TA inguinal

Le tissu adipeux inguinal a été fixé après prélèvement, des tranches de 300 µm d'épaisseur ont été réalisées. Après marquage les acquisitions ont été réalisées sur un microscope confocal Zeiss LSM 780. Les flèches représentent les cellules simple-positives Sca-1, les astérisques représentent les doubles positives c-Kit⁺/Sca-1⁺ Photos représentatives de 3 expériences.

phénotype CD48⁻/CD150⁺^{287,343} alors que les ST-CSH expriment le CD34⁺³⁴³. Les ST-CSH. Dans le TA, les CSH n'expriment pas le CD150³³⁶ et une partie d'entre elles sont CD34⁺ mais ce marqueur est également exprimé par les ASC, ce qui rend impossible son utilisation pour la localisation des CSH *in situ* dans le TA.

Nous avons dans un premier temps cherché à mettre au point un triple marquage c-Kit/Sca-1/Lin afin de localiser les CSH *in situ* sur la base de leur phénotype. Le marquage c-Kit est visualisé avec un anticorps secondaire couplé à un alexa594, le marquage Sca-1 avec un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome alexa647. Le marquage Lin est réalisé avec un cocktail d'anticorps de cytométrie (anti-B220, anti-Gr1, anti-CD3, anti-CD11b et anti-Ter119) couplés à du FITC. Nous avons réalisé ces différents marquages sur des tranches de 300µm de TA inguinal de souris. La figure 21 montre des photos représentatives d'acquisitions prises en microscopie confocale. Nous avons identifié des cellules c-Kit⁺ bien rondes, certaines d'entre elles étant Sca-1⁺ (astérisques sur la figure 21). Ces cellules doubles positives d'environ 20µm de diamètre sont disséminées un peu partout dans le tissu, souvent en contact avec une ou deux cellules c-Kit⁺/Sca-1⁺ qui pourraient être des ASC (flèches sur la figure 21). Elles ne s'organisent cependant pas en amas cellulaires comme on pourrait s'y attendre pour des cellules localisées dans une niche. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à identifier des cellules Lin⁺ dans le TA malgré les différentes conditions testées (concentration d'anticorps, temps d'incubation ; données non montrées).

En parallèle, compte tenu de l'existence d'une niche vasculaire dans la MO²⁷⁰, nous avons cherché à localiser ces cellules Lin⁻/c-Kit⁺/Sca-1⁺ par rapport à la vascularisation. L'utilisation d'une lectine biotinyllée, révélée par une streptavidine couplée à un fluorochrome permet une visualisation de la vascularisation, grâce à sa fixation aux glucides des cellules endothéliales. Nous avons pu observer certaines cellules c-kit⁺/Sca-1⁺ à proximité de capillaires (encadrées dans la figure 22D et zoomées en figure 22E), d'autres étaient localisés à distance des vaisseaux. Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence une localisation préférentielle de ces cellules au contact de la vascularisation.

Nous ne sommes donc pas en mesure de conclure sur l'identité des cellules double-positives c-kit⁺/Sca-1⁺ compte tenu de leur taille et d'un marquage Lin inefficace. En effet, les mastocytes et certaines cellules stromales présentent également ce phénotype.

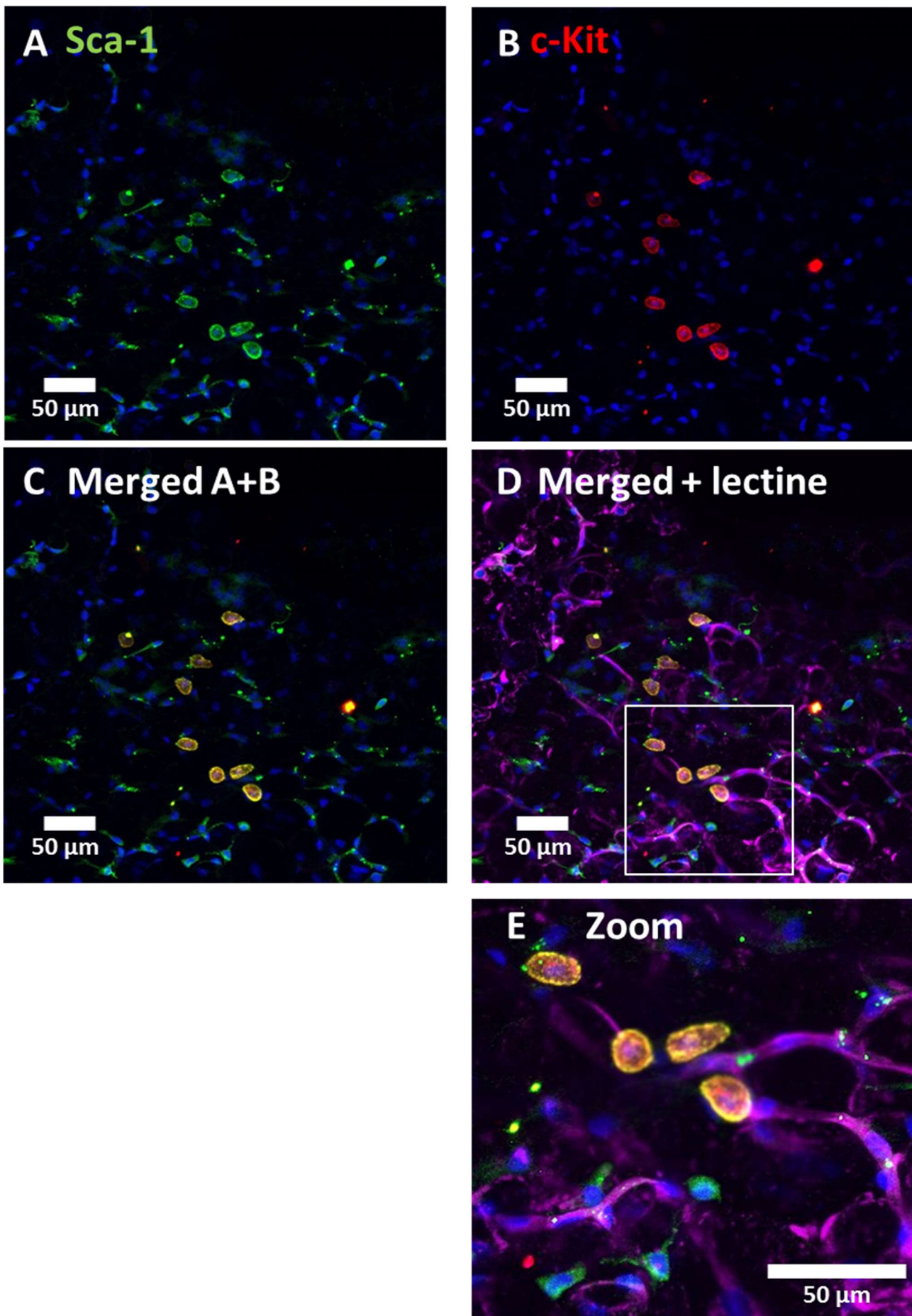


Figure 22 : Immuno-fluorescences Sca-1/c-kit/lectine sur tranches de TA inguinal.

Le tissu adipeux inguinal a été fixé après prélèvement, des tranches de 300 µm d'épaisseur ont été réalisées, après marquage les acquisitions ont été réalisées sur un microscope confocal Zeiss LSM 780.

A : Simple marquage Sca-1; **B** : simple marquage c-kit; **C** : superposition Sca-1/c-kit; **D** : superposition double marquage Sca-1/c-kit avec un marquage lectine; **E** : zoom sur la zone encadrée dans la photo D

3) Approche par microdissection et cytométrie

La stratégie de localisation des CSH sur tranches de TA par immunofluorescence n'ayant pas apporté les résultats escomptés, nous avons décidé d'utiliser une stratégie d'analyse par cytométrie en flux après microdissection de différentes zones du TA. Le laboratoire a récemment montré que le TA sous-cutané murin est divisé en deux zones : une zone centrale structurée en unités fonctionnelles appelées lobules, contenant notamment des adipocytes beiges ayant une activité thermogénique, et une zone périphérique ne contenant que des adipocytes blancs. Ces deux zones ont été respectivement appelées SLA et NSLA⁵⁵ (fig. 23A). La SVF de la SLA contient une proportion plus importante de CSH que la SVF de la NSLA ($0,56\% \pm 0,09$ vs. $0,24\% \pm 0,03$; fig. 23B). Afin d'éviter un biais du résultat en pourcentage par de possibles différences des autres populations cellulaires, nous avons également quantifié les CSH en nombre de cellules par gramme de tissu. Nous observons également un plus grand nombre de CSH dans la SLA par rapport à la NSLA ($9.5.10^3 \pm 1.3.10^3$ vs $4,2.10^3 \pm 0,4.10^3$; fig.23C).

Ces résultats suggèrent que les CSH ne sont pas réparties de manière homogène au sein du dépôt sous-cutané mais seraient localisées préférentiellement dans la région SLA au centre du TA. Nous avons alors fait l'hypothèse que le nombre de CSH dans la SLA pourrait être modifié dans des situations physiologiques dans lesquelles l'homéostasie de la SLA serait perturbée.

La SLA est une zone composée majoritairement d'adipocytes de type beige. L'expression d'UCP-1 dans ces adipocytes peut être activée en réponse à une exposition au froid des animaux⁵⁵. Cette induction d'UCP-1 peut également être induite par une stimulation β_3 -adrénergique, et est corrélé à une activité thermogénique grâce à une induction de la lipolyse⁴⁸. La NSLA quant à elle est une région riche en adipocytes blancs, spécialisée dans le stockage des lipides sous forme de triglycérides et leur libération sous forme d'AG après stimulation adrénérergique. Le *browning* de la SLA a été induit par une exposition des souris au froid pendant 7 jours ou par des injections intra-péritonéales quotidiennes d'un agoniste β_3 -adrénergique pendant 10 jours³⁴⁴. L'inhibition de l'expression d'UCP-1 dans la SLA a été induite par une exposition des souris pendant 21 jours à thermoneutralité (33°C). Nous avons également utilisé des souris UCP-1 KO qui ne présentent pas d'adipocytes beiges dans

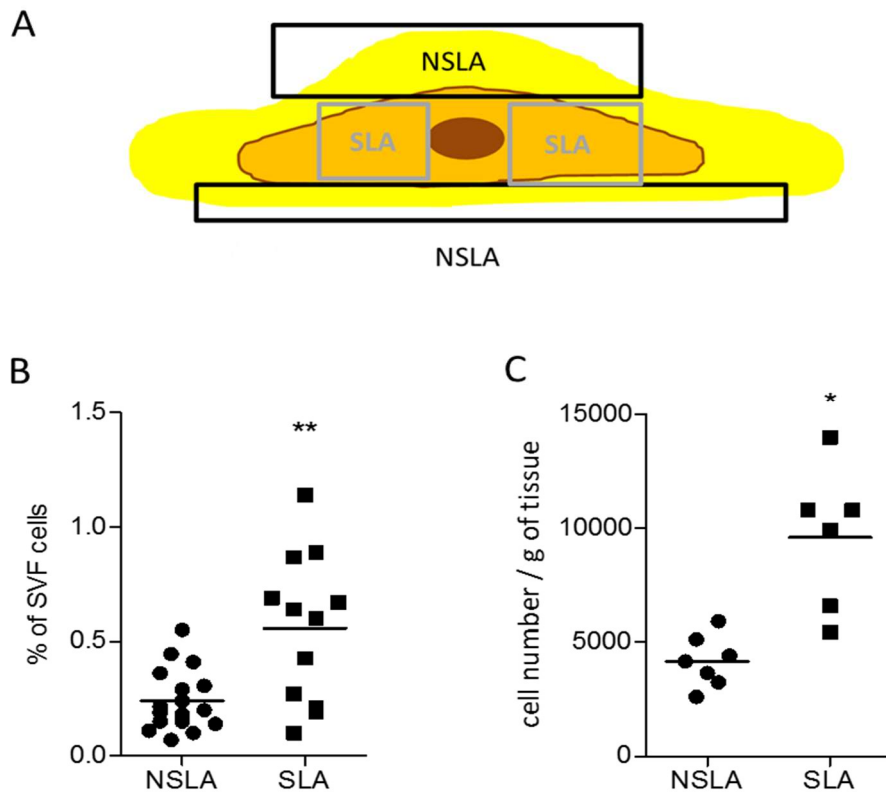


Figure 23 : Quantification des CSH dans les zones NSLA et SLA

Schéma des zones NSLA et SLA prélevées par microdissection sur le TA sous-cutané, la SLA est prélevée de part et d'autre du ganglion, la NSLA est prélevée à la périphérie du tissu (A). Pourcentage et nombre par gramme de CSH dans la NSLA (B) et dans la SLA (C).

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$

la SLA. Enfin, nous avons également étudié des souris mises sur régime gras pendant 12 semaines, qui présentent une inhibition du *browning* du WAT³⁹ ainsi qu'une hypertrophie des adipocytes de la SLA et de la NSLA (données internes du laboratoire).

L'activation de la SLA par le froid ou l'agoniste β_3 -adrénergique induit diminution significative du nombre de CSH par gramme de tissu dans la SLA (fig. 24A). L'inhibition des adipocytes beiges induit également une diminution significative du nombre de CSH par gramme dans la SLA. En revanche, dans ces situations, aucune modification significative du nombre de CSH par gramme de tissu n'est observée dans la NSLA (fig. 24B). En résumé, le nombre de CSH par gramme de tissu ne varie que dans la SLA, mais ces variations ne sont pas corrélées au niveau d'expression d'UCP-1 (fig. 24C). Chez la souris obèse en revanche, le nombre de CSH par gramme de TA est diminué dans la SLA et dans la NSLA (fig. 24D).

Ces résultats suggèrent qu'en situation d'homéostasie, le tissu adipeux beige de la SLA est un environnement favorable à la présence de CSH, ce qui pourrait s'expliquer par une meilleure survie, une plus grande prolifération ou un meilleur ancrage de ces cellules. Quelle que soit la situation activatrice ou inhibitrice de l'activité des adipocytes beiges, le nombre de CSH est diminué dans la SLA. Cela suggère qu'il existe des mécanismes complexes de régulation de l'activité des CSH dans la SLA. De plus, l'hypertrophie des adipocytes diminue le nombre de CSH dans les deux zones, suggérant que les adipocytes hypertrophiés constituent un environnement défavorable pour les CSH.

Discussion

Nos différentes approches pour localiser les CSH dans le TA, que ce soit directement *in situ* par immuno-fluorescence ou par *tracking* cellulaire n'ont pas permis de localiser ces cellules.

La localisation des CSH médullaires marquées *ex vivo* puis ré-injectées est une approche expérimentale couramment utilisée dans la littérature. Ce marquage est généralement réalisé à l'aide de colorants fluorescents comme le CFSE²⁶³ ou le DiR²⁶⁴. De tels protocoles ont été envisagés par le laboratoire mais les expériences préliminaires réalisées n'ont pas été concluantes car nous n'avons pas pu localiser les CSH dans le TA après injection. Nous avons donc développé un élevage de souris mT/mG, pour réaliser des expériences de

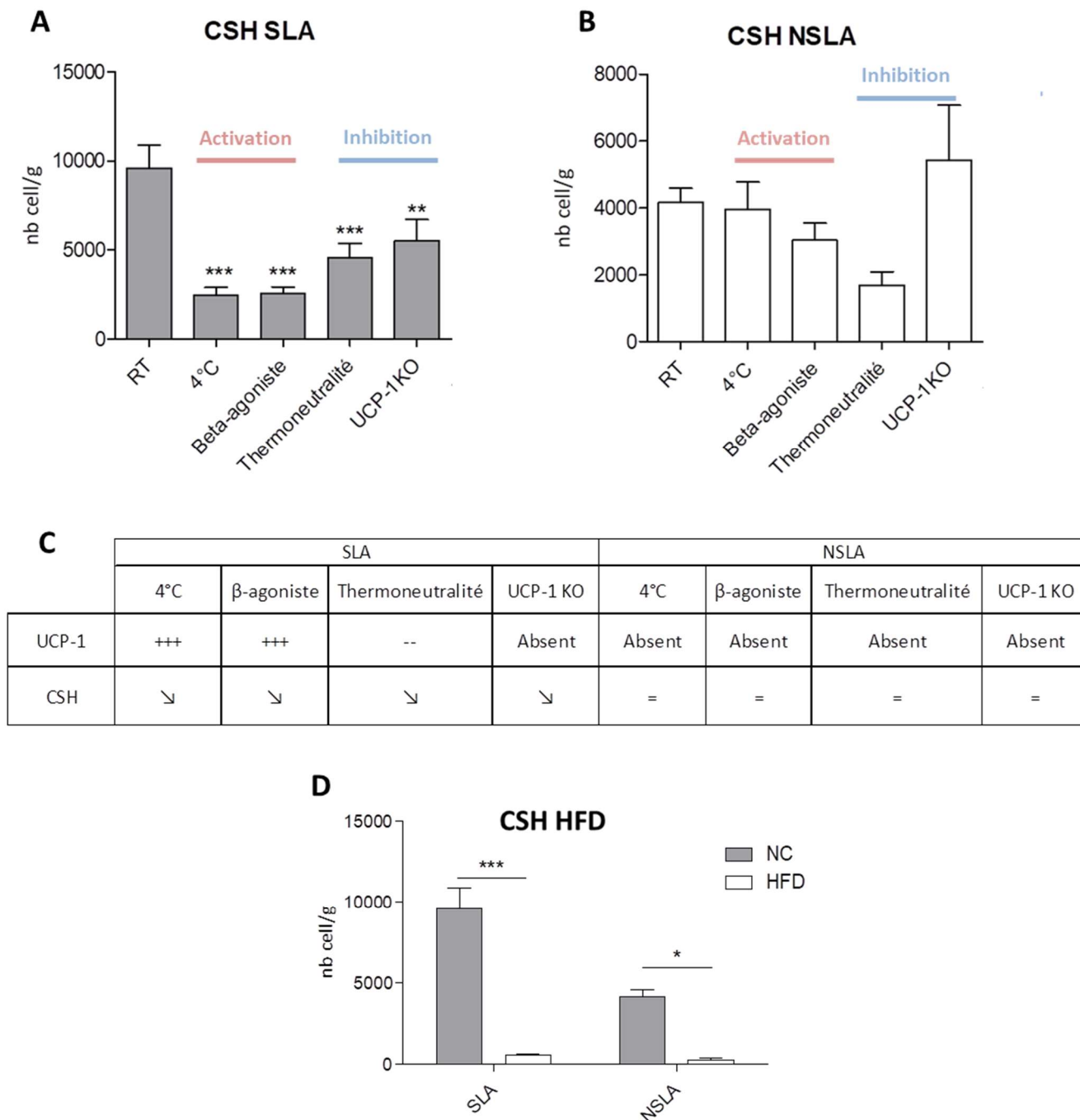


Figure 24 : Effet de l'activation/inhibition du *browning* sur les quantités de CSH dans les zones NSLA/SLA

Quantification par cytométrie du nombre de CSH par gramme de TA dans les zones SLA (A) et NSLA (B) en réponse à des stimulations activatrices et inhibitrices du *browning*. Résumé des variations de CSH dans les deux zones en réponse aux différentes stimulations activatrices et inhibitrices de l'expression d'UCP-1 dans les adipocytes beiges (C). Quantification des CSH dans la SLA et la NSLA du SCAT après 12 semaines de régime NC ou HFD 45% (D)

* : $p < 0,05$; \$\$: $p < 0,01$ vs RT ; \$\$\$: $p < 0,001$ vs RT

tracking cellulaire comme cela avait été fait dans la MO²⁶⁷. Nous n'avons pas réussi à retrouver de CSH fluorescentes par cytométrie en flux dans les TA, ce qui suggère qu'il aurait ensuite été difficile de les localiser directement par microscopie.

Notre approche de triple marquage Lin / Sca-1 / c-Kit s'est confronté à un échec de la mise au point du marquage Lin. Ce marquage a souvent été utilisé en cytométrie en flux, mais n'a jamais été développé pour de la microscopie. Nous avons cherché à utiliser un anticorps de FACS couplé au FITC, mais malgré différentes conditions testées nous n'avons pas été en mesure de valider sa fonctionnalité. De nouvelles méthodes de détection de cet ensemble d'antigènes exprimé par les cellules matures devront être mises au point pour localiser les CSH *in situ* dans le TA.

Notre approche de cytométrie en flux après micro-dissection de la SLA et de la NSLA du TA sous-cutané a permis de caractériser une localisation préférentielle des CSH dans la région SLA du TA comportant des adipocytes beiges suggérant que ceux-ci puissent jouer un rôle dans le contrôle des CSH du TA. Les résultats obtenus ne nous permettent cependant pas de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

Nous avons également observé une diminution du nombre de CSH dans la SLA et dans la NSLA chez des souris obèses sous régime HFD. Ces résultats suggèrent que des adipocytes hypertrophiés ont un effet délétère sur le nombre de CSH. Dans la MO, il a en été montré que les adipocytes médullaires peuvent stimuler la différenciation myéloïde des CSH (cf. introduction, Chapitre I, partie I. 4). On peut alors faire l'hypothèse que la diminution du nombre de CSH observé dans la SLA et dans la NSLA du SCAT lorsque les adipocytes sont hypertrophiés résulte d'une augmentation de la différenciation des CSH. Il est intéressant de noter qu'en conditions physiologiques et à température ambiante, la taille des adipocytes de la NSLA est supérieure à celle de la SLA⁵⁵. La localisation préférentielle des CSH dans la SLA pourrait être due soit à un effet délétère des adipocytes hypertrophiés de la NSLA sur la quiescence ou la survie des CSH, soit à la stimulation de la différenciation des CSH, diminuant par conséquent le nombre de CSH dans cette zone.

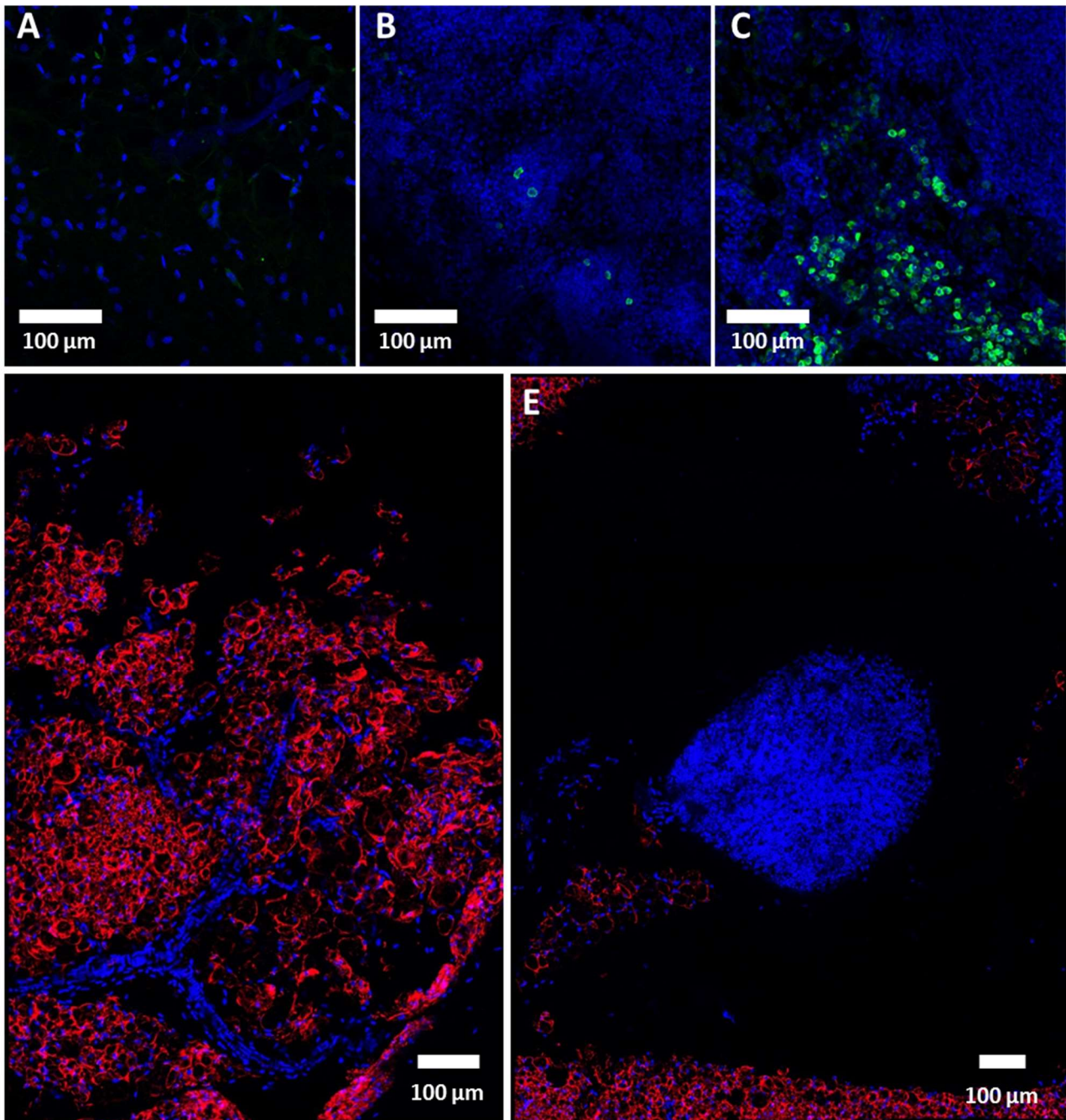


Figure 25 : Mise au point du double marquage CD45.1/CD45.2

Marquage CD45.2 : contrôle avec anticorps secondaire FITC seul sur le tissu adipeux (A) et le ganglion lymphatique (B) et marquage avec anticorps primaire et secondaire sur le ganglion (C). Marquage CD45.1 : Contrôles avec streptavidine alexa 647 (D) et marquage avec anticorps biotinylé et streptavidine (E)

II. Localisation *in situ* de la descendance des CSH du TA.

Dans la MO, il a été montré que les macrophages CD168⁺ produits localement participent à la niche hématopoïétique. Ils sont notamment retrouvés sous forme d'amas et collaborent avec les CSM Nestin⁺ pour maintenir les CSH dans leur niche²⁹⁵. Devant l'échec de nos tentatives de localisation des CSH dans le TA, nous avons émis l'hypothèse que localiser leur descendance nous permettrait éventuellement d'identifier des zones où ces cellules sont majoritairement produites. Ces zones correspondraient alors à des foyers hématopoïétiques dans lesquels les CSH du TA se logeraient. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé du TA sous-cutané issus de souris chimères 2 mois après la transplantation de CSH de TA, ce qui permet après reconstitution hématopoïétique d'étudier la descendance des CSH greffées. Dans ce modèle, les CSH de TA de souris CD45.1 sont co-injectées avec des cellules totales de MO de souris CD45.2. L'expression du CD45.1 ou du CD45.2 par les cellules immunitaires permet de connaître l'origine de ces cellules (respectivement du TA ou de la MO). Nous avons cherché à développer un double marquage CD45.1/CD45.2 sur les TA de ces souris chimères. Les anticorps commercialisés pour ces marqueurs membranaires sont développés uniquement pour la cytométrie en flux à partir de splénocytes de souris immunisées, et possèdent donc tous deux des fragments constants de souris, empêchant la réalisation de marquages secondaires simultanés avec des anticorps secondaires. Dans le but de réaliser les deux marquages de manière séquentielle, nous avons développé dans un premier temps le marquage avec un anticorps anti-CD45.2 purifié, révélé par un anticorps anti-IgG de souris couplé à un fluorochrome alexa 488, puis dans un second temps le marquage avec un anticorps anti-CD45.1 couplé à une biotine, révélé par une streptavidine couplée à un fluorochrome alexa 594.

Nous avons initialement mis au point les conditions d'utilisation des anticorps sur des cytopins de cellules de MO de souris CD45.2 et CD45.1 (données non montrées). Les marquages CD45.2 et CD45.1 ont ensuite été testés respectivement sur des TA de souris CD45.2 et CD45.1. Pour le marquage CD45.2, l'anticorps secondaire seul montre qu'il y a très peu de marquage non spécifique dans le tissu (fig. 25A-B). Avec l'anticorps primaire et l'anticorps secondaire, on observe un marquage CD45.2 dans le ganglion lymphatique de souris CD45.2 (fig. 25C). Cependant de façon surprenante, la majorité des cellules du ganglion n'est pas marquée alors que les ganglions lymphatiques sont des organes

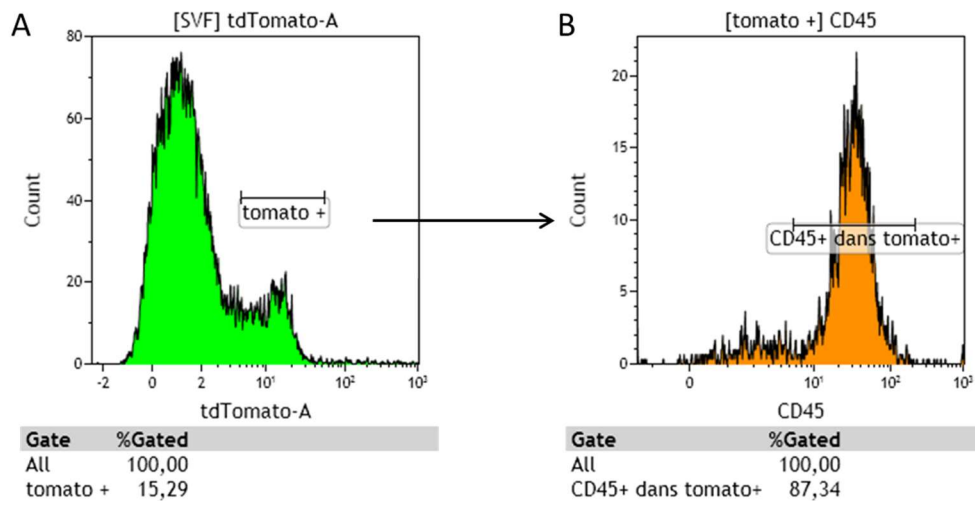


Figure 26 : Validation de la prise de greffe des CSH de TA mT/mG

Les souris WT irradiées à dose létale ont été co-injectées avec 2.10^3 CSH de TA de souris mT/mG, et 2.10^6 cellules de MO totale. 2 mois après transplantation, la fluorescence tomato et l'expression du marqueur CD45 dans la SVF ont été quantifiés par cytométrie en flux afin de valider la prise de greffe. Histogrammes représentatifs de cytométrie en flux de la SVF de TA sous-cutané. **A**: fluorescence tdTomato totale dans la SVF et **B**: marquage CD45 dans les cellules tdTomato⁺.

lymphoïdes secondaires composés essentiellement de cellules immunitaires CD45⁺. Ces résultats suggèrent que si le marquage CD45.2 semble spécifique, son efficacité dans les différentes conditions que nous avons testées n'est pas optimale.

Pour le marquage CD45.1, nous avons observé un très fort marquage non spécifique dans le TA avec la streptavidine seule (fig. 25D). Avec l'anticorps CD45.1 biotinylé et la streptavidine nous observons également un très fort marquage non spécifique et aucun signal détectable dans le ganglion lymphatique (fig. 25E). Cela suggère que le marquage CD45.1 dans le TA n'est ni fonctionnel ni spécifique dans nos conditions. Le marquage non spécifique de la streptavidine pourrait s'expliquer par la présence de biotines endogènes dans le TA³⁴⁵. Nous avons testé différentes méthodes de blocage des biotines endogènes du TA afin d'améliorer la spécificité du marquage CD45.1 dans le TA de souris CD45.1. Le marquage non spécifique de la streptavidine seule a pu être réduit mais nous n'avons cependant pas réussi à obtenir de marquage de cellules CD45.1⁺ dans le ganglion lymphatique des souris CD45.1 (données non montrées).

Nous avons alors cherché à localiser la descendance des CSH du TA après reconstitution hématopoïétique en utilisant des CSH provenant du TA de souris mT/mG précédemment décrites. L'analyse en cytométrie en flux montre qu'on retrouve des cellules tdTomato⁺ dans la SVF des souris receveuses 2 mois après la greffe (fig. 26A). Conformément aux résultats attendus, ces cellules tdTomato⁺ sont en grande majorité CD45⁺ (fig. 26B) et correspondent donc à la descendance des CSH de TA injectées.

Le TA sous-cutané de ces souris chimères a ensuite été utilisé pour réaliser des expériences d'imagerie. Avant sacrifice, les souris ont reçu une injection intraveineuse de lectine biotinylée suivie de streptavidine couplée à un alexa488 afin de marquer la vascularisation et de visualiser les structures lobulaires de la SLA. La streptavidine est ici injectée dans la circulation et s'accroche à la lectine biotinylée fixée aux cellules endothéliales, elle n'a donc pas accès aux biotines endogènes du TA et ne produit pas de marquage non spécifique. La figure 27A montre un plan large de ce tissu. Grâce au marquage de la vascularisation on peut notamment discerner les structures caractéristiques en lobules de la SLA (astérisques) et l'absence de lobules caractéristique de la NSLA (étoiles). La figure 27B montre un zoom sur une structure caractéristique des vaisseaux lymphatiques. Des cellules fluorescentes rouges

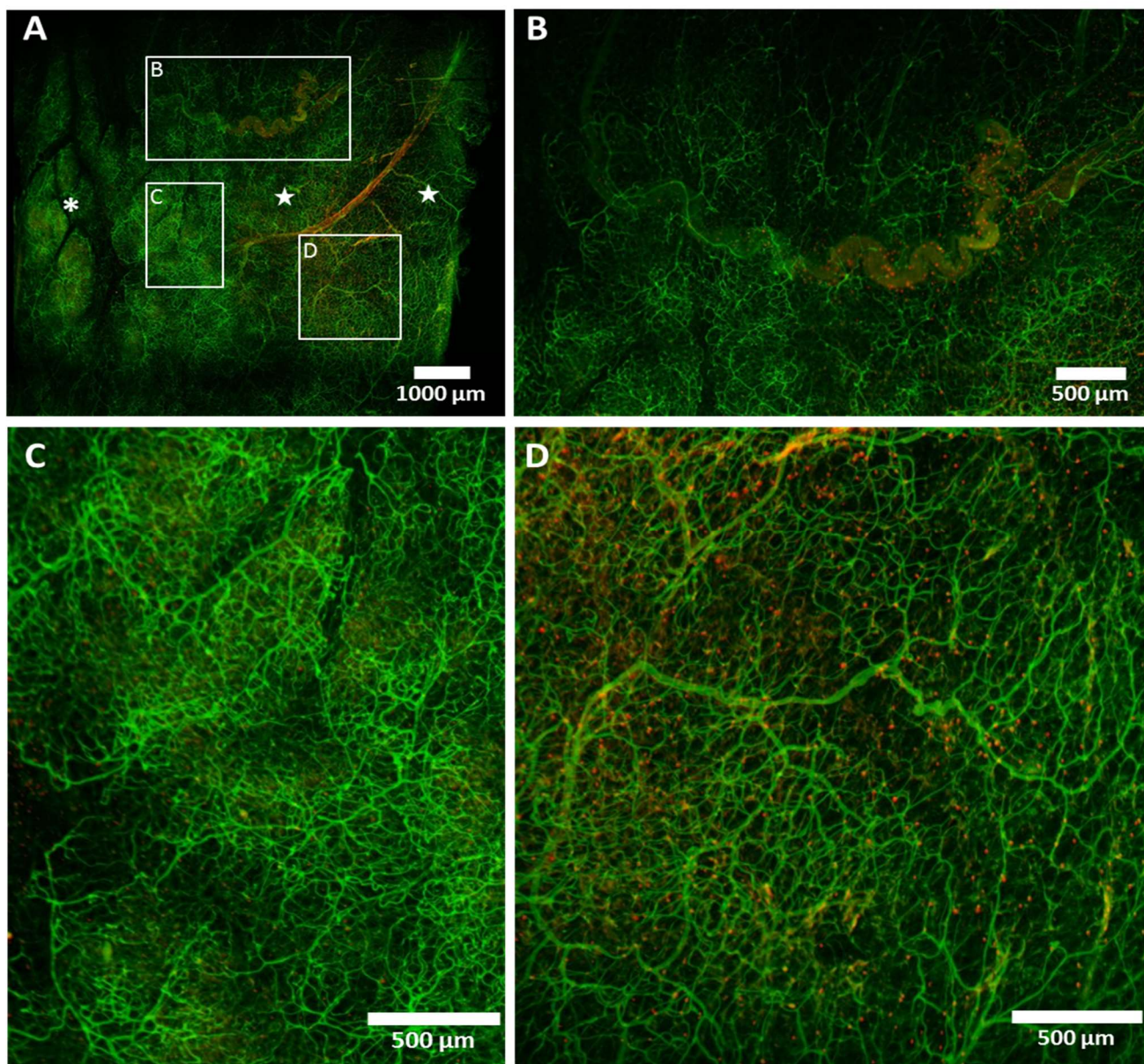


Figure 27 : Images de tissu adipeux sous-cutané après transpiration de souris receveuses de CSH mT/mG 2 mois après greffe obtenus avec un microscope confocal macro-SPIM

Avant sacrifice, les souris ont été injectées en intra-veineuse avec de la lectine biotinyllé, puis de la streptavidine couplé alexa 488 afin de marquer la circulation.

Vert: cellules endothéliales ; rouge : descendance des CSH mT/mG injectées.

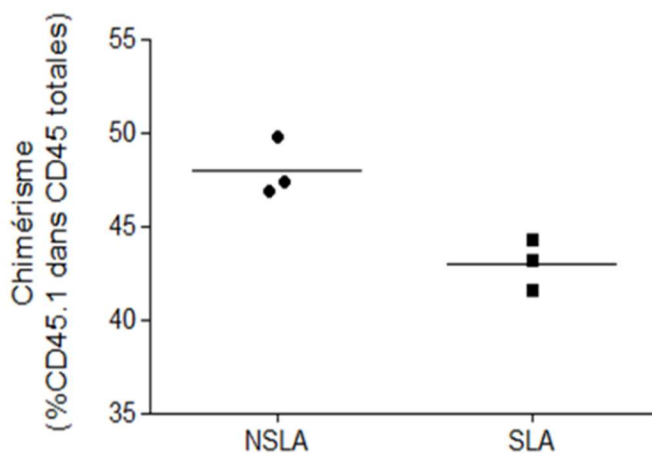


Figure 28 : Chimérisme dans la NSLA et la SLA

Des souris CD45.2 irradiées létalement ont été co-transplantées avec des CSH de TA et des cellules de MO provenant respectivement de souris CD45.1 et CD45.2. Le chimérisme CD45.1/CD45 total a été quantifié dans la SLA et la NSLA des souris chimères 2 mois après leur reconstitution hématopoïétique.

sont retrouvées à proximité de ce vaisseau lymphatique. Les figures 27C et 27D sont des zooms sur les régions SLA et NSLA respectivement. Bien qu'on puisse observer quelques cellules dans la région SLA (figure 27C), il semblerait que la densité cellulaire soit bien plus importante dans la région NSLA (figure 27D). Ces résultats suggèrent que la descendance des CSH du TA se localiserait préférentiellement dans la région NSLA non lobulisable du TA sous-cutané. Devant la faible résolution de l'objectif 4x utilisé, il est difficile d'identifier des clusters de cellules pouvant participer à une niche hématopoïétique, l'utilisation d'un objectif 10x sur le microscope SPIM permettrait éventuellement de mieux caractériser la répartition de la descendance des CSH dans la NSLA. Cette expérience n'a pu être réalisée qu'une fois sur deux animaux, ces résultats doivent donc être reproduits pour valider ces conclusions. Néanmoins, nous avons également réalisé des expériences de microdissection suivies d'une analyse en cytométrie en flux afin de valider la localisation préférentielle dans la NSLA de la descendance des CSH. Les résultats montrent une tendance à un chimérisme plus important dans la NSLA comparé à la SLA (fig. 28), ce qui semble confirmer les résultats obtenus en imagerie.

Discussion

En conclusion, les cellules immunitaires dérivées des CSH de TA semblent se localiser plutôt dans la NSLA, contrairement aux CSH qui semblent être localisées préférentiellement dans la SLA (cf. partie 1 du présent chapitre). Nous pouvons envisager plusieurs explications à ces résultats : 1) contrairement à la niche hématopoïétique de la MO, les cellules immunitaires produites par les CSH de la SLA ne font pas partie de la niche hématopoïétique des CSH et ne permettraient pas de localiser les CSH, 2) La SLA constituerait un environnement permettant la quiescence des CSH, au contraire de la NSLA qui favoriserait leur différenciation. En accord avec cette hypothèse le laboratoire a montré que l'expression de la leptine est supérieure dans la NSLA par rapport à la SLA⁵⁵, et qu'elle induit une différenciation myéloïde des CSH de MO³⁴⁶. 3) Les cellules produites par les CSH de la SLA migreraient vers la NSLA, mais il n'y a pour l'instant aucune étude ayant montré une production supérieure de facteurs chimiotactiques dans la NSLA qui pourraient attirer les cellules immunitaires du TA produites dans la SLA. Dans la MO, il existe différentes niches vasculaires selon le type de péricytes

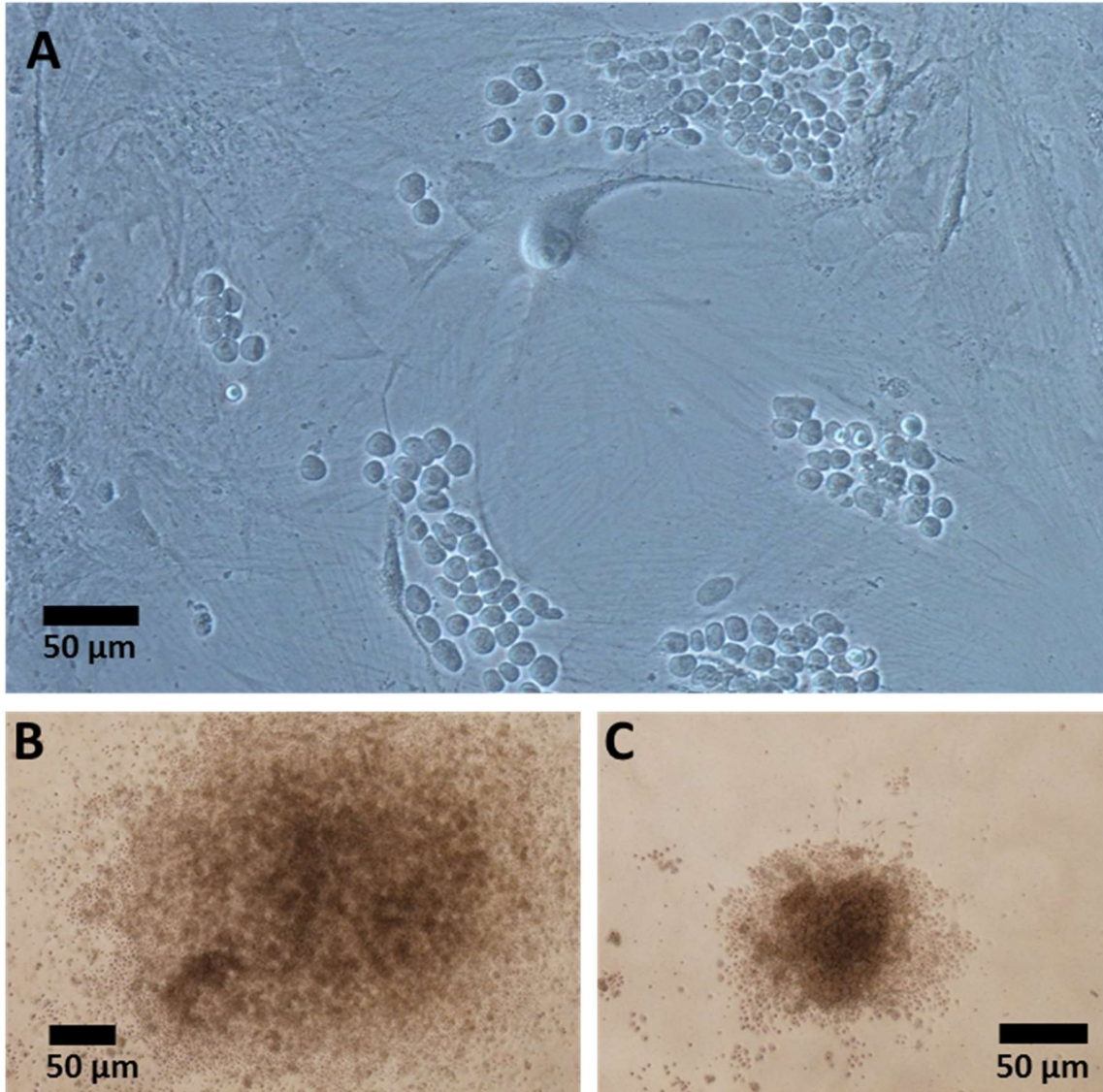


Figure 29 : Co-culture de CSH de MO sur ASC

A : cobblestones formés par les CSH médullaires dans le stroma d'ASC après 1 semaine de co-culture. **B** et **C** : photos représentatives de clones CFU-GM formés en milieu semi-solide par les progéniteurs produits par les CSH en co-culture

associés aux cellules endothéliales (cf Introduction, Chapitre 2, partie II. 3). Dans le TA, l'organisation structurelle des vaisseaux est différente entre la SLA et la NSLA (données internes du laboratoire). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse qu'il existerait également une niche vasculaire différente entre la SLA et la NSLA. La caractérisation d'éventuelles différences au niveau sécrétoire entre les vaisseaux de la SLA et ceux de la NSLA sera nécessaire afin de valider cette hypothèse.

En parallèle de cette approche par immuno-fluorescence, nous avons mené une approche *in vitro* afin d'étudier les acteurs cellulaires, et moléculaires du TA qui seraient capables de soutenir l'activité hématopoïétique des CSH du TA.

III. Caractérisation *in vitro* de la fonctionnalité de la niche

Afin d'étudier la fonctionnalité de la niche, nous avons utilisé la technique de co-culture selon la méthode de Dexter²⁵⁸. Brièvement, cette technique consiste à ensemercer des CSH non-adhérentes sur une couche de cellules nourricières adhérentes, souvent une lignée de cellules stromales médullaires. La culture est maintenue durant 5 semaines à 33°C. Dans ces conditions, les CSH se nichent dans la couche de cellules stromales pour produire des progéniteurs hématopoïétiques. Après 5 semaines de culture, les progéniteurs présents dans le surnageant sont récupérés puis ensemercés en milieu clonogénique semi-solide de méthylcellulose et vont former des colonies. L'analyse des clones 2 semaines plus tard permet d'analyser à posteriori l'activité hématopoïétique des CSH ensemercées initialement dans la co-culture.

Il a été montré par le laboratoire que les cellules stromales du TA (ASC) humain sont capables de supporter l'activité hématopoïétique des CSH de MO *in vitro* en induisant leur prolifération, leur différenciation et leur capacité de reconstitution de l'hématopoïèse à long-terme¹²². Nous avons donc testé la capacité de support de l'activité hématopoïétique des CSH du TA par les ASC. Nous avons dans un premier temps validé notre modèle de culture avec des CSH triées à partir de MO. Après une semaine de co-culture à 33°C, nous avons observé des *clusters* de cellules au sein du tapis d'ASC (fig. 29A). Ces structures pavimenteuses appelées *cobblestone* sont caractéristiques de cellules souches/progénitrices

en co-culture *in vitro*. Après 5 semaines de culture à 33°C, les progéniteurs présents dans le surnageant ont été ensemencés en milieu semi-solide. Conformément aux résultats attendus, après deux semaines en méthyl-cellulose nous avons détecté des clones hématopoïétiques de morphologie caractéristique des CFU-GM (Colony Forming Unit – Granulocyte/Monocyte) (rond, noirs au centre avec des cellules périphériques bien rondes et réfringentes, et de tailles variables selon leurs stades de développement) (fig. 29B-C). Notre système de co-culture avec un stroma d'ASC fonctionne donc bien dans les conditions standards avec des CSH de MO. Les tentatives de co-cultures réalisées dans les mêmes conditions avec des CSH triées à partir de TA ne nous ont pas permis d'observer de *cobblestones* au sein du tapis d'ASC, ni de clones hématopoïétiques en méthylcellulose. Nous avons testé différentes densités d'ensemencement de CSH (5.10^3 , 10.10^3 , 20.10^3 et 40.10^3 cellules/mL), la durée des cultures a été augmentée (jusqu'à 7 semaines) et la température de culture modifiée, de 33°C à 37°C. Ces tentatives se sont soldées par des échecs (données non montrées) malgré les différentes conditions testées. Néanmoins, ces résultats confirment l'idée selon laquelle les CSH de TA sont différentes de celles de la MO³³⁶.

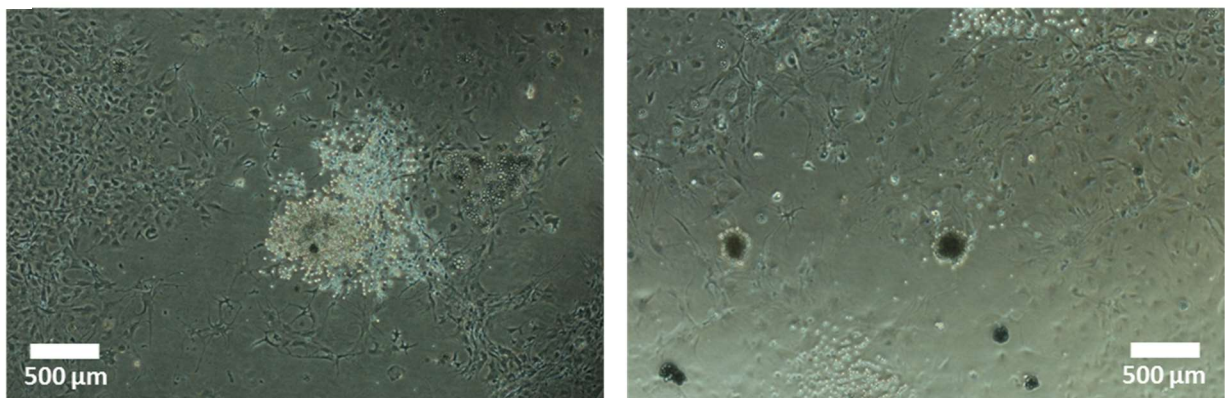
Nous avons alors utilisé un système de culture à court terme, permettant d'obtenir des clones hématopoïétiques à partir de SVF de TA, déjà utilisé au laboratoire¹⁴⁴. Brièvement, ce système consiste à ensemencer directement 30.10^3 cellules de SVF totale par mL de méthylcellulose, un milieu semi-solide supplémenté en facteurs de croissance et cytokines hématopoïétiques (SCF, IL-3, IL-6, EPO). Après 2 semaines, l'analyse du nombre et du type de clones produits permet de quantifier le potentiel clonogénique hématopoïétique de la SVF du TA. Nous avons voulu alors tester l'effet d'intermédiaires métaboliques qui pourraient *a priori* être présents en quantités différentes dans la SLA et dans la NSLA.

La SLA est en effet une zone avec des adipocytes beiges ayant une forte activité oxydative, cette activité permet notamment l'épuration de du lactate en le consommant⁵⁶. Nous avons donc testé l'effet de concentrations croissantes de lactate. De plus, nos données de transcriptomique montrent que les CSH du TA expriment le CD36, un récepteur scavenger présent à la surface des macrophages et permettant la phagocytose des LDL (*Low Density Lipoprotein*) modérément oxydées. L'effet de ces LDL oxydées a donc été envisagé. Enfin,

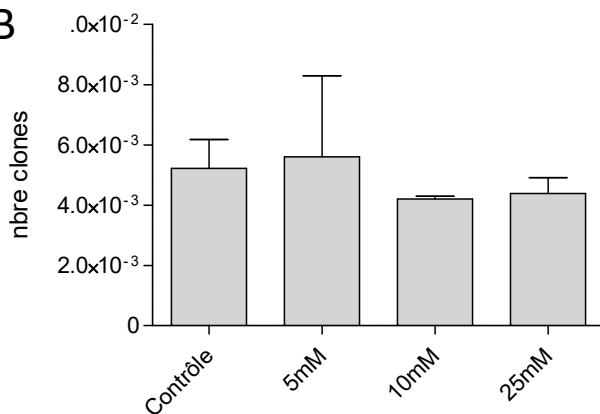
compte tenu des résultats obtenus avec le régime HFD, nous avons envisagé un rôle possible des AG.

Les traitements avec du lactate, des LDL modérément oxydées ou des AG (palmitate ou oléate) ont été réalisés dès l'ensemencement des cellules dans la méthylcellulose. Après deux semaines, nous avons observé la présence de clones hématopoïétiques dans la SVF de TA (fig. 30A). Les traitements au lactate, aux LDL modérément oxydées ou aux AG ne semblent pas modifier le potentiel clonogénique de la SVF de TA *in vitro* (fig. 30B). Ces molécules ne semblent donc pas être impliquées dans le contrôle de l'activité des CSH du TA par leur environnement.

A



B



C

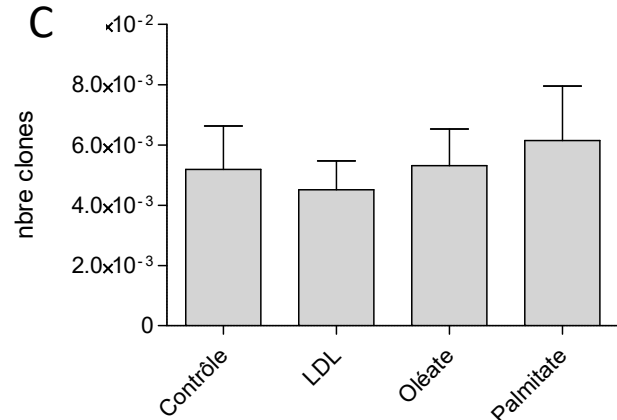


Figure 30 : Caractérisation et quantification des clones hématopoïétiques produits par la SVF en milieu semi solide en réponse à différents traitements.

A : photos représentatives de clones hématopoïétiques en méthylcellulose ; **B** : potentiel clonogénique (nombre de clone / cellule) en réponse à des doses croissantes de lactate après ensemencement de $30 \cdot 10^3$; **C** : potentiel clonogénique en réponse à un traitement avec des LDL oxydées ou des AG.

Conclusion/Perspectives

L'ensemble de ce travail nous a permis de montrer que les CSH du TA sont majoritairement localisées dans la SLA, tandis que leur descendance est majoritairement localisée dans la NSLA. Ces résultats suggèrent que la SLA serait une zone favorable aux CSH, en agissant par exemple sur leur survie, leur quiescence ou leur ancrage dans le TA sous-cutané, et/ou que la NSLA favoriserait leur différenciation. Nous montrons également que les adipocytes beiges pourraient participer au maintien de la quiescence des CSH dans la SLA par un mécanisme complexe que nous n'avons pas été en mesure de caractériser. En revanche nous n'avons pas réussi à caractériser la niche des CSH du TA ni au niveau cellulaire par immunofluorescence, ni au niveau moléculaire par différentes stratégies de culture cellulaire.

En se basant sur les différences caractérisées par le laboratoire entre SLA et NSLA⁵⁵, nous pouvons cependant faire l'hypothèse que la SLA et la NSLA sont deux environnements radicalement différents. Ces deux zones pourraient alors être envisagées comme deux niches potentielles qui exerceraient des effets très différents sur les CSH. Il serait intéressant d'étudier plus précisément ces deux zones en s'intéressant à d'éventuelles différences de productions de facteurs de croissance hématopoïétiques entre les deux zones. Des ASC ont été triées à partir de SVF de NSLA et de SLA. Des analyses transcriptomiques réalisées au laboratoire sur ces ASC montrent que les ASC de la SLA expriment plus fortement la molécule d'adhérence VCAM-1 que les ASC de la NSLA. A l'inverse, les ASC de la NSLA expriment plus fortement le *Leukemia inhibitory Factor* (LIF) (données non montrées). VCAM-1 est impliqué dans le *homing* et le maintien de la quiescence des CSH de la MO dans la niche vasculaire³⁴⁷, LIF est un facteur soluble impliqué dans les étapes de différenciation précoce des CSH de la MO²⁰². Ces données suggèrent que les ASC de la SLA et de la NSLA pourraient contrôler les CSH du TA de façon différente. Les ASC de la SLA favoriseraient la quiescence des CSH alors que les ASC de la NSLA favoriseraient la différenciation des CSH. Les ASC participeraient alors avec les adipocytes à la formation de niches hématopoïétiques distinctes entre la SLA et la NSLA.

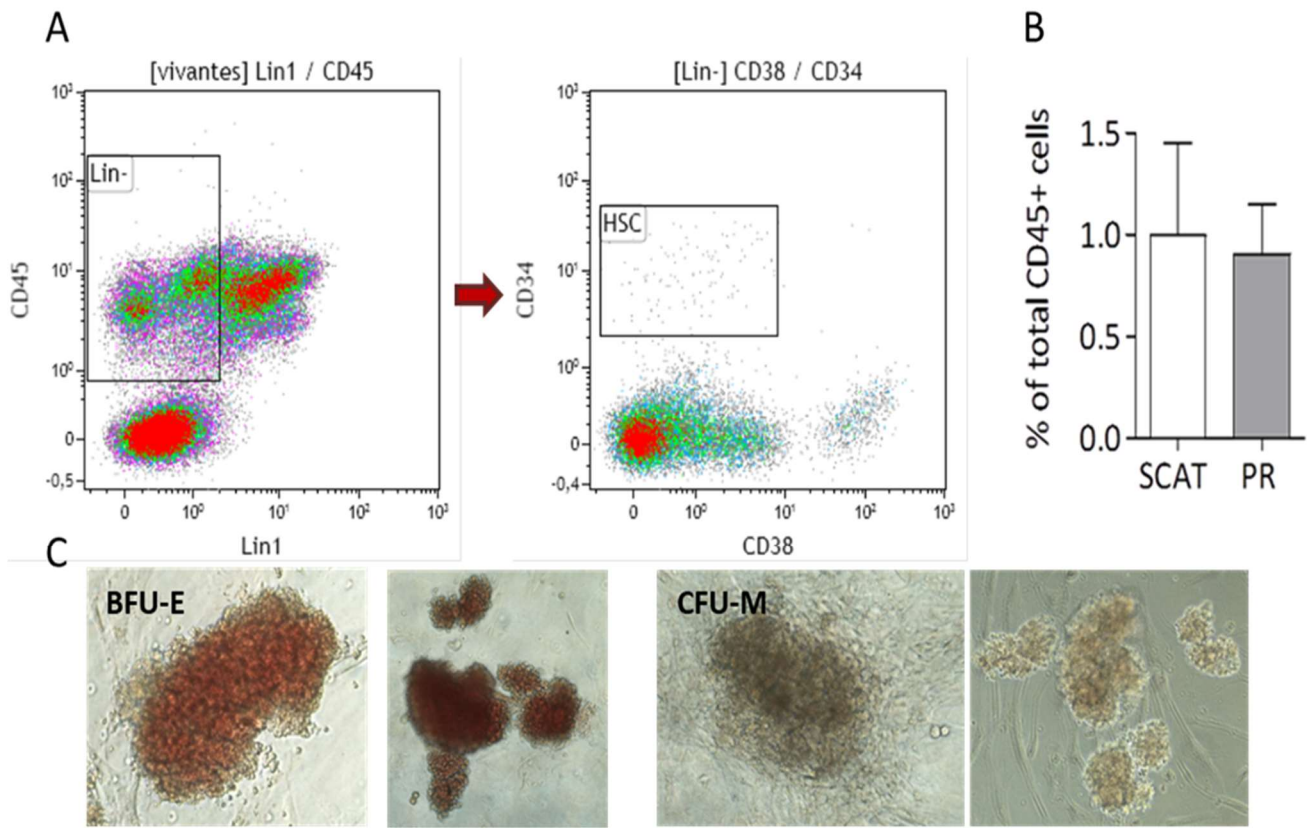


Figure 31 : Identification des cellules souches/progénitrices hématopoïétiques dans la SVF de TA humain

Dots plots représentatif de l'identification et quantification par cytométrie en flux de la population $Lin1^-/CD45^+/CD34^+/CD38^-$ dans la SVF de TA humain sous-cutané et profond (A). Potentiel clonogénique de la SVF de TA en milieu semi-solide de méthylcellulose, photos prises 2 semaines après l'ensemencement de 20 000 cellules de SVF totales par mL de méthylcellulose (B).

PR : Profond

Chapitre 3 : Caractérisation de l'activité hématopoïétique du TA humain

Compte tenu de l'importance des cellules immunitaires dans la physiologie du TA et de nos résultats obtenus chez la souris, nous avons fait l'hypothèse que le TA humain était également le siège d'une hématopoïèse tissulaire.

Nous avons cherché à détecter la présence de CSH dans la TA humaine en utilisant les marqueurs $\text{Lin}^-/\text{CD34}^+/\text{CD38}^-$ (cf. Introduction Chapitre 2). Dans le TA, ce phénotype correspond également à une sous-population d'ASC, nous avons donc ajouté l'expression du marqueur CD45 au phénotype utilisé afin de caractériser spécifiquement des CSH. Ces expériences ont été réalisées à partir de SVF de TA humain obtenu après opérations chirurgicales de dermo-lipectomies abdominales (service de chirurgie plastique et des brûlés du Pr. GROLLEAU-RAOUX, Hôpital Rangueil, Toulouse). Les dépôts auxquels nous avons eu accès étaient donc soit des TA sous-cutanés, soit viscéraux.

Nos résultats montrent la présence d'une population rare de CSH de phénotype $\text{Lin}^-/\text{CD34}^+/\text{CD45}^+/\text{CD38}^-$ (fig. 31A) dans la SVF qui représente environ 1% de la population CD45 totale du TA (fig. 31B). Cette population de CSH a été retrouvée dans les deux types de dépôts adipeux (sous-cutanés et viscéraux), dans les mêmes proportions. Les TA humains peuvent donc être le siège d'une activité hématopoïétique extra-médullaire, comme chez la souris³³⁶.

Afin de valider la fonctionnalité de cette population de CSH *in vitro*, nous avons réalisé des expériences de clonogénie en méthylcellulose à partir de la SVF de TA sous-cutané humain. Après deux semaines la présence de clones hématopoïétiques a été caractérisée. Nous avons observé la présence de progéniteurs érythrocytaires BFU-E et monocytaires CFU-M (fig. 31C).

Nous avons alors voulu valider la fonctionnalité *in vivo* de ces cellules en réalisant des transplantations de CSH triées à partir de TA sous-cutané humain. L'étude de l'activité hématopoïétique des CSH chez l'homme repose sur l'humanisation de souris immuno-

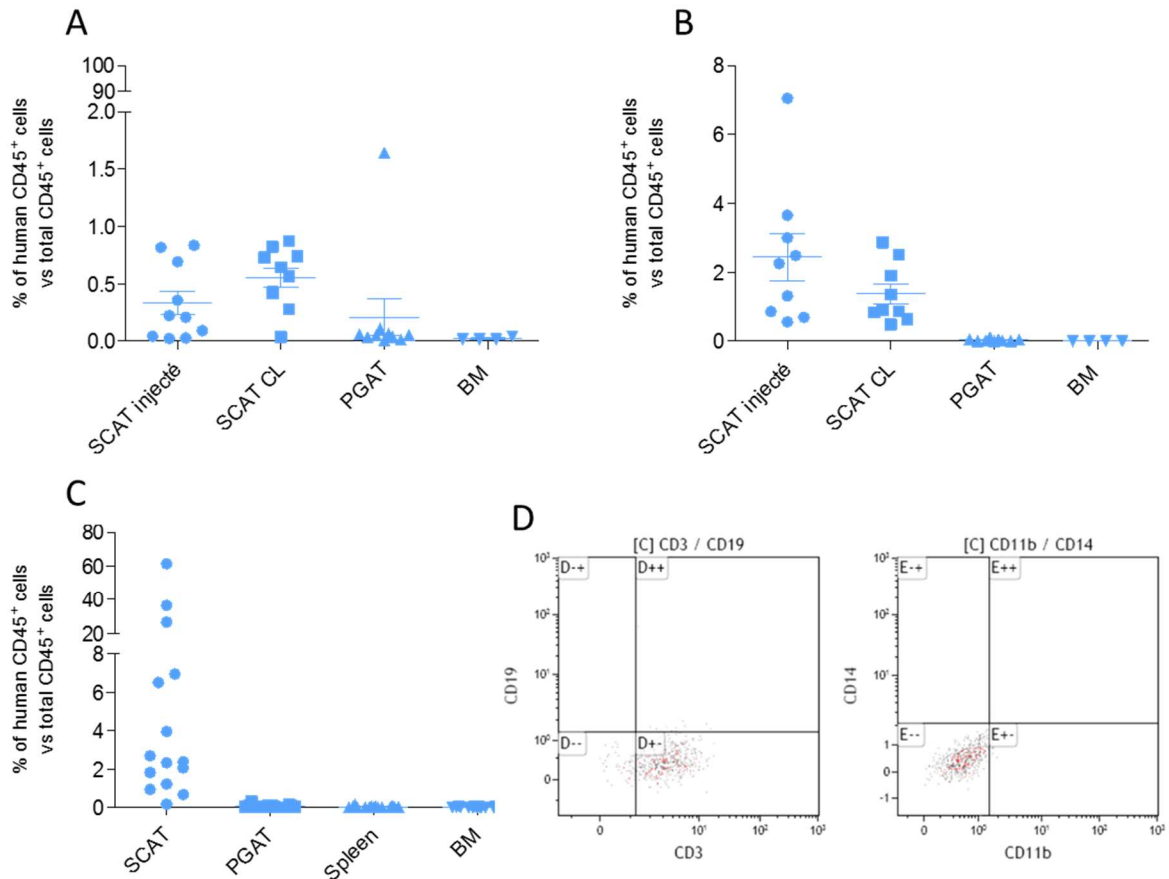


Figure 32 : Mise au point des greffes *in vivo* des CSH de TA humain et analyse quantitative et qualitative de leur descendance

Quantification par cytométrie en flux du chimérisme CD45 humain dans la population totale de cellules CD45⁺ isolées à partir de la SVF de SCAT et de PGAT, de la rate et de la MO de souris NSG, après injection en intra-TA (**A**), en intra-TA après traitement au busulfan (**B**) ou en IV selon le protocole utilisé en routine au laboratoire (**C**). Dots plots représentatif de la caractérisation par cytométrie en flux du phénotype des cellules CD45⁺ humaines dans le SCAT (**D**).

SCAT = TA sous-cutané ; PGAT = TA péri-gonadique ; BM = Moelle Osseuse ; CL = Contro-Latéral

déficientes avec des CSH humaines isolées à partir de sang périphérique, de cordon ombilical ou de MO humaine. Le modèle de référence consiste à injecter des CSH dans la circulation de souris immunodéficientes NOD/SCID/IL2 γ KO (NSG)³⁴⁸.

Nous avons préalablement effectué des expériences de mise au point de greffe de CSH triées dans des souris NSG. Une première série d'expériences avec injection de CSH triées à partir de TA humain directement dans la circulation *via* la veine caudale des souris et sans compétition s'est révélée infructueuse (données non montrées). Nous avons alors greffé les CSH de TA directement dans le TA des souris NSG. Après laparotomie et décollement du TA, nous avons injecté $15 \cdot 10^3$ CSH triées (deux injections d'un volume de 15 μ L de part et d'autre du TA) dans un des deux TA sous-cutanés des souris. Deux mois après, nous avons quantifié le chimérisme (pourcentage de cellules CD45⁺ humaines dans la population totale de cellules CD45⁺). Le chimérisme est de $0,3\% \pm 0,1\%$ dans la SVF du TA injecté (fig. 32A). De manière inattendue, nous avons retrouvé du chimérisme dans le TA contro-latéral non injecté ($0,5\% \pm 0,1\%$). En revanche, aucune cellule humaine n'est retrouvée dans le TA péri-gonadique de la souris NSG. Ces résultats suggèrent que ces CSH semblent migrer depuis le TA injecté vers l'autre dépôt sous-cutané sans se diriger vers le dépôt péri-gonadique.

Afin d'améliorer la prise de greffe, nous avons reproduit ces expériences en traitant préalablement les souris avec du busulfan à 20mg/kg 24h avant la greffe. Le busulfan est une molécule utilisée dans le conditionnement préalable à une greffe de CSH médullaires chez l'homme, mais qui induit également une aplasie médullaire et favorise la prise de greffe des CSH humaines dans les souris³⁴⁹. Dans cette condition, le chimérisme quantifié dans le dépôt injecté et le dépôt contro-latéral est supérieur à celui mesuré dans ces dépôts lorsque la souris n'est pas pré-conditionnée au busulfan, mais reste toutefois faible ($2,4\% \pm 0,7\%$ dans le TA injecté et $1,4\% \pm 0,3\%$ dans le TA contro-latéral) (fig. 32B). Nous avons comparé la prise de greffe de CSH fraîchement triées et directement injectées à celle de CSH ayant subi un cycle de congélation/décongélation entre le tri et l'injection. Nos résultats doivent être confirmés mais il semblerait que la prise de greffe soit meilleure avec des CSH congelées après le tri puis décongelées avant l'injection, qu'avec des CSH fraîchement triées (données non montrées).

Enfin, nous avons réalisé une série d'expériences en injectant les CSH humaines dans le sinus rétro-orbital en compétition avec des cellules de MO totale de souris, selon le protocole que nous utilisons en routine au laboratoire pour les reconstitutions hématopoïétiques avec des CSH de TA. Brièvement, 2×10^3 CSH de TA humain sont injectées en intraveineux dans des souris NSG en compétition avec 2×10^5 cellules de MO totale de souris NSG. Les souris receveuses ne sont pas irradiées mais sont traitées avec du busulfan à 20mg/kg 24h comme précédemment. 2 mois après la greffe, nous avons observé environ 10% ($\pm 4,5\%$) de cellules CD45⁺ humaines dans la population totale de cellules CD45⁺ dans le TA sous-cutané (SCAT) (fig.32C). Il est à noter que ce chimérisme est très hétérogène selon les lots d'animaux. Les lots de CSH injectées viennent de plusieurs donneurs, et cette hétérogénéité pourrait être due à des différences entre les patients. Cependant nous n'avons pas été en mesure de mettre en lumière de différences avec les informations dont nous disposons (âge, sexe et indice de masse corporelle). Lors des expériences de transplantation directement dans le TA, aucun chimérisme n'est retrouvé dans le TA périgonadique (PGAT) ou les organes hématopoïétiques (rate et MO) de la souris. L'analyse phénotypique de ces cellules humaines montre que 100% de ces cellules humaines sont de phénotype CD3⁺/CD19⁻/CD11b⁻/CD14⁻ (fig. 32D).

Discussion

Nous montrons ici, pour la première fois, la présence de CSH dans le TA chez l'homme. Compte tenu de la quantité de TA dans l'organisme, ces données suggèrent que le TA humain pourrait être un réservoir important de CSH. Comme chez la souris, le TA pourrait donc avoir un rôle non négligeable dans la production de cellules immunitaires en situation physiologique et pathologique. Contrairement à nos résultats obtenus chez la souris, la descendance des CSH de TA humain sous-cutané après transplantation n'est retrouvée que dans le SCAT des souris NSG. Ce tropisme particulier pourrait être dû i) à des environnements ou des niches très différents entre le SCAT et le PGAT des souris NSG ou ii) à des propriétés particulières des CSH humaines transplantées. Nous avons montré que le TA viscéral chez l'homme contient également une population de CSH de phénotype Lin⁻/CD34⁺/CD45⁺/CD38⁻. Nous n'avons pas pu avoir accès à du TA viscéral humain pour les

expériences de reconstitution hématopoïétique mais il serait intéressant d'étudier si les CSH de TA viscéral chez l'homme ont un tropisme spécifique vers les dépôts adipeux viscéraux après injection chez la souris.

Nous avons montré qu'après injection dans des souris NSG, les CSH de TA se différencient majoritairement en lymphocytes T (CD3⁺) dans le SCAT. Chez la souris, les CSH du TA se différencient majoritairement en cellules myéloïdes³³⁶. Cette différence entre l'homme et la souris pourrait s'expliquer soit par des propriétés intrinsèques des CSH différentes d'un organisme à l'autre, soit par un environnement propice à la différenciation lymphoïde dans le SCAT des souris NSG. Il a en effet été montré que les CSH médullaires humaines greffées dans des souris NSG se différencient majoritairement en lymphocytes³⁵⁰.

Pour tester ces deux hypothèses, 2 stratégies devront être adoptées, d'une part, comparer le potentiel de différenciation *in vivo* des CSH issues de TA humain ou de TA murin dans des souris receveuses NSG, et d'autre part, transplanter des CSH de TA humain dans des souris Receveuses NSG-Tg (hu-mSCF). En effet, ces souris, génétiquement modifiées pour exprimer le Stem Cell Factor (SCF) humain, peuvent supporter la différenciation myéloïde³⁵¹. Si les CSH de TA murin se différencient en cellules myéloïdes dans des receveuses NSG, nous pourrions conclure à des différences intrinsèques entre les CSH de TA, murines et humaines. La capacité des CSH de TA humain à se différencier en cellules myéloïdes *in vivo* sera évaluée par des transplantations de CSH de TA humain dans les souris NSG-Tg (hu-mSCF). L'acquisition de ces souris est en cours, et nous permettra éventuellement de développer un modèle de souris dont l'activité hématopoïétique du TA est humanisée et productrice de cellules myéloïdes humaines.

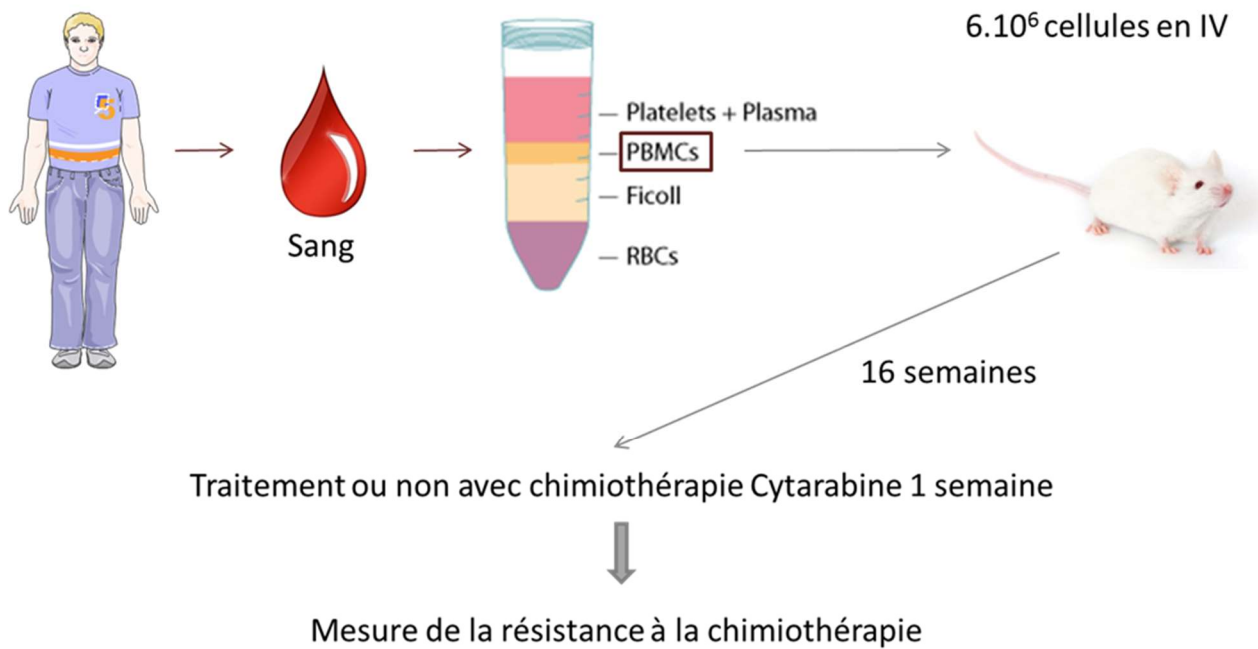


Figure 33 : Schéma du protocole expérimental d'humanisation des souris NSG avec des cellules mononucléées de sang périphérique de patients leucémiques

Les PBMC sont isolés à partir de sang périphérique de patients leucémiques. 6.10^6 de ces PBMC sont injectées à des souris NSG préalablement traitées au Busulfan. 16 semaines après, les souris sont traitées ou non quotidiennement avec de la cytarabine pendant une semaine. La chimiorésistance est ensuite évaluée par cytométrie par en flux.

Annexe : Le TA, un réservoir de cellules leucémiques ?

Parmi les pathologies de l'hématopoïèse médullaire, la Leucémie Aigüe Myéloïde (LAM) est le cancer sanguin le plus fréquent caractérisé par une expansion clonale de myéloblastes immatures, initié par une cellule souche ou progénitrice, leucémique. Malgré un bon taux de rémission, c'est une maladie avec un taux de récurrence assez important et une survie à 5 ans d'environ 30 à 40% pour les patients de moins de 60 ans et 20% pour les plus de 60 ans³⁵². La chimiothérapie est efficace pour l'ablation des cellules leucémiques, mais les récurrences proviennent de clones leucémiques, appelés blastes, ayant résisté à la chimiothérapie³⁵³. Ces blastes leucémiques sont des cellules leucémiques immatures capables de proliférer et de produire des cellules myéloïdes leucémiques matures.

En collaboration avec l'équipe de JE Sarry (CRCT, Toulouse), nous avons cherché à déterminer si le TA pouvait constituer un réservoir de blastes leucémiques résistants à la chimiothérapie. Cette résistance à la chimiothérapie pourrait être due à la présence d'une niche cancéreuse dans le TA. Il a en effet été montré que les cellules cancéreuses peuvent être protégées des traitements chimiothérapeutiques par une niche cancéreuse, permettant notamment une coopération métabolique, ou effet Warburg. Dans cette situation, les cellules leucémiques fonctionnent sur un métabolisme anaérobie en situation d'hypoxie, et produisent du lactate utilisé par les cellules environnantes comme substrat énergétique. Cette niche peut notamment être composée de CSM³⁵⁴.

Nous avons utilisé un modèle de xélogreffe de PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) de patients leucémiques dans des souris NSG immunodéficientes (fig. 33) développé par cette équipe et permettant de mesurer la chimiorésistance de cellules leucémiques³⁵⁵. Dans ce modèle, les souris développent une LAM à partir des cellules humaines. Après un traitement d'une semaine avec une chimiothérapie à la cytarabine (AraC), l'analyse en cytométrie des populations de blastes leucémiques dans les organes permet d'évaluer la présence et la chimiorésistance des cellules tumorales.

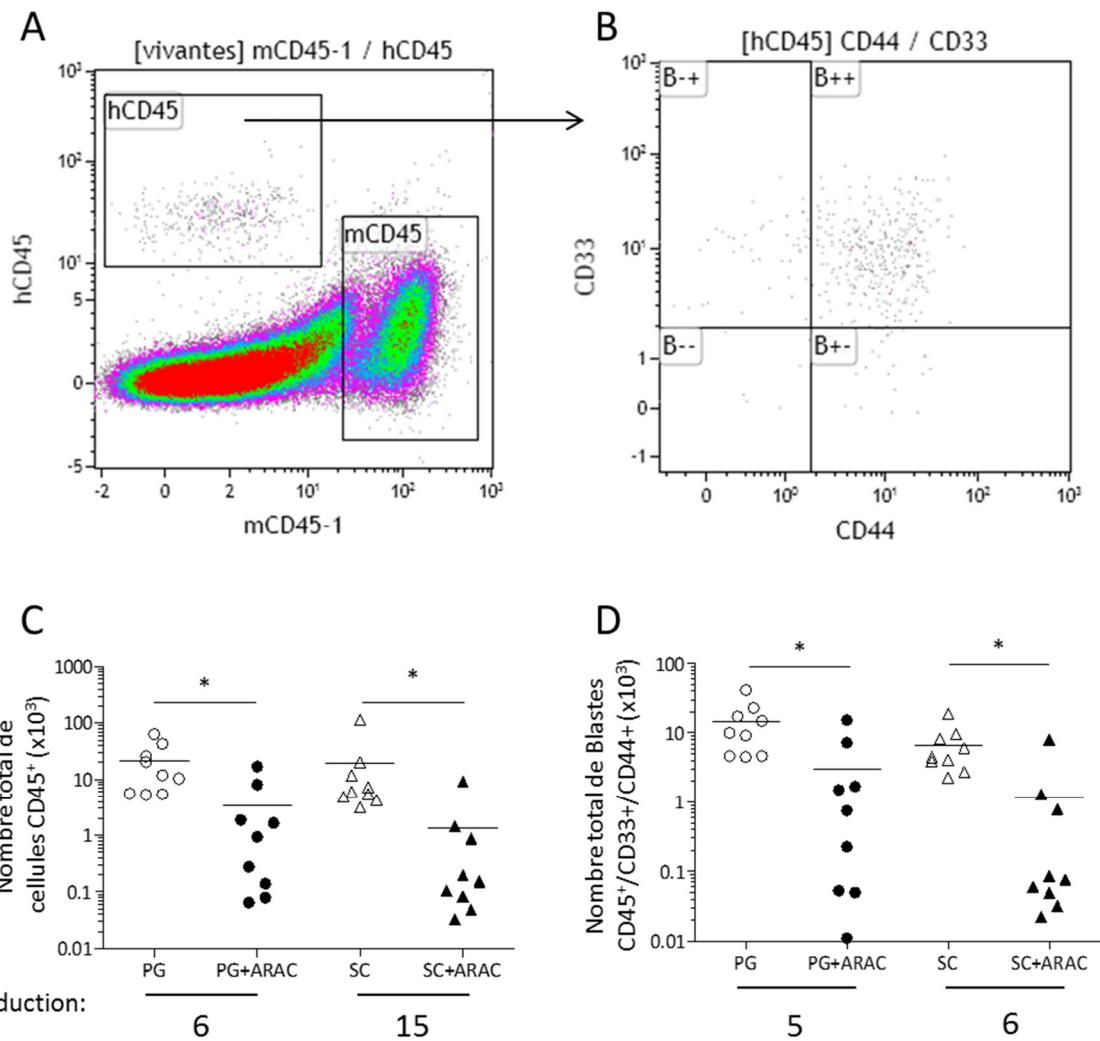


Figure 34 : Analyse de la chimiorésistance dans le TA des souris NSG.

16 semaines après la greffe, les souris ont été traitées quotidiennement à la cytarabine (ARAC), pendant sept jours. A la fin du traitement, les cellules leucémiques humaines ont été quantifiées par cytométrie en flux. Dots plots représentatifs de l'humanisation des souris NSG (A) et analyse de la présence de blastes leucémiques CD33⁺/CD44⁺ dans la population CD45⁺ humaine (B). Quantification des cellules CD45⁺ humaines (C) et des blastes leucémiques CD33⁺/CD44⁺ (D) dans la SVF des TA périgonadiques et sous-cutanés des souris traitées ou non à l'ARAC ainsi que le coefficient de division des nombres de cellules en réponse au traitement à l'Arac

*: p < 0,05

L'analyse de la SVF de SCAT et de PGAT en cytométrie montre que, chez ces souris greffées avec des cellules de LAM humaine, on retrouve des cellules CD45⁺ humaines leucémiques dans les dépôts adipeux (fig. 34A). On retrouve également des blastes leucémiques de phénotype CD44⁺/CD33⁺ (fig. 34B).

Après traitement à l'AraC, nous avons observé une diminution du nombre de cellules leucémiques humaines, par un facteur 6 dans le TA péri-gonadique, et par un facteur 15 dans le TA sous-cutané (fig. 34C). Les nombres de blastes leucémiques dans le PGAT et le SCAT sont réduits de 5 et 6 fois respectivement (fig. 34D). La réduction du nombre de cellules par la chimiothérapie est plus importante dans le TA sous-cutané que dans le péri-gonadique, suggérant une certaine protection des cellules leucémiques dans le TA péri-gonadique par rapport au TA sous-cutané vis-à-vis de la chimiothérapie. Il y a cependant des blastes qui persistent après la chimiothérapie, suggérant une chimio-résistance d'une partie des blastes dans le TA.

Discussion

Nos expériences de cytométrie en flux sur les dépôts SCAT et PGAT après injection de PBMC de patients leucémiques montrent que des cellules leucémiques matures, ainsi que des blastes leucémiques, sont présents dans le TA et sont capables de résister à une chimiothérapie. Dans la MO, les cellules leucémiques sont capables de modifier la niche hématopoïétique, pour permettre leur survie et leur prolifération³⁵⁶. Les cellules stromales vont notamment produire des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8). Les cellules endothéliales expriment VCAM-1 et ICAM-1 permettant l'adhérence des cellules leucémiques et leur migration, et les adipocytes fournissent des substrats énergétiques comme les AG³⁵⁷. Il serait intéressant d'étudier dans le TA quels changements morphologiques et fonctionnels sont associés à la présence et à la survie des blastes leucémiques grâce à des expériences de microscopie ainsi qu'à l'étude du métabolisme des animaux. Il serait alors intéressant de regarder si des modifications de la morphologie des adipocytes, ou de la vascularisation, sont associées à une résistance plus ou moins prononcée des cellules leucémiques à la chimiothérapie et si à long terme ces blastes peuvent provoquer des récives de la maladie. Une étude a montré que dans la MO, la

résistance des cellules leucémiques à la chimiothérapie était améliorée dans les zones hypoxiques, grâce à l'inhibition de voie de signalisation de mort cellulaire par l'hypoxie³⁵⁸. Il serait intéressant de regarder si la résistance à la chimiothérapie des cellules leucémiques dans le TA est assurée par un environnement hypoxique.

Nos résultats sont également en accord avec des données récentes de la littérature, qui montrent dans la leucémie chronique myéloïde que le TA est un réservoir de cellules souches leucémiques capables de résister à une chimiothérapie grâce à l'expression du CD36, un transporteur des AG³⁵⁹, suggérant que cette résistance peut être induite par une modification du métabolisme cellulaire. Les auteurs proposent que les adipokines sécrétées par le TA peuvent également participer à la survie des blastes leucémiques dans le TA. Il a en effet été montré que la leptine induit la prolifération des cellules cancéreuses dans des modèles animaux, et qu'elle est corrélée avec un plus fort taux de cancer chez l'homme³⁶⁰. Dans le SCAT murin, la NSLA exprime plus fortement la leptine que la SLA⁵⁵, il serait intéressant d'étudier si les blastes chimio-résistants se localisent principalement dans la NSLA du SCAT. Une localisation préférentielle de ces blastes permettrait ensuite de déterminer si ces blastes résident dans une niche particulière qui les protégerait de la chimiothérapie. Ces résultats ouvriraient alors de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le traitement des leucémies.

DISCUSSION

Les résultats de cette thèse montrent que l'activité hématopoïétique des CSH est modifiée dans un modèle de diabète de type II via une production locale de macrophages pro-inflammatoires. Chez la souris et dans le TA sous-cutané, ces CSH seraient localisées préférentiellement dans la région centrale de ce dépôt. Cette région héberge des adipocytes beiges ce qui lui confère la capacité à brunir. Des stimuli connus pour induire l'activation ou l'inhibition de ces adipocytes beiges entraînent une diminution du nombre de CSH dans cette région. Chez l'homme, nous montrons pour la première fois la présence de CSH fonctionnelles in vitro et in vivo dans le TA. Contrairement aux CSH de TA murin, les CSH du TA humain sembleraient orientées vers une différenciation lymphoïde mais ces résultats restent à confirmer. Enfin, nous montrons que le TA pourrait constituer un réservoir de cellules leucémiques, dont des blastes leucémiques résistants à la chimiothérapie.

Le rôle physiologique des CSH du TA et leurs mécanismes de régulation

Nos résultats montrent que la transplantation de CSH de TA de souris diabétiques est suffisante pour transférer la maladie dans les souris receveuses saines. Inversement, la transplantation de CSH de TA souris saines dans des souris diabétiques restaure en partie le métabolisme glucidique des souris receveuses.

Concernant les CSH de la MO, il a été montré que l'hyperglycémie associée à un diabète de type I est corrélée à une augmentation de la myélopoïèse médullaire *in vivo*³⁶¹. Cet effet est dû à une perturbation de la niche des CSH, avec une diminution de l'expression de molécules permettant le maintien des CSH dans la niche endostéale telles que le CXCL12 et l'intégrine- β 1, ce qui induit la différenciation des CSH³⁶². Les diabètes de type I ou de type II sont également associés à des micro-angiopathies, induisant des perturbations de la niche vasculaire des CSH dans la MO³⁶³. La perturbation de l'intégrité vasculaire de la MO induit des modifications du gradient d'oxygène entre le centre de la MO, et la niche endostéale hypoxique. Cette perturbation est responsable d'une production plus importante d'espèces réactives de l'oxygène³⁶⁴. Ces perturbations des différentes niches hématopoïétiques dans la MO conduisent à une mobilisation accrue des CSH. Des modifications structurelles du TA n'ont été étudiées que dans des modèles de diabète de type II induit par l'obésité. L'obésité induit chez la souris une hypertrophie des adipocytes, la présence de zones hypoxiques dans

le TA ainsi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires¹⁷². De telles modifications de l'environnement du TA ont très certainement un impact sur la niche des CSH dans le TA. On peut donc faire l'hypothèse que ces modifications peuvent modifier la prolifération et/ou la différenciation des CSH du TA.

Toujours sur la MO il a été montré que la transplantation de CSH de MO issues de souris diabétiques dans des souris saines, induit un transfert de la pathologie, et inversement des CSH de souris saines restaurent le phénotype de souris diabétiques³⁶⁵⁻³⁶⁸. Ces données sont issues de modèles de diabète de type I induits par la streptozotocine. Nous avons montré que les CSH du TA de souris diabétiques de type II sont capables de transférer la pathologie, cependant dans notre modèle la transplantation de CSH de MO de souris diabétiques n'induit pas la pathologie. Nous pouvons imaginer que les diabètes de type I ou de type II induisent des modifications différentes de l'hématopoïèse, le diabète de type I modifierait l'hématopoïèse médullaire alors que le diabète de type II modifierait l'hématopoïèse du TA. Il serait intéressant d'étudier l'impact d'un diabète de type I sur l'hématopoïèse du TA.

Dans notre étude, nous avons utilisé un modèle de diabète induit par un régime composé à 72% de lipides. Si l'on s'intéresse aux différents régimes utilisés dans la littérature, on constate qu'ils induisent des perturbations métaboliques différentes. La plupart des modèles utilisent un régime composé à 45% de lipides, qui induit une obésité et un diabète. Chez les souris obèses, la perturbation de l'activité hématopoïétique médullaire serait due à une hypertrophie des adipocytes médullaires³⁶⁹. Ces adipocytes participent à la régulation de l'activité des CSH dans la MO grâce à la sécrétion de leptine et d'adiponectine^{304,318,346}. Le régime que nous avons utilisé induit un diabète sans induire d'obésité³⁴², ce qui suggère qu'il modifierait peu ou pas le tissu adipeux médullaire, et aurait un impact moins fort sur l'hématopoïèse médullaire.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons commencé un travail de caractérisation du phénotype métabolique et des compartiments immunitaires de la MO et des TA chez des souris chimères nourries soit avec un régime à 72% de lipide soit avec un régime à 45% de lipides. Nous allons également comparer ces données avec des souris non irradiées et non transplantées avec des CSH. Nos premiers résultats montrent que le régime contenant 45% de lipides induit une obésité et un diabète, alors que le régime composé à 72% de lipides

n'induit qu'un diabète. Le régime obésogène et diabétogène induit une modification des compartiments myéloïdes et lymphoïdes dans le SCAT, alors que le régime diabétogène modifie seulement le compartiment myéloïde du SCAT. L'analyse du chimérisme de ces cellules montrent que les cellules lymphoïdes sont originaires de la MO, alors que les cellules myéloïdes sont produites dans le SCAT (données non montrées). De manière inattendue, les populations immunitaires du PGAT ne sont pas modifiées, contrairement à ce qui est observé chez des souris non reconstituées. Ces résultats suggèrent que le régime obésogène et diabétogène induit une modification de l'activité hématopoïétique dans la MO et du TA, alors qu'un régime seulement diabétogène modifie l'activité hématopoïétique uniquement dans le TA. La fin de la caractérisation des effets de ces deux régimes sur les compartiments immunitaires de la MO et des TA ainsi que des phénotypes métaboliques chez des souris non reconstitués est en cours. Les prochains résultats nous permettront de comparer l'effet des régimes entre des souris chimères et des souris non reconstituées. Si nous montrons que le régime diabétogène modifie uniquement l'hématopoïèse du TA sans modifier celle de la MO, nous pourrions alors proposer un modèle d'étude de l'hématopoïèse du TA en situation pathologique sans passer par des expériences de transplantation hématopoïétiques.

Rôle de la niche hématopoïétique dans le TA

Contrairement aux effets observés dans la MO où la niche hématopoïétique est modifiée nous montrons que les CSH du TA sont capables d'initier le développement de pathologies métaboliques indépendamment de la niche. En effet la transplantation de CSH de TA modifiées dans une niche « normale » va modifier pendant au moins 8 semaines le métabolisme de l'organisme receveur. Ces conclusions sont contraires à l'idée que les CSH sont en grande partie contrôlés par leur niche²⁸⁷. En situation physiologique, il a été montré que la prolifération et la différenciation des CSH de MO étaient régulées par des mécanismes épigénétiques capables de perdurer dans le temps³²⁸. Nous pouvons faire l'hypothèse que le régime riche en lipides induit une modification durable de la régulation des CSH au niveau épigénétique. Les CSH modifiées par un tel régime échapperaient alors au moins transitoirement au contrôle du micro-environnement dans les souris receveuses.

Cette hypothèse est d'autant plus probable que, comme toutes les autres équipes, nous utilisons un modèle de reconstitution hématopoïétique. Ce modèle présente des limites certaines puisqu'il nécessite une irradiation à dose létale, préalable à la greffe. Cette irradiation s'accompagne, chez la souris, d'une perte de l'homéostasie de la MO caractérisée par une mort cellulaire des MSC et des vaisseaux, et une augmentation du nombre d'adipocytes médullaires³⁰³.

Concernant le TA, notre équipe a montré qu'une irradiation à dose létale induit une diminution du nombre et de la taille des adipocytes, ainsi qu'une diminution des capacités de différenciation et de prolifération des ASC 7 jours après l'irradiation³⁷⁰. Il est donc possible que dans le TA l'environnement des CSH injectées ne soit plus en mesure de réguler l'activité des CSH.

Dans des situations plus physiologiques sans irradiation, nous montrons que les CSH du TA sont localisées préférentiellement dans la zone centrale du TA sous-cutanée. Les adipocytes de cette zone sont principalement de type beige. De plus, la modulation de l'activité de ces adipocytes par différents *stimuli* induit une diminution du nombre de CSH dans cette zone. Ces résultats suggèrent que les CSH de cette zone sont bien régulées par des signaux de leur environnement. Cependant la complexité de ces signaux générés probablement par plusieurs types cellulaires dans la SLA ne nous a pas permis de caractériser précisément cette niche hématopoïétique. En revanche, la NSLA contient moins de CSH et nos résultats de microdissection montrent une descendance des CSH du TA dans la NSLA. La NSLA pourrait donc être une zone favorable à leur différenciation. En cohérence avec nos résultats, les données de la littérature montrent que adipocytes de cette zone expriment plus fortement la leptine que ceux de la NSLA⁵⁵. Au niveau médullaire la sécrétion de leptine par les adipocytes médullaires induit une différenciation myéloïde des CSH³⁴⁶. De plus les ASC de la NSLA expriment plus fortement le LIF, un facteur soluble induisant la différenciation des CSH, que les ASC de la SLA. A l'inverse, les ASC de la SLA expriment plus fortement la molécule d'adhérence VCAM-1, induisant la quiescence des CSH, que les ASC de la NSLA (données internes du laboratoire). Nous pouvons donc conclure que la SLA et la NSLA correspondent à deux niche hématopoïétiques différentes, la niche de la SLA maintiendrait les CSH dans un état quiescent alors que la niche de la NSLA induirait leur différenciation.

Dans un TA irradié, les CSH pourraient échapper à une régulation par ces niches et maintenir une activité de prolifération et de différenciation induite par leur TA d'origine. Afin d'étudier le rôle des CSH du TA dans les maladies métaboliques sans réaliser d'irradiation préalable, et si elles sont contrôlées par la niche, il faudrait pouvoir distinguer les cellules immunitaires produites *in situ* dans le TA des cellules immunitaires produites dans la MO. Deux stratégies pourraient alors être envisagées : I) nous disposons de souris mT/mG, ces souris expriment de manière ubiquitaire la protéine fluorescente tdTomato dont le gène est suivi par une séquence stop, puis par la séquence de gène de la GFP. Le gène de la tdTomato et sa séquence stop sont flanqués de séquences flox. L'excision de ces séquences par l'expression d'une Cre-recombinase permet alors l'expression de la protéine GFP. Le croisement de souris mT/mG avec des souris exprimant une Cre-recombinase spécifiquement dans les CSH du TA et pas dans celles de la MO permettrait l'expression de la GFP seulement dans les cellules immunitaires produites dans le TA. Les cellules immunitaires issues de la MO exprimeraient toujours la protéine tdTomato. Cependant, à l'heure actuelle, nous n'avons pas réussi à identifier un ou plusieurs gènes spécifiquement exprimés dans les CSH du TA. II) L'utilisation de techniques permettant un marquage clonal *in situ* des CSH par des techniques de génie génétique²⁴⁶ permettrait un *tracking* spécifique des CSH et de leur descendance au niveau clonal. L'intérêt de cette technique réside dans la puissance d'analyse cellule par cellule, de l'effet d'une modification de l'hématopoïèse du TA dans le développement des pathologies métaboliques.

L'activité hématopoïétique du TA humain

Nos résultats chez l'homme montrent pour la première fois la présence de CSH dans le TA humain sous cutané et profond. Ces CSH constituent une population rare de la SVF de TA humain (environ $0,3\% \pm 0,14\%$), ce qui est légèrement inférieur à ce qui est observé chez la souris³³⁶. *In vitro*, ces cellules ont une activité clonogénique principalement myéloïde, ce qui n'est pas étonnant compte tenu du fait que la méthylcellulose utilisée contient des facteurs de croissance pro-myéloïdes (IL-3, IL-6, SCF, EPO, GM-CSF et G-CSF). L'étude du potentiel colonogénique lymphoïde *in vitro* dans ce système de culture à court-terme n'est pas possible. Nous montrons en revanche que la transplantation de ces CSH dans des souris NSG produit

des cellules de phénotypes CD3⁺, marqueur classiquement exprimé par les lymphocytes T. Ces CSH sont donc fonctionnelles *in vitro* et *in vivo*. Néanmoins, la caractérisation de ces cellules doit être complétée, tant *in vitro* qu'*in vivo*.

De manière intéressante, lorsqu'on transplante des CSH provenant de TA sous-cutané, leur descendance n'est retrouvée que dans le SCAT des souris NSG. Aucune cellule n'est retrouvée dans le PGAT. Ces résultats sont différents de ce que nous observons dans le modèle de transplantation de CSH de TA murin dans lequel la descendance des CSH de SCAT et de PGAT est retrouvée dans les deux dépôts. Néanmoins, dans le modèle murin, le chimérisme reste plus important dans le SCAT que dans le PGAT quelle que soit l'origine des CSH. Une explication à cette différence peut être le contenu en ASCs, tant par leur nombre que par leur expression de facteurs de croissance hématopoïétiques³³⁷. De plus, les cellules endothéliales du PGAT expriment davantage de molécule d'adhérence telle que ICAM-1 permettant le recrutement des cellules circulantes³⁷¹. Il serait intéressant d'étudier les différences entre SCAT et PGAT chez les souris NSG afin d'expliquer pourquoi le PGAT n'est pas reconstitué. Il serait également intéressant de déterminer si les CSH issues de TA profonds ont un tropisme préférentiel pour le PGAT des souris NSG. Chez l'homme, les différences entre TA profond et sous-cutané ont surtout été caractérisées d'un point de vue métabolique lors de l'obésité. Au niveau cellulaire, il a été montré que les adipocytes du TA profond sont plus petits que ceux du TA sous-cutané. Cette différence entraîne une plus forte activité lipolytique des adipocytes du TA profond que ceux du TA sous-cutané, ainsi qu'une pré-disposition des adipocytes du TA profond à l'insulino-résistance³⁷². Le TA profond est également plus vascularisé que le TA sous-cutané, ce qui permet une infiltration de cellules immunitaires circulantes plus importante¹³. Au niveau sécrétoire, il a été montré que le TA profond chez l'homme sécrète en plus grande quantité des cytokines pro-inflammatoires telles que la C-Réactive protéine (CRP), l'IL-6, et MCP-1³⁷³. Des différences de contenu en ASC ne sont pas évoquées dans la littérature, néanmoins les différences décrites ci-dessus suggèrent que comme chez la souris, les TA profonds et sous-cutanés chez l'homme constituent des micro-environnements hématopoïétiques différents, qui pourraient expliquer le tropisme spécifique des CSH du TA sous-cutané que nous avons observé vers le SCAT après injection chez la souris.

Dans le modèle murin, nous avons montré que les macrophages pro-inflammatoires produits par les CSH du TA participent en partie au développement d'un diabète de type II. Chez l'homme, une augmentation de macrophages pro-inflammatoires dans le TA sous-cutané est corrélée à une insulino-résistance³⁷⁴. Nos données soulèvent donc la question suivante : est-ce que les CSH du TA humain sont capables de produire des cellules myéloïdes pro-inflammatoires et est-ce que cette production est augmentée chez des patients développant un diabète de type II ? A moyen terme, nous greffer dans des souris NSG des CSH issues de TA de patients diabétiques. Un protocole d'essai clinique a été déposé au Comité de Protection des Personnes en collaboration avec le Dr P. Gourdy et les prochains résultats sur la caractérisation de l'activité hématopoïétique du TA nous permettront de démarrer cet essai. Ces expériences nous permettront de déterminer si l'activité des CSH du TA est modifiée chez les patients diabétiques, et si ces cellules sont capables de transférer la pathologie dans un modèle murin. Si ces résultats sont positifs, ils permettront pour la première fois de proposer l'hématopoïèse du TA comme un nouvel acteur dans le développement des pathologies métaboliques chez l'homme, ouvrant alors de nouvelles perspectives dans le développement de nouvelles thérapies.

Nous avons également montré que chez la souris, le TA peut-être un réservoir de cellules leucémiques humaines, et notamment de blastes résistant à la chimiothérapie. Compte tenu de la quantité de TA dans l'organisme, il serait intéressant de regarder si ces blastes résistants sont retrouvés directement dans le TA chez l'homme. Ces blastes pourraient alors être à l'origine de récives chez des patients leucémiques en rémission.

BIBLIOGRAPHIE

1. Sethi, J. K. & Vidal-Puig, A. J. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J. Lipid Res.* **48**, 1253–1262 (2007).
2. Lafontan, M. & Langin, D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog. Lipid Res.* **48**, 275–297 (2009).
3. Zhang, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425–432 (1994).
4. Friedman, J. M. & Halaas, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **395**, 763–770 (1998).
5. Giralt, M., Cereijo, R. & Villarroya, F. Adipokines and the Endocrine Role of Adipose Tissues. *Handb. Exp. Pharmacol.* **233**, 265–282 (2016).
6. Pfeifer, A. & Hoffmann, L. S. Brown, beige, and white: the new color code of fat and its pharmacological implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **55**, 207–227 (2015).
7. Zakaria, E. & Shafir, E. Yellow bone marrow as adipose tissue. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* **124**, 1265–1268 (1967).
8. Svensson, P.-A. *et al.* Characterization of brown adipose tissue in the human perirenal depot. *Obes. Silver Spring Md* **22**, 1830–1837 (2014).
9. Saponaro, C., Gaggini, M., Carli, F. & Gastaldelli, A. The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. *Nutrients* **7**, 9453–9474 (2015).
10. Nielsen, T. S., Jessen, N., Jørgensen, J. O. L., Møller, N. & Lund, S. Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *J. Mol. Endocrinol.* **52**, R199–222 (2014).
11. Jeppesen, J. & Kiens, B. Regulation and limitations to fatty acid oxidation during exercise. *J. Physiol.* **590**, 1059–1068 (2012).
12. Luo, L. & Liu, M. Adipose tissue in control of metabolism. *J. Endocrinol.* **231**, R77–R99 (2016).
13. Ibrahim, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* **11**, 11–18 (2010).
14. Scherer, P. E. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* **55**, 1537–1545 (2006).
15. Fasshauer, M. & Blüher, M. Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**, 461–470 (2015).
16. Fève, B., Bastard, C., Fellahi, S., Bastard, J.-P. & Capeau, J. New adipokines. *Ann. Endocrinol.* **77**, 49–56 (2016).
17. Vlaicu, S. I. *et al.* The role of complement system in adipose tissue-related inflammation. *Immunol. Res.* **64**, 653–664 (2016).

18. López-Jaramillo, P. *et al.* The role of leptin/adiponectin ratio in metabolic syndrome and diabetes. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **18**, 37–45 (2014).
19. Shehzad, A., Iqbal, W., Shehzad, O. & Lee, Y. S. Adiponectin: regulation of its production and its role in human diseases. *Horm. Athens Greece* **11**, 8–20 (2012).
20. Miyazaki, S. *et al.* Effect of exercise training on adipocyte-size-dependent expression of leptin and adiponectin. *Life Sci.* **86**, 691–698 (2010).
21. Pénicaud, L., Meillon, S. & Brondel, L. Leptin and the central control of feeding behavior. *Biochimie* **94**, 2069–2074 (2012).
22. Marroquí, L. *et al.* Role of leptin in the pancreatic β -cell: effects and signaling pathways. *J. Mol. Endocrinol.* **49**, R9-17 (2012).
23. Harris, R. B. S. Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1842**, 414–423 (2014).
24. Okamoto, M. *et al.* Adiponectin induces insulin secretion in vitro and in vivo at a low glucose concentration. *Diabetologia* **51**, 827–835 (2008).
25. Berg, A. H., Combs, T. P., Du, X., Brownlee, M. & Scherer, P. E. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat. Med.* **7**, 947–953 (2001).
26. Yamauchi, T. *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat. Med.* **7**, 941–946 (2001).
27. Sawicka, M., Janowska, J. & Chudek, J. Potential beneficial effect of some adipokines positively correlated with the adipose tissue content on the cardiovascular system. *Int. J. Cardiol.* **222**, 581–589 (2016).
28. Ekmekci, H. & Ekmekci, O. B. The role of adiponectin in atherosclerosis and thrombosis. *Clin. Appl. Thromb. Off. J. Int. Acad. Clin. Appl. Thromb.* **12**, 163–168 (2006).
29. Naylor, C. & Petri, W. A. Leptin Regulation of Immune Responses. *Trends Mol. Med.* **22**, 88–98 (2016).
30. Matarese, G., Moschos, S. & Mantzoros, C. S. Leptin in immunology. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 3137–3142 (2005).
31. Versini, M., Jeandel, P.-Y., Rosenthal, E. & Shoenfeld, Y. Obesity in autoimmune diseases: not a passive bystander. *Autoimmun. Rev.* **13**, 981–1000 (2014).
32. Pérez-Pérez, A. *et al.* Role of leptin as a link between metabolism and the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev.* **35**, 71–84 (2017).
33. Tilg, H. & Moschen, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 772–783 (2006).
34. Lo, J. C. *et al.* Adipsin is an adipokine that improves β cell function in diabetes. *Cell* **158**, 41–53 (2014).

35. Donoso, M. A. *et al.* Increased circulating adiponectin levels and decreased leptin/soluble leptin receptor ratio throughout puberty in female ballet dancers: association with body composition and the delay in puberty. *Eur. J. Endocrinol.* **162**, 905–911 (2010).
36. Turner, R. T. *et al.* Peripheral leptin regulates bone formation. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **28**, 22–34 (2013).
37. Dupont, J., Pollet-Villard, X., Reverchon, M., Mellouk, N. & Levy, R. Adipokines in human reproduction. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **24**, 11–24 (2015).
38. Upadhyay, J., Farr, O. M. & Mantzoros, C. S. The role of leptin in regulating bone metabolism. *Metabolism.* **64**, 105–113 (2015).
39. Kajimura, S., Spiegelman, B. M. & Seale, P. Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metab.* **22**, 546–559 (2015).
40. Nicholls, D. G. & Locke, R. M. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol. Rev.* **64**, 1–64 (1984).
41. Lowell, B. B. & Spiegelman, B. M. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* **404**, 652–660 (2000).
42. Cao, W. *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 3057–3067 (2004).
43. Villarroya, F., Cereijo, R., Villarroya, J. & Giralt, M. Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nat. Rev. Endocrinol.* **13**, 26–35 (2017).
44. Modica, S. & Wolfrum, C. Bone morphogenic proteins signaling in adipogenesis and energy homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 915–923 (2013).
45. Cereijo, R., Villarroya, J. & Villarroya, F. Non-sympathetic control of brown adipose tissue. *Int. J. Obes. Suppl.* **5**, S40–44 (2015).
46. Villarroya, J., Cereijo, R. & Villarroya, F. An endocrine role for brown adipose tissue? *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **305**, E567–572 (2013).
47. Zhang, R. & Abou-Samra, A. B. Emerging roles of Lipasin as a critical lipid regulator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **432**, 401–405 (2013).
48. Young, P., Arch, J. R. & Ashwell, M. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett.* **167**, 10–14 (1984).
49. Loncar, D. Convertible adipose tissue in mice. *Cell Tissue Res.* **266**, 149–161 (1991).
50. Cousin, B. *et al.* Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J. Cell Sci.* **103 (Pt 4)**, 931–942 (1992).
51. Wu, J. *et al.* Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **150**, 366–376 (2012).

52. Sanchez-Gurmaches, J., Hung, C.-M. & Guertin, D. A. Emerging Complexities in Adipocyte Origins and Identity. *Trends Cell Biol.* **26**, 313–326 (2016).
53. Bartelt, A. & Heeren, J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10**, 24–36 (2014).
54. Giordano, A., Frontini, A. & Cinti, S. Convertible visceral fat as a therapeutic target to curb obesity. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 405–424 (2016).
55. Barreau, C. *et al.* Regionalization of browning revealed by whole subcutaneous adipose tissue imaging. *Obes. Silver Spring* **24**, 1081–9 (2016).
56. Carrière, A. *et al.* Browning of white adipose cells by intermediate metabolites: an adaptive mechanism to alleviate redox pressure. *Diabetes* **63**, 3253–3265 (2014).
57. Hui, X. *et al.* Adiponectin Enhances Cold-Induced Browning of Subcutaneous Adipose Tissue via Promoting M2 Macrophage Proliferation. *Cell Metab.* **22**, 279–290 (2015).
58. Gimble, J. M., Robinson, C. E., Wu, X. & Kelly, K. A. The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone* **19**, 421–428 (1996).
59. Kawai, M., de Paula, F. J. A. & Rosen, C. J. New insights into osteoporosis: the bone-fat connection. *J. Intern. Med.* **272**, 317–329 (2012).
60. Lecka-Czernik, B. Marrow fat metabolism is linked to the systemic energy metabolism. *Bone* **50**, 534–539 (2012).
61. Krings, A. *et al.* Bone marrow fat has brown adipose tissue characteristics, which are attenuated with aging and diabetes. *Bone* **50**, 546–552 (2012).
62. Scheller, E. L. *et al.* Region-specific variation in the properties of skeletal adipocytes reveals regulated and constitutive marrow adipose tissues. *Nat. Commun.* **6**, 7808 (2015).
63. Tavassoli, M. Fatty Involution of Marrow and the Role of Adipose Tissue in Hemopoiesis. *Humana Press Clifton* 157–187 (1989).
64. Hartsock, R. J., Smith, E. B. & Petty, C. S. NORMAL VARIATIONS WITH AGING OF THE AMOUNT OF HEMATOPOIETIC TISSUE IN BONE MARROW FROM THE ANTERIOR ILIAC CREST. A STUDY MADE FROM 177 CASES OF SUDDEN DEATH EXAMINED BY NECROPSY. *Am. J. Clin. Pathol.* **43**, 326–331 (1965).
65. Scheller, E. L. & Rosen, C. J. What's the matter with MAT? Marrow adipose tissue, metabolism, and skeletal health. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1311**, 14–30 (2014).
66. Fazeli, P. K. *et al.* Marrow Fat and Bone—New Perspectives. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, 935–945 (2013).
67. Hardaway, A. L., Herroon, M. K., Rajagurubandara, E. & Podgorski, I. Bone marrow fat: linking adipocyte-induced inflammation with skeletal metastases. *Cancer Metastasis Rev.* **33**, 527–543 (2014).

68. Nuttall, M. E. *et al.* Adipocytes and the regulation of bone remodeling: a balancing act. *Calcif. Tissue Int.* **94**, 78–87 (2014).
69. Billon, N. & Dani, C. Developmental origins of the adipocyte lineage: new insights from genetics and genomics studies. *Stem Cell Rev.* **8**, 55–66 (2012).
70. Jiang, Y., Berry, D. C., Tang, W. & Graff, J. M. Independent stem cell lineages regulate adipose organogenesis and adipose homeostasis. *Cell Rep.* **9**, 1007–1022 (2014).
71. Berry, R. & Rodeheffer, M. S. Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo. *Nat. Cell Biol.* **15**, 302–308 (2013).
72. Carrière, A. *et al.* Identification of the ectoenzyme CD38 as a marker of committed preadipocytes. *Int. J. Obes.* **2005** (2017). doi:10.1038/ijo.2017.140
73. Seale, P. *et al.* PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* **454**, 961–967 (2008).
74. Sanchez-Gurmaches, J. & Guertin, D. A. Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nat. Commun.* **5**, 4099 (2014).
75. Rosenwald, M., Perdikari, A., Rüllicke, T. & Wolfrum, C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat. Cell Biol.* **15**, 659–667 (2013).
76. Barbatelli, G. *et al.* The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **298**, E1244–1253 (2010).
77. Lee, Y.-H., Petkova, A. P., Mottillo, E. P. & Granneman, J. G. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by β 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab.* **15**, 480–491 (2012).
78. Lee, Y.-H., Petkova, A. P., Konkar, A. A. & Granneman, J. G. Cellular origins of cold-induced brown adipocytes in adult mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **29**, 286–299 (2015).
79. Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K. & Scherer, P. E. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat. Med.* **19**, 1338–1344 (2013).
80. Long, J. Z. *et al.* A smooth muscle-like origin for beige adipocytes. *Cell Metab.* **19**, 810–820 (2014).
81. Sera, Y. *et al.* Hematopoietic stem cell origin of adipocytes. *Exp. Hematol.* **37**, 1108–1120, 1120.e1–4 (2009).
82. Nishio, M. *et al.* Production of functional classical brown adipocytes from human pluripotent stem cells using specific hemopoietin cocktail without gene transfer. *Cell Metab.* **16**, 394–406 (2012).
83. Gavin, K. M. *et al.* Hematopoietic-to-mesenchymal transition of adipose tissue macrophages is regulated by integrin β 1 and fabricated fibrin matrices. *Adipocyte* **0**, 1–16 (2017).

84. Tencerova, M. & Kassem, M. The Bone Marrow-Derived Stromal Cells: Commitment and Regulation of Adipogenesis. *Front. Endocrinol.* **7**, 127 (2016).
85. Nguyen, A. *et al.* Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 1: Current concepts and review of the literature. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* **69**, 170–179 (2016).
86. Strioga, M., Viswanathan, S., Darinkas, A., Slaby, O. & Michalek, J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev.* **21**, 2724–2752 (2012).
87. Bourin, P. *et al.* Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* **15**, 641–648 (2013).
88. Casteilla, L., Planat-Benard, V., Laharrague, P. & Cousin, B. Adipose-derived stromal cells: Their identity and uses in clinical trials, an update. *World J. Stem Cells* **3**, 25–33 (2011).
89. Ailhaud, G. Early adipocyte differentiation. *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 400–402 (1996).
90. Brun, R. P. *et al.* Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev.* **10**, 974–984 (1996).
91. Lane, M. D., Lin, F. T., MacDougald, O. A. & Vasseur-Cognet, M. Control of adipocyte differentiation by CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha). *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* **20 Suppl 3**, S91-96 (1996).
92. Gregoire, F. M., Smas, C. M. & Sul, H. S. Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiol. Rev.* **78**, 783–809 (1998).
93. Spiegelman, B. M., Frank, M. & Green, H. Molecular cloning of mRNA from 3T3 adipocytes. Regulation of mRNA content for glycerophosphate dehydrogenase and other differentiation-dependent proteins during adipocyte development. *J. Biol. Chem.* **258**, 10083–10089 (1983).
94. Greenberg, A. S. *et al.* Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 12035–12039 (1993).
95. Sfeir, Z., Ibrahimi, A., Amri, E., Grimaldi, P. & Abumrad, N. Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **57**, 17–21 (1997).
96. MacDougald, O. A., Hwang, C. S., Fan, H. & Lane, M. D. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9034–9037 (1995).
97. Kraemer, F. B. & Shen, W.-J. Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J. Lipid Res.* **43**, 1585–1594 (2002).
98. Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P. & Spiegelman, B. M. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* **14**, 1293–1307 (2000).

99. Witkowska-Zimny, M. & Walenko, K. Stem cells from adipose tissue. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **16**, 236–257 (2011).
100. Planat-Benard, V. *et al.* Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* **109**, 656–663 (2004).
101. Mizuno, H., Tobita, M. & Uysal, A. C. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells Dayt. Ohio* **30**, 804–810 (2012).
102. Brzoska, M., Geiger, H., Gauer, S. & Baer, P. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 142–150 (2005).
103. Long, J. L., Zuk, P., Berke, G. S. & Chhetri, D. K. Epithelial differentiation of adipose-derived stem cells for laryngeal tissue engineering. *The Laryngoscope* **120**, 125–131 (2010).
104. Vossmerbaeumer, U. *et al.* Retinal pigment epithelial phenotype induced in human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* **11**, 177–188 (2009).
105. Safford, K. M., Safford, S. D., Gimble, J. M., Shetty, A. K. & Rice, H. E. Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Exp. Neurol.* **187**, 319–328 (2004).
106. Aurich, H. *et al.* Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut* **58**, 570–581 (2009).
107. Chandra, V., G, S., Phadnis, S., Nair, P. D. & Bhonde, R. R. Generation of pancreatic hormone-expressing islet-like cell aggregates from murine adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **27**, 1941–1953 (2009).
108. Rehman, J. *et al.* Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stromal Cells. *Circulation* **109**, 1292–1298 (2004).
109. Cai, L. *et al.* Suppression of Hepatocyte Growth Factor Production Impairs the Ability of Adipose-Derived Stem Cells to Promote Ischemic Tissue Revascularization. *STEM CELLS* **25**, 3234–3243 (2007).
110. Eelen, G., Cruys, B., Welti, J., De Bock, K. & Carmeliet, P. Control of vessel sprouting by genetic and metabolic determinants. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **24**, 589–596 (2013).
111. Carrière, A. *et al.* Preconditioning by Mitochondrial Reactive Oxygen Species Improves the Proangiogenic Potential of Adipose-Derived Cells-Based Therapy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 1093–1099 (2009).
112. De Barros, S. *et al.* Aging-related decrease of human ASC angiogenic potential is reversed by hypoxia preconditioning through ROS production. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **21**, 399–408 (2013).
113. Kapur, S. K. & Katz, A. J. Review of the adipose derived stem cell secretome. *Biochimie* **95**, 2222–2228 (2013).

114. Melief, S. M., Zwaginga, J. J., Fibbe, W. E. & Roelofs, H. Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. *Stem Cells Transl. Med.* **2**, 455–463 (2013).
115. Kilroy, G. E. *et al.* Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J. Cell. Physiol.* **212**, 702–709 (2007).
116. Amos, P. J. *et al.* Human Adipose-Derived Stromal Cells Accelerate Diabetic Wound Healing: Impact of Cell Formulation and Delivery. *Tissue Eng. Part A* **16**, 1595–1606 (2009).
117. Lee, M. J. *et al.* Proteomic analysis of tumor necrosis factor-alpha-induced secretome of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J. Proteome Res.* **9**, 1754–1762 (2010).
118. Heo, S. C. *et al.* Tumor Necrosis Factor- α -Activated Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Accelerate Cutaneous Wound Healing through Paracrine Mechanisms. *J. Invest. Dermatol.* **131**, 1559–1567 (2011).
119. Moon, K. M. *et al.* The Effect of Secretory Factors of Adipose-Derived Stem Cells on Human Keratinocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 1239–1257 (2012).
120. Corre, J. *et al.* Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors. *J. Cell. Physiol.* **208**, 282–288 (2006).
121. Nakao, N. *et al.* Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells facilitate hematopoiesis in vitro and in vivo: advantages over bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Am. J. Pathol.* **177**, 547–554 (2010).
122. De Toni, F. *et al.* Human adipose-derived stromal cells efficiently support hematopoiesis in vitro and in vivo: a key step for therapeutic studies. *Stem Cells Dev* **20**, 2127–38 (2011).
123. Nishiwaki, S. *et al.* Efficacy and safety of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for supporting hematopoiesis. *Int. J. Hematol.* **96**, 295–300 (2012).
124. Cousin, B. *et al.* Immuno-metabolism and adipose tissue: The key role of hematopoietic stem cells. *Biochimie* **124**, 21–6 (2016).
125. Mathis, D. Immunological goings-on in visceral adipose tissue. *Cell Metab.* **17**, 851–859 (2013).
126. Cho, K. W., Morris, D. L. & Lumeng, C. N. Flow cytometry analyses of adipose tissue macrophages. *Methods Enzymol.* **537**, 297–314 (2014).
127. Italiani, P. & Boraschi, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front. Immunol.* **5**, 514 (2014).
128. Hill, A. A., Reid Bolus, W. & Hasty, A. H. A decade of progress in adipose tissue macrophage biology. *Immunol. Rev.* **262**, 134–152 (2014).
129. Odegaard, J. I. *et al.* Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* **447**, 1116–1120 (2007).

130. Lee, Y.-H., Petkova, A. P. & Granneman, J. G. Identification of an adipogenic niche for adipose tissue remodeling and restoration. *Cell Metab.* **18**, 355–367 (2013).
131. Altintas, M. M. *et al.* Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice. *J. Lipid Res.* **52**, 480–488 (2011).
132. Odegaard, J. I. & Chawla, A. Alternative macrophage activation and metabolism. *Annu. Rev. Pathol.* **6**, 275–297 (2011).
133. van Furth, R. & Cohn, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* **128**, 415–435 (1968).
134. Territo, M. C. & Cline, M. J. Mononuclear phagocyte proliferation, maturation and function. *Clin. Haematol.* **4**, 685–703 (1975).
135. Epelman, S., Lavine, K. J. & Randolph, G. J. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* **41**, 21–35 (2014).
136. Hashimoto, D. *et al.* Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* **38**, 792–804 (2013).
137. Cousin, B. *et al.* A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **13**, 305–312 (1999).
138. Charrière, G. *et al.* Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J. Biol. Chem.* **278**, 9850–9855 (2003).
139. Boutens, L. & Stienstra, R. Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia* **59**, 879–894 (2016).
140. Ricardo-Gonzalez, R. R. *et al.* IL-4/STAT6 immune axis regulates peripheral nutrient metabolism and insulin sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 22617–22622 (2010).
141. Stein, M., Keshav, S., Harris, N. & Gordon, S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* **176**, 287–292 (1992).
142. Wu, D. *et al.* Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* **332**, 243–247 (2011).
143. Sun, S., Ji, Y., Kersten, S. & Qi, L. Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. *Annu. Rev. Nutr.* **32**, 261–286 (2012).
144. Poglio, S. *et al.* Adipose tissue as a dedicated reservoir of functional mast cell progenitors. *Stem Cells* **28**, 2065–72 (2010).
145. Caspar-Bauguil, S. *et al.* Adipose tissue lymphocytes: types and roles. *J. Physiol. Biochem.* **65**, 423–436 (2009).
146. Fujisaka, S. *et al.* Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes* **58**, 2574–2582 (2009).

147. Feuerer, M. *et al.* Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat. Med.* **15**, 930–939 (2009).
148. Cipolletta, D. Adipose tissue-resident regulatory T cells: phenotypic specialization, functions and therapeutic potential. *Immunology* **142**, 517–525 (2014).
149. Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F. & Rudensky, A. Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 531–564 (2012).
150. Cipolletta, D. *et al.* PPAR- γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature* **486**, 549–553 (2012).
151. Caspar-Bauguil, S. *et al.* Weight-dependent changes of immune system in adipose tissue: importance of leptin. *Exp. Cell Res.* **312**, 2195–2202 (2006).
152. Neill, D. R. *et al.* Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* **464**, 1367–1370 (2010).
153. Roediger, B. & Weninger, W. Group 2 innate lymphoid cells in the regulation of immune responses. *Adv. Immunol.* **125**, 111–154 (2015).
154. Molofsky, A. B. *et al.* Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *J. Exp. Med.* **210**, 535–549 (2013).
155. Yang, B.-G., Seoh, J.-Y. & Jang, M. H. Regulatory Eosinophils in Inflammation and Metabolic Disorders. *Immune Netw.* **17**, 41–47 (2017).
156. Nguyen, K. D. *et al.* Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* **480**, 104–108 (2011).
157. Fischer, K. *et al.* Alternatively activated macrophages do not synthesize catecholamines or contribute to adipose tissue adaptive thermogenesis. *Nat. Med.* **23**, 623–630 (2017).
158. Brestoff, J. R. *et al.* Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature* **519**, 242–246 (2015).
159. Finlin, B. S. *et al.* Mast Cells Promote Seasonal White Adipose Beiging in Humans. *Diabetes* (2017). doi:10.2337/db16-1057
160. Huh, J. Y., Park, Y. J., Ham, M. & Kim, J. B. Crosstalk between adipocytes and immune cells in adipose tissue inflammation and metabolic dysregulation in obesity. *Mol. Cells* **37**, 365–371 (2014).
161. Xu, H. *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **112**, 1821–1830 (2003).
162. Weisberg, S. P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* **112**, 1796–808 (2003).
163. Apostolopoulos, V. *et al.* The complex immunological and inflammatory network of adipose tissue in obesity. *Mol. Nutr. Food Res.* **60**, 43–57 (2016).

164. Haase, J. *et al.* Local proliferation of macrophages in adipose tissue during obesity-induced inflammation. *Diabetologia* **57**, 562–571 (2014).
165. Amano, S. U. *et al.* Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. *Cell Metab.* **19**, 162–171 (2014).
166. Zheng, C. *et al.* Local proliferation initiates macrophage accumulation in adipose tissue during obesity. *Cell Death Dis.* **7**, e2167 (2016).
167. Braune, J. *et al.* IL-6 Regulates M2 Polarization and Local Proliferation of Adipose Tissue Macrophages in Obesity. *J Immunol* **198**, 2927–2934 (2017).
168. Elgazar-Carmon, V., Rudich, A., Hadad, N. & Levy, R. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J. Lipid Res.* **49**, 1894–1903 (2008).
169. Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* **117**, 175–184 (2007).
170. Pacifico, L. *et al.* Increased T-helper interferon-gamma-secreting cells in obese children. *Eur. J. Endocrinol.* **154**, 691–697 (2006).
171. Kintscher, U. *et al.* T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 1304–1310 (2008).
172. Rausch, M. E., Weisberg, S., Vardhana, P. & Tortoriello, D. V. Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int. J. Obes.* **2005** **32**, 451–463 (2008).
173. Nishimura, S. *et al.* CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat. Med.* **15**, 914–920 (2009).
174. Strissel, K. J. *et al.* Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* **56**, 2910–2918 (2007).
175. Tardelli, M. *et al.* Osteopontin is a key player for local adipose tissue macrophage proliferation in obesity. *Mol Metab* **5**, 1131–1137 (2016).
176. Kratz, M. *et al.* Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages. *Cell Metab.* **20**, 614–625 (2014).
177. Liu, J. *et al.* Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat. Med.* **15**, 940–945 (2009).
178. Gutierrez, D. A., Muralidhar, S., Feyerabend, T. B., Herzig, S. & Rodewald, H.-R. Hematopoietic Kit Deficiency, rather than Lack of Mast Cells, Protects Mice from Obesity and Insulin Resistance. *Cell Metab.* **21**, 678–691 (2015).
179. Chmelař, J. *et al.* No Role for Mast Cells in Obesity-Related Metabolic Dysregulation. *Front. Immunol.* **7**, 524 (2016).

180. DeFuria, J. *et al.* B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 5133–5138 (2013).
181. Anderson, E. K., Gutierrez, D. A. & Hasty, A. H. Adipose tissue recruitment of leukocytes. *Curr. Opin. Lipidol.* **21**, 172–177 (2010).
182. Olefsky, J. M. & Glass, C. K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 219–246 (2010).
183. Stephens, J. M. & Pekala, P. H. Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor- α . *J. Biol. Chem.* **266**, 21839–21845 (1991).
184. Arkan, M. C. *et al.* IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat. Med.* **11**, 191–198 (2005).
185. Solinas, G. *et al.* JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. *Cell Metab.* **6**, 386–397 (2007).
186. Lesniewski, L. A. *et al.* Bone marrow-specific Cap gene deletion protects against high-fat diet-induced insulin resistance. *Nat. Med.* **13**, 455–462 (2007).
187. Féral, C. C. *et al.* Blockade of α 4 integrin signaling ameliorates the metabolic consequences of high-fat diet-induced obesity. *Diabetes* **57**, 1842–1851 (2008).
188. Patsouris, D. *et al.* Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab.* **8**, 301–309 (2008).
189. Ortega, M. T., Xie, L., Mora, S. & Chapes, S. K. Evaluation of macrophage plasticity in brown and white adipose tissue. *Cell. Immunol.* **271**, 124–133 (2011).
190. Osborn, O. & Olefsky, J. M. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat. Med.* **18**, 363–374 (2012).
191. Goralski, K. B. *et al.* Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J. Biol. Chem.* **282**, 28175–28188 (2007).
192. Curat, C. A. *et al.* From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* **53**, 1285–1292 (2004).
193. Maurizi, G., Della Guardia, L., Maurizi, A. & Poloni, A. Adipocytes properties and crosstalk with immune system in obesity-related inflammation. *J. Cell. Physiol.* (2017). doi:10.1002/jcp.25855
194. Fantuzzi, G. & Faggioni, R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 437–446 (2000).
195. DiSpirito, J. R. & Mathis, D. Immunological contributions to adipose tissue homeostasis. *Semin. Immunol.* **27**, 315–321 (2015).
196. Dowal, L. *et al.* Intrinsic Properties of Brown and White Adipocytes Have Differential Effects on Macrophage Inflammatory Responses. *Mediators Inflamm.* **2017**, 9067049 (2017).

197. Malide, D., Yewdell, J. W., Bennink, J. R. & Cushman, S. W. The export of major histocompatibility complex class I molecules from the endoplasmic reticulum of rat brown adipose cells is acutely stimulated by insulin. *Mol. Biol. Cell* **12**, 101–114 (2001).
198. Deng, T. *et al.* Class II major histocompatibility complex plays an essential role in obesity-induced adipose inflammation. *Cell Metab.* **17**, 411–422 (2013).
199. Brennan, P. J., Brigl, M. & Brenner, M. B. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 101–117 (2013).
200. Hotamisligil, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**, 860–867 (2006).
201. Milner, J. J. & Beck, M. A. The impact of obesity on the immune response to infection. *Proc. Nutr. Soc.* **71**, 298–306 (2012).
202. Ogawa, M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* **81**, 2844–2853 (1993).
203. Medvinsky, A., Rybtsov, S. & Taoudi, S. Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. *Dev. Camb. Engl.* **138**, 1017–1031 (2011).
204. Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C. & Keller, G. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Dev. Camb. Engl.* **126**, 5073–5084 (1999).
205. Palis, J. *et al.* Spatial and temporal emergence of high proliferative potential hematopoietic precursors during murine embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 4528–4533 (2001).
206. Gordon, S. & Martinez-Pomares, L. Physiological roles of macrophages. *Pflugers Arch.* **469**, 365–374 (2017).
207. Gautier, E. L. *et al.* Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat. Immunol.* **13**, 1118–1128 (2012).
208. Medvinsky, A. L., Samoylina, N. L., Müller, A. M. & Dzierzak, E. A. An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* **364**, 64–67 (1993).
209. Lancrin, C. *et al.* The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* **457**, 892–895 (2009).
210. Ganuza, M. *et al.* Murine hemogenic endothelial precursors display heterogeneous hematopoietic potential *ex vivo*. *Exp. Hematol.* (2017). doi:10.1016/j.exphem.2017.04.006
211. Sánchez, M. J., Holmes, A., Miles, C. & Dzierzak, E. Characterization of the first definitive hematopoietic stem cells in the AGM and liver of the mouse embryo. *Immunity* **5**, 513–525 (1996).
212. Till, J. E. & McCULLOCH, E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* **14**, 213–222 (1961).

213. Rhodes, K. E. *et al.* The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation. *Cell Stem Cell* **2**, 252–263 (2008).
214. Gekas, C., Dieterlen-Lièvre, F., Orkin, S. H. & Mikkola, H. K. A. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev. Cell* **8**, 365–375 (2005).
215. Gekas, C. *et al.* Hematopoietic stem cell development in the placenta. *Int. J. Dev. Biol.* **54**, 1089–1098 (2010).
216. Khodadi, E., Shahrabi, S., Shahjahani, M., Azandeh, S. & Saki, N. Role of stem cell factor in the placental niche. *Cell Tissue Res.* **366**, 523–531 (2016).
217. North, T. *et al.* Cbfa2 is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters. *Dev. Camb. Engl.* **126**, 2563–2575 (1999).
218. Godin, I., Garcia-Porrero, J. A., Dieterlen-Lièvre, F. & Cumano, A. Stem cell emergence and hemopoietic activity are incompatible in mouse intraembryonic sites. *J. Exp. Med.* **190**, 43–52 (1999).
219. Delassus, S. & Cumano, A. Circulation of hematopoietic progenitors in the mouse embryo. *Immunity* **4**, 97–106 (1996).
220. Bloom, W. & Bartelmez, G. W. Hematopoiesis in young human embryos. *Am. J. Anat.* **67**, 21–53 (1940).
221. Tavian, M., Hallais, M. F. & Péault, B. Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo. *Dev. Camb. Engl.* **126**, 793–803 (1999).
222. Tavian, M., Robin, C., Coulombel, L. & Péault, B. The human embryo, but not its yolk sac, generates lympho-myeloid stem cells: mapping multipotent hematopoietic cell fate in intraembryonic mesoderm. *Immunity* **15**, 487–495 (2001).
223. Le Douarin, N. [Details of the interphase nucleus in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*)]. *Bull. Biol. Fr. Belg.* **103**, 435–452 (1969).
224. Dieterlen-Lievre, F. On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **33**, 607–619 (1975).
225. Jaffredo, T., Gautier, R., Eichmann, A. & Dieterlen-Lièvre, F. Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Dev. Camb. Engl.* **125**, 4575–4583 (1998).
226. Caprioli, A., Jaffredo, T., Gautier, R., Dubourg, C. & Dieterlen-Lièvre, F. Blood-borne seeding by hematopoietic and endothelial precursors from the allantois. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 1641–1646 (1998).
227. Caprioli, A. *et al.* Hemangioblast commitment in the avian allantois: cellular and molecular aspects. *Dev. Biol.* **238**, 64–78 (2001).
228. Corbel, C., Salaün, J., Belo-Diabangouaya, P. & Dieterlen-Lièvre, F. Hematopoietic potential of the pre-fusion allantois. *Dev. Biol.* **301**, 478–488 (2007).
229. Glick, B. The bursa of Fabricius: the evolution of a discovery. *Poult. Sci.* **73**, 979–983 (1994).

230. Sato, Y. *et al.* Dynamic analysis of vascular morphogenesis using transgenic quail embryos. *PloS One* **5**, e12674 (2010).
231. Detrich, H. W. *et al.* Intraembryonic hematopoietic cell migration during vertebrate development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 10713–10717 (1995).
232. Kissa, K. *et al.* Live imaging of emerging hematopoietic stem cells and early thymus colonization. *Blood* **111**, 1147–1156 (2008).
233. Murayama, E. *et al.* Tracing hematopoietic precursor migration to successive hematopoietic organs during zebrafish development. *Immunity* **25**, 963–975 (2006).
234. Traver, D. *et al.* Transplantation and in vivo imaging of multilineage engraftment in zebrafish bloodless mutants. *Nat. Immunol.* **4**, 1238–1246 (2003).
235. Demy, D. L. *et al.* Generating parabiotic zebrafish embryos for cell migration and homing studies. *Nat. Methods* **10**, 256–258 (2013).
236. Boatman, S. *et al.* Assaying hematopoiesis using zebrafish. *Blood Cells. Mol. Dis.* **51**, 271–276 (2013).
237. Carroll, K. J. & North, T. E. Oceans of opportunity: exploring vertebrate hematopoiesis in zebrafish. *Exp. Hematol.* **42**, 684–696 (2014).
238. Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H. & Nakauchi, H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* **273**, 242–245 (1996).
239. Kondo, M. *et al.* Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 759–806 (2003).
240. Seita, J. & Weissman, I. L. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **2**, 640–653 (2010).
241. Kiel, M. J. *et al.* SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **121**, 1109–1121 (2005).
242. Wilson, A. *et al.* Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* **135**, 1118–1129 (2008).
243. Warr, M. R., Pietras, E. M. & Passegué, E. Mechanisms controlling hematopoietic stem cell functions during normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **3**, 681–701 (2011).
244. Messner, H. A. Assessment and characterization of hemopoietic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **13 Suppl 3**, 13–18 (1995).
245. Rossi, D. J. *et al.* Hematopoietic stem cell quiescence attenuates DNA damage response and permits DNA damage accumulation during aging. *Cell Cycle Georget. Tex* **6**, 2371–2376 (2007).
246. Sun, J. *et al.* Clonal dynamics of native haematopoiesis. *Nature* **514**, 322–327 (2014).

247. Kawamoto, H., Ikawa, T., Masuda, K., Wada, H. & Katsura, Y. A map for lineage restriction of progenitors during hematopoiesis: the essence of the myeloid-based model. *Immunol. Rev.* **238**, 23–36 (2010).
248. Chen, C.-C., Grimbaldston, M. A., Tsai, M., Weissman, I. L. & Galli, S. J. Identification of mast cell progenitors in adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11408–11413 (2005).
249. Franco, C. B., Chen, C.-C., Drukker, M., Weissman, I. L. & Galli, S. J. Distinguishing mast cell and granulocyte differentiation at the single-cell level. *Cell Stem Cell* **6**, 361–368 (2010).
250. Arinobu, Y., Iwasaki, H. & Akashi, K. Origin of basophils and mast cells. *Allergol. Int. Off. J. Jpn. Soc. Allergol.* **58**, 21–28 (2009).
251. Qi, X. *et al.* Antagonistic regulation by the transcription factors C/EBP α and MITF specifies basophil and mast cell fates. *Immunity* **39**, 97–110 (2013).
252. Drissen, R. *et al.* Distinct myeloid progenitor-differentiation pathways identified through single-cell RNA sequencing. *Nat. Immunol.* **17**, 666–676 (2016).
253. Notta, F. *et al.* Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science* **351**, aab2116 (2016).
254. Kaushansky, K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N. Engl. J. Med.* **354**, 2034–2045 (2006).
255. Mossadegh-Keller, N. *et al.* M-CSF instructs myeloid lineage fate in single haematopoietic stem cells. *Nature* **497**, 239–243 (2013).
256. Takizawa, H. *et al.* Pathogen-Induced TLR4-TRIF Innate Immune Signaling in Hematopoietic Stem Cells Promotes Proliferation but Reduces Competitive Fitness. *Cell Stem Cell* **21**, 225–240.e5 (2017).
257. Lord, B. I., Testa, N. G. & Hendry, J. H. The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood* **46**, 65–72 (1975).
258. Dexter, T. M., Allen, T. D. & Lajtha, L. G. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* **91**, 335–44 (1977).
259. Schofield, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**, 7–25 (1978).
260. Calvi, L. M. *et al.* Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**, 841–846 (2003).
261. Zhang, J. *et al.* Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**, 836–841 (2003).
262. Hooper, A. T. *et al.* Engraftment and reconstitution of hematopoiesis is dependent on VEGFR2-mediated regeneration of sinusoidal endothelial cells. *Cell Stem Cell* **4**, 263–274 (2009).

263. Nilsson, S. K., Johnston, H. M. & Coverdale, J. A. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood* **97**, 2293–2299 (2001).
264. Carlson, A. L. *et al.* Tracking Single Cells in Live Animals Using a Photoconvertible Near-Infrared Cell Membrane Label. *PLOS ONE* **8**, e69257 (2013).
265. Sipkins, D. A. *et al.* In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature* **435**, 969–973 (2005).
266. Lo Celso, C. *et al.* Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature* **457**, 92–96 (2009).
267. Hills, D. *et al.* Hoxb4-YFP reporter mouse model: a novel tool for tracking HSC development and studying the role of Hoxb4 in hematopoiesis. *Blood* **117**, 3521–3528 (2011).
268. Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. & Nagasawa, T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* **25**, 977–988 (2006).
269. Nombela-Arrieta, C. *et al.* Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat. Cell Biol.* **15**, 533–543 (2013).
270. Kunisaki, Y. *et al.* Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* **502**, 637–643 (2013).
271. Adams, G. B. & Scadden, D. T. The hematopoietic stem cell in its place. *Nat. Immunol.* **7**, 333–337 (2006).
272. Adams, G. B. *et al.* Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature* **439**, 599–603 (2006).
273. Méndez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M. & Frenette, P. S. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* **452**, 442–447 (2008).
274. Parmar, K., Mauch, P., Vergilio, J.-A., Sackstein, R. & Down, J. D. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5431–5436 (2007).
275. Simsek, T. *et al.* The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell* **7**, 380–390 (2010).
276. Takubo, K. *et al.* Regulation of the HIF-1 α level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **7**, 391–402 (2010).
277. Suda, T., Takubo, K. & Semenza, G. L. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell* **9**, 298–310 (2011).

278. Raaijmakers, M. H. G. P. *et al.* Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature* **464**, 852–857 (2010).
279. Kode, A. *et al.* Leukaemogenesis induced by an activating β -catenin mutation in osteoblasts. *Nature* **506**, 240–244 (2014).
280. Kopp, H.-G., Avecilla, S. T., Hooper, A. T. & Rafii, S. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiol. Bethesda Md* **20**, 349–356 (2005).
281. Grassinger, J., Haylock, D. N., Williams, B., Olsen, G. H. & Nilsson, S. K. Phenotypically identical hemopoietic stem cells isolated from different regions of bone marrow have different biological potential. *Blood* **116**, 3185–3196 (2010).
282. Gómez-Gavero, M. V., Lovell-Badge, R., Fernández-Avilés, F. & Lara-Pezzi, E. The vascular stem cell niche. *J Cardiovasc. Transl. Res.* **5**, 618–630 (2012).
283. Acar, M. *et al.* Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature* **526**, 126–130 (2015).
284. Corselli, M. *et al.* Perivascular support of human hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood* **121**, 2891–2901 (2013).
285. Omatsu, Y. *et al.* The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* **33**, 387–399 (2010).
286. Méndez-Ferrer, S. *et al.* Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **466**, 829–834 (2010).
287. Morrison, S. J. & Scadden, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* **505**, 327–334 (2014).
288. Greenbaum, A. *et al.* CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* **495**, 227–230 (2013).
289. Morikawa, S. *et al.* Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J. Exp. Med.* **206**, 2483–2496 (2009).
290. Boulais, P. E. & Frenette, P. S. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood* **125**, 2621–2629 (2015).
291. Zhou, B. O., Yue, R., Murphy, M. M., Peyer, J. G. & Morrison, S. J. Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell* **15**, 154–168 (2014).
292. Bruns, I. *et al.* Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat. Med.* **20**, 1315–1320 (2014).
293. Zhao, M. *et al.* Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* **20**, 1321–1326 (2014).

294. Sánchez-Aguilera, A. & Méndez-Ferrer, S. The hematopoietic stem-cell niche in health and leukemia. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **74**, 579–590 (2017).
295. Chow, A. *et al.* Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J. Exp. Med.* **208**, 261–271 (2011).
296. Christopher, M. J., Rao, M., Liu, F., Woloszynek, J. R. & Link, D. C. Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice. *J. Exp. Med.* **208**, 251–260 (2011).
297. Travnickova, J. *et al.* Primitive macrophages control HSPC mobilization and definitive haematopoiesis. *Nat. Commun.* **6**, ncomms7227 (2015).
298. Yamazaki, S. *et al.* Nonmyelinating Schwann Cells Maintain Hematopoietic Stem Cell Hibernation in the Bone Marrow Niche. *Cell* **147**, 1146–1158 (2011).
299. Tavassoli, M. Marrow adipose cells. Histochemical identification of labile and stable components. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **100**, 16–18 (1976).
300. Gordon, M. Y. Stem cells and the microenvironment in aplastic anaemia. *Br. J. Haematol.* **86**, 190–192 (1994).
301. Naveiras, O. *et al.* Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* **460**, 259–263 (2009).
302. Zhu, R.-J., Wu, M.-Q., Li, Z.-J., Zhang, Y. & Liu, K.-Y. Hematopoietic recovery following chemotherapy is improved by BADGE-induced inhibition of adipogenesis. *Int. J. Hematol.* **97**, 58–72 (2013).
303. Yamazaki, K. & Allen, T. D. Ultrastructural and morphometric alterations in bone marrow stromal tissue after 7 Gy irradiation. *Blood Cells* **17**, 527–549 (1991).
304. DiMascio, L. *et al.* Identification of adiponectin as a novel hemopoietic stem cell growth factor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 3511–3520 (2007).
305. Masamoto, Y. *et al.* Adiponectin Enhances Quiescence Exit of Murine Hematopoietic Stem Cells and Hematopoietic Recovery Through mTORC1 Potentiation. *Stem Cells Dayt. Ohio* **35**, 1835–1848 (2017).
306. Yokota, T. *et al.* Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* **96**, 1723–1732 (2000).
307. Yokota, T. *et al.* Adiponectin, a fat cell product, influences the earliest lymphocyte precursors in bone marrow cultures by activation of the cyclooxygenase-prostaglandin pathway in stromal cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **171**, 5091–5099 (2003).
308. Laharrague, P. *et al.* Inflammatory/haematopoietic cytokine production by human bone marrow adipocytes. *Eur. Cytokine Netw.* **11**, 634–639 (2000).

309. Zhang, Y. *et al.* Tumor necrosis factor (TNF) is a physiologic regulator of hematopoietic progenitor cells: increase of early hematopoietic progenitor cells in TNF receptor p55-deficient mice in vivo and potent inhibition of progenitor cell proliferation by TNF alpha in vitro. *Blood* **86**, 2930–2937 (1995).
310. Broxmeyer, H. E. *et al.* The suppressive influences of human tumor necrosis factors on bone marrow hematopoietic progenitor cells from normal donors and patients with leukemia: synergism of tumor necrosis factor and interferon-gamma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **136**, 4487–4495 (1986).
311. Caux, C. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha strongly potentiates interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced proliferation of human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* **75**, 2292–2298 (1990).
312. Rusten, L. S. *et al.* Bifunctional effects of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) on the growth of mature and primitive human hematopoietic progenitor cells: involvement of p55 and p75 TNF receptors. *Blood* **83**, 3152–3159 (1994).
313. Caux, C. *et al.* Potentiation of early hematopoiesis by tumor necrosis factor-alpha is followed by inhibition of granulopoietic differentiation and proliferation. *Blood* **78**, 635–644 (1991).
314. Kimura, H. *et al.* Interleukin 6 is a differentiation factor for human megakaryocytes in vitro. *Eur. J. Immunol.* **20**, 1927–1931 (1990).
315. Mellado-Damas, N., Rodríguez, J. M., Carmona, M., González, J. & Prieto, J. Ex-vivo expansion and maturation of CD34-positive hematopoietic progenitors optimization of culture conditions. *Leuk. Res.* **23**, 1035–1040 (1999).
316. Bruserud, Ø., Glenjen, N. & Rynningen, A. Effects of angiogenic regulators on in vitro proliferation and cytokine secretion by native human acute myelogenous leukemia blasts. *Eur. J. Haematol.* **71**, 9–17 (2003).
317. Laharrague, P. *et al.* High expression of leptin by human bone marrow adipocytes in primary culture. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **12**, 747–752 (1998).
318. Bennett, B. D. *et al.* A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. *Curr. Biol. CB* **6**, 1170–1180 (1996).
319. Gainsford, T. *et al.* Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 14564–14568 (1996).
320. Umemoto, Y. *et al.* Leptin stimulates the proliferation of murine myelocytic and primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* **90**, 3438–3443 (1997).
321. Spindler, T. J., Tseng, A. W., Zhou, X. & Adams, G. B. Adipocytic cells augment the support of primitive hematopoietic cells in vitro but have no effect in the bone marrow niche under homeostatic conditions. *Stem Cells Dev.* **23**, 434–441 (2014).
322. Corre, J. *et al.* Human bone marrow adipocytes support complete myeloid and lymphoid differentiation from human CD34 cells. *Br. J. Haematol.* **127**, 344–347 (2004).

323. Belaid-Choucair, Z. *et al.* Human bone marrow adipocytes block granulopoiesis through neuropilin-1-induced granulocyte colony-stimulating factor inhibition. *Stem Cells Dayt. Ohio* **26**, 1556–1564 (2008).
324. Glettig, D. L. & Kaplan, D. L. Extending human hematopoietic stem cell survival in vitro with adipocytes. *BioResearch Open Access* **2**, 179–185 (2013).
325. Zhou, B. O. *et al.* Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF. *Nat. Cell Biol.* **19**, 891–903 (2017).
326. Laslo, P. *et al.* Multilineage Transcriptional Priming and Determination of Alternate Hematopoietic Cell Fates. *Cell* **126**, 755–766 (2006).
327. Yu, V. W. C. *et al.* Epigenetic Memory Underlies Cell-Autonomous Heterogeneous Behavior of Hematopoietic Stem Cells. *Cell* **167**, 1310–1322.e17 (2016).
328. Baryawno, N., Severe, N. & Scadden, D. T. Hematopoiesis: Reconciling Historic Controversies about the Niche. *Cell Stem Cell* **20**, 590–592 (2017).
329. Sohawon, D., Lau, K. K., Lau, T. & Bowden, D. K. Extra-medullary haematopoiesis: A pictorial review of its typical and atypical locations. *J. Med. Imaging Radiat. Oncol.* **56**, 538–544 (2012).
330. Haidar, R., Mhaidli, H. & Taher, A. T. Paraspinal extramedullary hematopoiesis in patients with thalassemia intermedia. *Eur. Spine J. Off. Publ. Eur. Spine Soc. Eur. Spinal Deform. Soc. Eur. Sect. Cerv. Spine Res. Soc.* **19**, 871–878 (2010).
331. Sonoda, Y. & Sasaki, K. Hepatic extramedullary hematopoiesis and macrophages in the adult mouse: histometrical and immunohistochemical studies. *Cells Tissues Organs* **196**, 555–564 (2012).
332. Pereira, A., Cervantes, F., Bruges, R. & Rozman, C. Bone marrow histopathology in primary myelofibrosis: clinical and haematologic correlations and prognostic evaluation. *Eur. J. Haematol.* **44**, 95–99 (1990).
333. Kim, C. H. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *J. Blood Med.* **1**, 13–19 (2010).
334. Granick, J. L., Simon, S. I. & Borjesson, D. L. Hematopoietic stem and progenitor cells as effectors in innate immunity. *Bone Marrow Res.* **2012**, 165107 (2012).
335. Cousin, B., André, M., Arnaud, E., Pénicaud, L. & Casteilla, L. Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 1016–1022 (2003).
336. Poglio, S. *et al.* In situ production of innate immune cells in murine white adipose tissue. *Blood* **120**, 4952–62 (2012).
337. Luche, E. *et al.* Differential Hematopoietic Activity in White Adipose Tissue Depending on its Localization. *J Cell Physiol* **230**, 3076–83 (2015).

338. Ngkelo, A. *et al.* Mast cells regulate myofilament calcium sensitization and heart function after myocardial infarction. *J. Exp. Med.* **213**, 1353–1374 (2016).
339. Lefrançois, E. *et al.* The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature* **544**, 105–109 (2017).
340. Fioramonti, X., Lorsignol, A., Taupignon, A. & Pénicaud, L. A new ATP-sensitive K⁺ channel-independent mechanism is involved in glucose-excited neurons of mouse arcuate nucleus. *Diabetes* **53**, 2767–2775 (2004).
341. Zamarron, B. F. *et al.* Macrophage Proliferation Sustains Adipose Tissue Inflammation in Formerly Obese Mice. *Diabetes* **66**, 392–406 (2017).
342. Burcelin, R., Crivelli, V., Dacosta, A., Roy-Tirelli, A. & Thorens, B. Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **282**, E834–842 (2002).
343. Wilson, A. *et al.* Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1106**, 64–75 (2007).
344. Granneman, J. G., Li, P., Zhu, Z. & Lu, Y. Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue I: effects of β_3 -adrenergic receptor activation. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **289**, E608–E616 (2005).
345. Jarvinen, E. *et al.* Biotin-dependent functions in adiposity: a study of monozygotic twin pairs. *Int. J. Obes.* **40**, 788–95 (2016).
346. Laharrague, P. *et al.* High concentration of leptin stimulates myeloid differentiation from human bone marrow CD34⁺ progenitors: potential involvement in leukocytosis of obese subjects. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* **24**, 1212–1216 (2000).
347. Alvarez, P. *et al.* Regulatory systems in bone marrow for hematopoietic stem/progenitor cells mobilization and homing. *BioMed Res. Int.* **2013**, 312656 (2013).
348. Ito, M. *et al.* NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* **100**, 3175–3182 (2002).
349. Choi, B. *et al.* Human B cell development and antibody production in humanized NOD/SCID/IL-2R γ (null) (NSG) mice conditioned by busulfan. *J. Clin. Immunol.* **31**, 253–264 (2011).
350. Billerbeck, E. *et al.* Development of human CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in human stem cell factor⁻, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor⁻, and interleukin-3-expressing NOD-SCID IL2R γ null humanized mice. *Blood* **117**, 3076–3086 (2011).
351. Brehm, M. A. *et al.* Engraftment of human HSCs in nonirradiated newborn NOD-scid IL2r γ null mice is enhanced by transgenic expression of membrane-bound human SCF. *Blood* **119**, 2778–2788 (2012).
352. Burnett, A., Wetzler, M. & Löwenberg, B. Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **29**, 487–494 (2011).

353. Lübbert, M., Müller-Tidow, C., Hofmann, W.-K. & Koeffler, H. P. Advances in the treatment of acute myeloid leukemia: from chromosomal aberrations to biologically targeted therapy. *J. Cell. Biochem.* **104**, 2059–2070 (2008).
354. Melzer, C., von der Ohe, J., Lehnert, H., Ungefroren, H. & Hass, R. Cancer stem cell niche models and contribution by mesenchymal stroma/stem cells. *Mol Cancer* **16**, 28 (2017).
355. Saland, E. *et al.* A robust and rapid xenograft model to assess efficacy of chemotherapeutic agents for human acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J* **5**, e297 (2015).
356. Pezeshkian, B., Donnelly, C., Tamburo, K., Geddes, T. & Madlambayan, G. J. Leukemia Mediated Endothelial Cell Activation Modulates Leukemia Cell Susceptibility to Chemotherapy through a Positive Feedback Loop Mechanism. *PLoS One* **8**, e60823 (2013).
357. Shafat, M. S., Gnaneswaran, B., Bowles, K. M. & Rushworth, S. A. The bone marrow microenvironment - Home of the leukemic blasts. *Blood Rev.* (2017). doi:10.1016/j.blre.2017.03.004
358. Petit, C. *et al.* Hypoxia promotes chemoresistance in acute lymphoblastic leukemia cell lines by modulating death signaling pathways. *BMC Cancer* **16**, 746 (2016).
359. Ye, H. *et al.* Leukemic Stem Cells Evade Chemotherapy by Metabolic Adaptation to an Adipose Tissue Niche. *Cell Stem Cell* **19**, 23–37 (2016).
360. Khandekar, M. J., Cohen, P. & Spiegelman, B. M. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 886–895 (2011).
361. Nagareddy, P. R. *et al.* Hyperglycemia promotes myelopoiesis and impairs the resolution of atherosclerosis. *Cell Metab.* **17**, 695–708 (2013).
362. Chiba, H. *et al.* Diabetes impairs the interactions between long-term hematopoietic stem cells and osteopontin-positive cells in the endosteal niche of mouse bone marrow. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **305**, C693-703 (2013).
363. Ferraro, F. *et al.* Diabetes impairs hematopoietic stem cell mobilization by altering niche function. *Sci. Transl. Med.* **3**, 104ra101 (2011).
364. Mangialardi, G., Spinetti, G., Reni, C. & Madeddu, P. Reactive oxygen species adversely impacts bone marrow microenvironment in diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* **21**, 1620–1633 (2014).
365. LaFace, D. M. & Peck, A. B. Reciprocal allogeneic bone marrow transplantation between NOD mice and diabetes-nonsusceptible mice associated with transfer and prevention of autoimmune diabetes. *Diabetes* **38**, 894–901 (1989).
366. Griffith, M. L., Jagasia, M. & Jagasia, S. M. Diabetes mellitus after hematopoietic stem cell transplantation. *Endocr. Pract. Off. J. Am. Coll. Endocrinol. Am. Assoc. Clin. Endocrinol.* **16**, 699–706 (2010).
367. Li, L., Gu, W. & Zhu, D. Novel therapy for type 1 diabetes: autologous hematopoietic stem cell transplantation. *J. Diabetes* **4**, 332–337 (2012).

368. Couri, C. E. B., de Oliveira, M. C. & Simões, B. P. Risks, benefits, and therapeutic potential of hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diabetes. *Curr. Diab. Rep.* **12**, 604–611 (2012).
369. Adler, B. J., Kaushansky, K. & Rubin, C. T. Obesity-driven disruption of haematopoiesis and the bone marrow niche. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10**, 737–748 (2014).
370. Poglio, S. *et al.* Adipose tissue sensitivity to radiation exposure. *Am. J. Pathol.* **174**, 44–53 (2009).
371. Bosanská, L. *et al.* The influence of obesity and different fat depots on adipose tissue gene expression and protein levels of cell adhesion molecules. *Physiol. Res.* **59**, 79–88 (2010).
372. Misra, A. & Vikram, N. K. Clinical and pathophysiological consequences of abdominal adiposity and abdominal adipose tissue depots. *Nutrition* **19**, 457–466 (2003).
373. Pou, K. M. *et al.* Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue Volumes Are Cross-Sectionally Related to Markers of Inflammation and Oxidative Stress. *Circulation* **116**, 1234–1241 (2007).
374. Liu, L. F. *et al.* The receptor CD44 is associated with systemic insulin resistance and proinflammatory macrophages in human adipose tissue. *Diabetologia* **58**, 1579–1586 (2015).

ANNEXES



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Mini-review

Immuno-metabolism and adipose tissue: The key role of hematopoietic stem cells

B. Cousin^{a, b, c, d, *}, L. Casteilla^{a, b, c, d}, P. Laharrague^{a, b, c, d, e}, E. Luche^{a, b, c, d}, A. Lorsignol^{a, b, c, d}, V. Cuminetti^{a, b, c, d}, J. Paupert^{a, b, c, d}^a CNRS 5273, UMR STROMALab, F-31 432 Toulouse Cedex 4, France^b Université de Toulouse 3, UPS, F-31 432 Toulouse Cedex 4, France^c INSERM U1031, F-31 432 Toulouse Cedex 4, France^d EFS Pyrénées – Méditerranée, BP 84225, F-31 432 Toulouse Cedex 4, France^e Laboratoire d'Hématologie, TSA 50032, F-31059 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 April 2015

Accepted 13 June 2015

Available online xxx

Keywords:

Adipose tissue

Hematopoietic stem cell

Metabolism

Obesity

Diabetes

Bone marrow

ABSTRACT

The field of immunometabolism has come a long way in the past decade, leading to the emergence of a new role for white adipose tissue (WAT) that is now recognized to stand at the junction of immune and metabolic regulations. Interestingly, a crucial role of the abundant and heterogeneous immune population present in WAT has been proposed in the induction and development of metabolic diseases. Although a large body of data focused on mature immune cells, only few scattered studies are dedicated to leukocyte production, and the activity of hematopoietic stem cells (HSC) in these pathological states. Considering that blood cell production and the differentiation of HSCs and their progeny is orchestrated, in part, by complex interacting signals emanating from their microenvironment, it thus seems worth to better understand the relationships between metabolism and HSC. This review discusses the alterations of hematopoietic process described in metabolic diseases and focused on the emerging data concerning HSC present in WAT.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

The last decades have challenged the traditional concept of white adipose tissue (WAT), transforming it from an inert storage depot into a highly metabolic active tissue and an important endocrine organ playing a pivotal role in controlling whole-body energy homeostasis [1,2]. Moreover, largely described immunological mechanisms underlie WAT metabolic control and have instigated a new field of research termed immunometabolism [3]. In this Review we outline the advances in our understanding of these new metabolic players, focusing on the emerging data concerning hematopoietic stem cells.

2. Crucial role of immune components in metabolic homeostasis

Several lines of evidence underscore the close relationship between metabolism and immunology in WAT. Indeed, an abundant and heterogeneous immune cell population is co-localized with adipocytes in WAT [4]. In mice, as in humans, these immune cells account for 30–40% of the stroma-vascular fraction, and therefore for almost 20% of the total cells in WAT, in both subcutaneous and visceral fat pads. Considering the large amount of WAT in the body, immune cells present in this tissue may play a crucial role in immunity and physiopathology. In physiological conditions, innate and adaptive immune cells fulfil important housekeeping functions [5], among which the clearance of apoptotic adipocytes, extracellular matrix modeling, angiogenesis, adipogenesis and the preservation of insulin sensitivity in lean subjects [6].

The immune composition of WAT is regulated both by acute and chronic stimuli including diet, body weight status, cold exposure, and feeding and fasting [4]. Seminal works in 2003 have demonstrated that obesity is associated with a low-grade inflammation

* Corresponding author. STROMALab, UMR 5273 CNRS/UPS/EFS/Inserm U1031, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France.

E-mail address: beatrice.cousin@inserm.fr (B. Cousin).

and an increase in macrophage population [7,8]. Numerous reports have since demonstrated that in obesity the number and phenotype of WAT resident immune cells is altered, contributing to metabolic dysfunctions [9]. Obesity and insulin-resistance have the capacity to skew immune cells from anti-inflammatory subtypes toward more pro-inflammatory subtypes. This includes a switching of macrophage polarization from M2-like cells to more pro-inflammatory M1-like cells and the loss of regulatory T cells in WAT [10,11]. The local effects of these compositional changes during obesity drive WAT inflammation and influence the capacity of adipocytes to store lipid, their insulin sensitivity, the systemic glucose metabolism, and metabolic homeostasis [4]. In contrast, studies on animal models show that whatever the method used, the resolution of inflammation prevents or almost invariably delay the onset of obesity and/or insulin resistance [12]. Moreover, in humans, weight loss in obese patients resulted in marked reductions of inflammatory cells in WAT, and an improvement in insulin sensitivity [13]. Metabolism and inflammation are thus tightly connected in WAT, and an ever-increasing body of work demonstrates that reciprocal interactions between metabolic systems and subsets of cells of the immune system have pivotal roles in the pathogenesis of obesity-associated diseases. For example, the severity of metabolic disorder observed in obese people directly correlates with the amount of WAT myeloid and lymphoid cells [7,14–16].

Metabolic disorders do not only induce low grade inflammation in WAT, they are also associated with disorders in circulating leukocytes. Indeed, in humans, obesity and insulin resistance are associated with an increase in peripheral blood white blood cell and of inflammation parameters such as the C-reactive protein [17–21] parameters that decrease after gastric bypass surgery [22]. In mice, leptin-deficient *ob/ob* mice as well as *db/db* mice, which have an inactive leptin receptor, have a reduced lymphocyte number in peripheral blood [23,24]. An association between blood leukocyte count and diabetes risk has also been recently suggested [25,26]. Moreover, published data suggest that obesity and insulin resistance also impair adaptive immune response, leading to altered response to pathogens [4,27]. Given the crucial role of leukocytes in the development of metabolic diseases, it is logical to assume that leukocyte production is altered by disease states.

3. Metabolic disorders and bone marrow hematopoiesis

Circulating blood cells as well as tissue resident immune cells are produced via the tightly regulated process of hematopoiesis that produces billions of new leukocytes and erythrocytes each day. Indeed, the lifespan of individual cell types varies tremendously, ranging from a few hours for certain granulocytes, to many years for classes of lymphocytes, including memory T-cells. The classical hematopoietic ontogeny has long been described as hierarchical system originating in the hematopoietic stem cell (HSC) that differentiates into myeloid and lymphoid lineages through a series of proliferative, lineage-restricted progenitor cells, culminating in terminal, mature myeloid and lymphoid elements [28] (Fig. 1). HSCs, as other stem cells, are defined by their ability to self-renew, and to differentiate into multiple lineages.

In adult mammals, the bone marrow (BM) is described as a complex architecture wherein a rare population of HSC and progenitor cells occupy a specific micro-environment (niche) composed of multiple cell types, including osteoblastic, perivascular, endothelial and mesenchymal cells as well as adipocytes. In addition, the BM functions as a primary and secondary lymphoid organ and hosts various mature immune cell types, including T and B cells, dendritic cells and macrophages that contribute to the HSC niche [29,30]. Last, HSCs are not randomly located in the BM, but

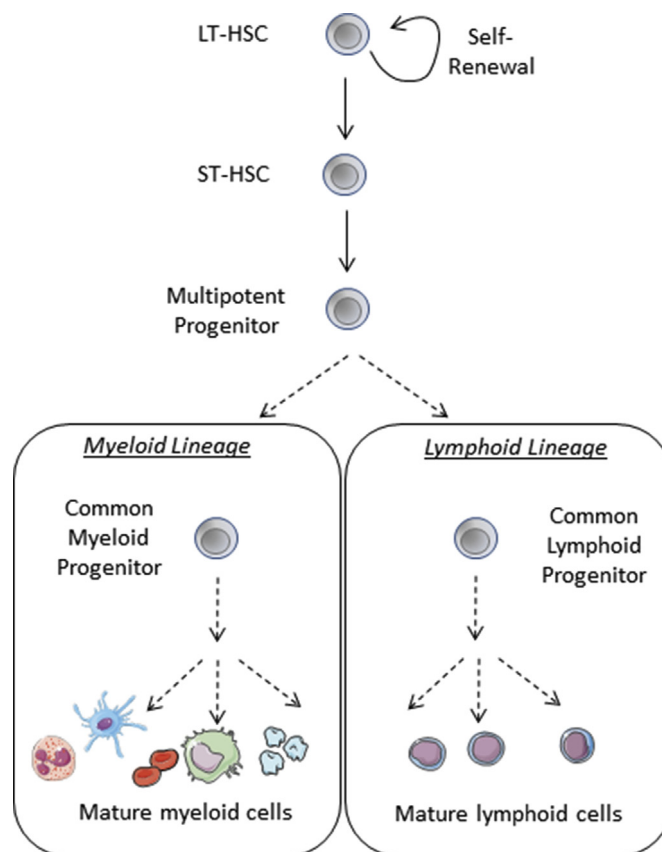


Fig. 1. Schematic representation of hematopoietic process. LT-HSC: Long-Term Hematopoietic Stem Cells; ST-HSC: Short-Term Hematopoietic Stem Cells.

have differentiation stage-specific or age-specific positions, and their positioning exposes them to differing conditions. One hypothesis holds that the positioning corresponds to the heterogeneity of the HSC pool in term of cell cycling or responsiveness to mobilization signals [31].

The precise integrated mechanisms that underlie HSC fate decisions are the purpose of many studies, and it is generally accepted that these decisions are regulated by both intrinsic factors and extrinsic cues provided by their niches [32]. Indeed, a large and still not fully characterized repertoire of molecules ranging from cell surface receptors through signal transduction molecules and a myriad of transcription factors are now recognized for their regulatory roles in HSCs. Among these so-called “intrinsic regulators”, transcription factors have attracted much attention given their essential roles in the initial development, expansion and maintenance of HSC, but also in the development of pathologies such as leukemia [33–35]. In parallel, signals derived from the HSC niche are necessary to regulate demand-adapted responses of HSCs and progenitor cells throughout life. Indeed, the HSC niche comprises a number of important signaling pathways, an array of adhesive molecules and many soluble cytokines. The interplay between these components predominantly keeps HSCs in a quiescent state, but can also accelerate mature blood cell replenishment in cases of urgent need, such as during infection or excessive blood loss. A great number of molecules described in the adult BM niche display functions as HSC regulators, overlapping in function or interacting with each other to modulate HSC behavior [36]. The discovery that perturbations of the HSC niche can lead to hematopoietic disorders, has outlined the crucial role of this niche in the control of HSC activity and thus on immune cell formation [37].

Interestingly, although adipocytes are very abundant cells in the BM, their role in hematopoiesis has not been clearly defined [38]. Mature medullar adipocytes are capable of supporting both lymphopoiesis and myelopoiesis [39,40]. These fat cells are known to secrete a number of proteins, or adipokines, that play a role in hematopoiesis [41,42]. Among them, leptin has been shown to be required for normal lymphopoiesis by differentially regulating the proliferation of naïve and memory T-cells [23,43], and is able to stimulate the proliferation of myelocytic progenitors [44,45]. Provision of recombinant leptin to ob/ob mice promoted both lymphopoiesis and myelopoiesis in the BM [46]. More recently, adiponectin that is secreted by medullar adipocytes has been identified as a novel HSC growth factor. It increases the proliferation of HSC while retaining them in a functionally immature state, via its receptors that are expressed by HSC [47]. Adiponectin can also negatively and selectively influence lymphopoiesis through induction of prostaglandin synthesis [48].

The roles that BM plays in the etiology of metabolic diseases have been largely overlooked. It is known that protein malnutrition results in pathological changes that are associated with peripheral leukopenia, BM hypoplasia and alterations in the BM microenvironment leading to hematopoietic failure [49,50].

Recent data however suggest that pathological states associated with metabolic dysfunction and inflammation have repercussions on HSC population number and/or function in the BM, and thus in turn on blood cell production [51,52]. Indeed, new studies in mice, rats, and humans reveal that diabetes leads to multiple bone marrow microenvironment defects, such as small vessel disease, nerve terminal pauperization, impaired stem cell mobilization, and significant deterioration of cytokine expression patterns, leading to decrease in the number of HSC in the BM, and increased myelopoiesis [53–58].

In obese animals the progressive adiposity of bone marrow influences the fate selection of progenitor populations and disrupts their viability [59], ultimately impairing hematopoietic reparative and regenerative potential. Indeed, obese animals such as ob/ob mice have a reduction in the number of BM cells and smaller thymuses compared to lean mice [46], but increased numbers of circulating monocytes and neutrophils [60]. Only a few studies have studied the effect of high fat diet (HFD)-induced obesity on hematopoietic process, with conflicting results, although an increase of BM adiposity is clearly described. Both rapid dysregulation of B-cell populations that results from diminished cellular differentiation [61] and enhancement of hematopoiesis and lymphopoiesis [62] are reported, but these studies differ by the diet protocol. Consistent with data on ob/ob mice, leukocytosis and neutrophilia have also been described in HFD-rodents together with a granulopoiesis in the BM due to an increase in G-CSF production by stromal cells [60,63,64].

A explanation for this excess of myeloid cells in obesity has been proposed by Nagareddy et al. in two recent studies. Indeed, the authors placed the alarmins S100A8/A9 as the central local inflammatory signal, inducing both the release of IL-1b and the secretion of GM-CSF by macrophages and neutrophils. These factors promoted corrupted hematopoiesis that in turn contribute to monocytosis [57,60].

If the effect of metabolic diseases on hematopoiesis is now established, the inverse relationship is also studied. Indeed, BM transplantation has been performed in patients with type 1 diabetes for many years. It was based on immune ablation aimed to destroy self-reacting immune cells, and regeneration of a new functional immune system in which immune tolerance could normally effect [65]. Similar strategies have been used in patients with type 2 diabetes with positive results [66]. In animals, data were mostly obtained from chimeric mice models: in streptozotocin-

induced diabetic mouse, an improvement of metabolic parameters is achieved after transplantation of non-diabetic BM cells, although hematopoietic parameters were not analyzed [67–70]. Moreover, engraftment of purified medullar HSC is sufficient to block the development of type 1 diabetes, demonstrating the crucial role of immune cells in the development of this pathology [71]. On the contrary, transplantation of BM isolated from NOD mice transfer type 1 diabetes into non-disease recipient mice [68,72,73]. In contrast, after transplantation of wild type-BM in db/db mice, most of the animals remained diabetic [74]. The role of BM cells in the etiology of metabolic disorders has been further decrypted by using transgenic mice harboring a genetic alteration in a relevant pathway as donor cells. For example, HSC from obese mice demonstrated the sustained capacity to preferentially generate inflammatory CD11c + WAT macrophage accumulation after serial BM transplantation, suggesting that HFD primes hematopoietic progenitors contributing to WAT inflammation [75].

Altogether, these data suggest that medullar hematopoiesis is altered in metabolic diseases and conversely that this impairment is involved in their etiology. However, this hypothesis may be challenged by another one considering an alternative source of immune cells.

4. Adipose tissue hematopoietic stem cells and their potential role in metabolic diseases

In steady-state as in pathological conditions, it is admitted that inflammatory cells infiltrating the WAT arise from other sites, such as the BM via blood circulation. This ability of BM-HSC to generate WAT immune cells has been demonstrated by injecting BM cells into lethally irradiated mice, suggesting that hematopoietic cells present in WAT are derived from BM [7,8,76]. However, several observations can challenge this view. First, in the seminal study demonstrating BM-derived macrophage infiltration in WAT of obese mice, 15% of these macrophages did not derive from BM [7]. Second, it must be noted that although BM-HSC can reconstitute the WAT hematopoietic compartment in irradiated mice, they never reconstitute the entire immune compartment as in control animals [77]. Last, several arguments are in favor of the presence of hematopoietic progenitors in WAT. We first showed that subcutaneous WAT-stroma-vascular fraction (SVF) exhibits hematopoietic regenerative potential [78]. Indeed, injection of SVF cells in lethally irradiated mice allows their survival and the reconstitution of normal blood cell levels. Different studies over the last decade demonstrated that WAT contains multiple progenitors which, in various *in vitro* or *in vivo* conditions, may differentiate into endothelial and/or hematopoietic cells [79–81]. We first demonstrated that sorted c-Kit + Lin- Sca-1+ (KLS) cells from subcutaneous WAT are able to differentiate *in vitro* and *in vivo* into mature immune cells [81]. More recently, we demonstrated that these HSC cells exhibit functional features of stem cells such as self-renewal and multipotency. In addition, these HSC present an antigen phenotype similar to medullar HSC, repopulate all the major hematopoietic lineages in long term reconstitution assays (even when injected in competition with BM-HSC), and differentiate very efficiently into Natural Killer and myeloid cells [77]. Thus, innate immune cells present in subcutaneous WAT may be renewed *in situ*, via WAT HSC differentiation (Fig. 2). In addition, we have recently shown that WAT specific hematopoietic activity may be generalized to all adipose deposits, although with specificity according to the fat pad location. Indeed, the intrinsic hematopoietic activity was lower in visceral compared to subcutaneous WAT, due to the specificity of the microenvironment in each fat pad. This means that in visceral WAT (in contrast to subcutaneous fat), a significant part of the immune cells originates from the BM [82]. The conclusions drawn

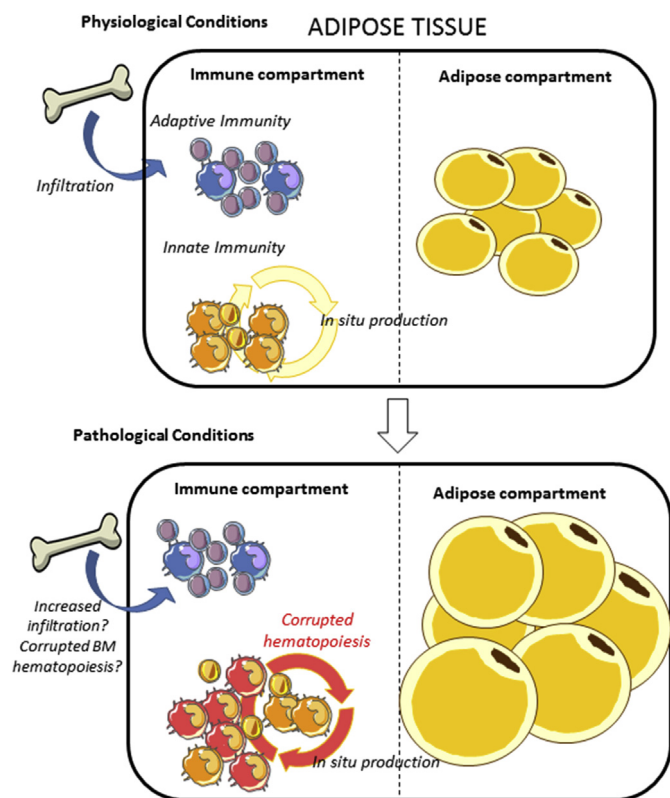


Fig. 2. Origin of immune populations in WAT. WAT probably contains immune cells from different tissue origins (bone marrow and adipose tissue), and according to their origin these immune cells could have specific activity. Indeed, adaptive immune cells would infiltrate the tissue originating from bone marrow, although innate immune cells would be produced *in situ* by an endogenous hematopoietic process. In obesity, perturbation of WAT hematopoiesis could be one of the mechanisms leading to WAT inflammation and metabolic disorders. BM: bone marrow.

from studies using BM transfer must now be reconsidered, taking into account the presence of this peculiar HSC population in WAT.

The presence of HSC in fat pads is not surprising, considering the microenvironment provided by WAT. Indeed, beside mature adipocytes, WAT contains numerous stromal cells that can support myeloid and lymphoid differentiation *in vitro* and HSC engraftment *in vivo* [83–86]. Human subcutaneous adipose cells have been shown to support complete differentiation of hematopoietic progenitors [87]. In addition, WAT constitutively expresses and secretes cytokines such as CXC-chemokine ligand 12 (CXCL12; SDF1) and adhesion molecules such as endothelial-cell (E)-selectin [88–91] that are important for HSC mobilization, homing, and engraftment. Altogether these data support the idea that WAT could be considered not only as an immunological [4] but as an hematopoietic organ.

WAT probably contains immune cells from different tissue origins, and according to their origin these immune cells could have specific activity and/or responsiveness. Such a complexity has been recently established for tissue macrophages [92]. One can thus propose that WAT hematopoiesis contributes to maintain WAT homeostasis in physiological states. Whether this WAT hematopoietic activity could play a role in pathological situations and adapt to metabolic changes remains an open question. However, several results obtained in our lab support this hypothesis. In a competitive repopulation assay with WAT-HSC, we demonstrated that the increase in macrophage number observed in WAT of HFD mice is mainly due to an increased production of macrophage by WAT-HSC and not to an infiltration from circulating monocytes

(Cousin B., personal data). This modification in WAT hematopoietic activity may be due to changes in WAT-HSC microenvironment. Indeed, it is well known that obesity and diabetes are associated with adipocyte hypertrophy and WAT hyperplasia, and with modification of adipokine secretion [93,94], that could in turn target intrinsic WAT hematopoiesis. We thus postulate that the accumulation in inflammatory cells in obese WAT is at least in part due to a perturbation of WAT hematopoiesis (Fig. 2), and therefore that this component has to be taken into account in the development of therapeutic strategies.

5. Conclusions

Our understanding of WAT biology has recently undergone considerable evolution. This began with the identification of a large, heterogeneous population of immune cells within the tissue and the demonstration of the crucial role of these cells in the development of metabolic diseases. Then the assimilation of WAT as a hematopoietic organ has raised the complexity level of this organ and opens a large field of questions. Indeed, the involvement of WAT HSC in metabolic disease remains to be confirmed, and the dynamic interactions between immune cells originating from BM or WAT requires further investigations to understand the specific and respective role of each population in WAT homeostasis. Answer to these questions should help us to better understand the complex metabolic pathways and to identify new therapeutic targets.

Disclosure of potential conflicts of interest

The authors indicate no potential conflicts of interest.

Acknowledgments

Our research was supported by a grant from “Société Franco-phonie du Diabète” and Région Midi-Pyrénées (CYTOSTEM-APRTCN-2013).

References

- [1] G. Ailhaud, Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome, *C R Biol.* 329 (2006) 570–577 discussion 653–5.
- [2] P. Wang, E. Mariman, J. Renes, et al., The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue, *J. Cell. Physiol.* 216 (2008) 3–13.
- [3] D. Mathis, S.E. Shoelson, Immunometabolism: an emerging frontier, *Nat. Rev. Immunol.* 11 (2011) 81.
- [4] R.W. Grant, V.D. Dixit, Adipose tissue as an immunological organ, *Obesity (Silver Spring)* 23 (2015) 512–518.
- [5] A. Schaffler, J. Scholmerich, Innate immunity and adipose tissue biology, *Trends Immunol.* 31 (2010) 228–235.
- [6] H.S. Schipper, B. Prakken, E. Kalkhoven, et al., Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism, *Trends Endocrinol. Metab.* 23 (2012) 407–415.
- [7] S.P. Weisberg, D. McCann, M. Desai, et al., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue, *J. Clin. Invest.* 112 (2003) 1796–1808.
- [8] H. Xu, G.T. Barnes, Q. Yang, et al., Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance, *J. Clin. Invest.* 112 (2003) 1821–1830.
- [9] N. Ouchi, J.L. Parker, J.J. Lugus, et al., Adipokines in inflammation and metabolic disease, *Nat. Rev. Immunol.* 11 (2011) 85–97.
- [10] M. Feuerer, L. Herrero, D. Cipolletta, et al., Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters, *Nat. Med.* 15 (2009) 930–939.
- [11] C.N. Lumeng, J.L. Bodzin, A.R. Saltiel, Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 175–184.
- [12] B. Brooks-Worrell, R. Narla, J.P. Palmer, Biomarkers and immune-modulating therapies for type 2 diabetes, *Trends Immunol.* 33 (2012) 546–553.
- [13] G.R. Romeo, J. Lee, S.E. Shoelson, Metabolic syndrome, insulin resistance, and roles of inflammation—mechanisms and therapeutic targets, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32 (2012) 1771–1776.
- [14] S. Nishimura, I. Manabe, M. Nagasaki, et al., CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity, *Nat. Med.* 15 (2009) 914–920.

- [15] D.A. Winer, S. Winer, L. Shen, et al., B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies, *Nat. Med.* 17 (2011) 610–617.
- [16] H. Yang, Y.H. Youm, B. Vandanmagsar, et al., Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic inflammation and insulin resistance, *J. Immunol.* 185 (2010) 1836–1845.
- [17] J.M. Olefsky, C.K. Glass, Macrophages, inflammation, and insulin resistance, *Annu. Rev. Physiol.* 72 (2010) 219–246.
- [18] M.A. Farhangi, S.A. Keshavarz, M. Eshraghian, et al., White blood cell count in women: relation to inflammatory biomarkers, haematological profiles, visceral adiposity, and other cardiovascular risk factors, *J. Health Popul. Nutr.* 31 (2013) 58–64.
- [19] A.A. Nanji, J.B. Freeman, Relationship between body weight and total leukocyte count in morbid obesity, *Am. J. Clin. Pathol.* 84 (1985) 346–347.
- [20] R.E. Pratley, C. Wilson, C. Bogardus, Relation of the white blood cell count to obesity and insulin resistance: effect of race and gender, *Obes. Res.* 3 (1995) 563–571.
- [21] E. Ryder, M. Diez-Ewald, J. Mosquera, et al., Association of obesity with leukocyte count in obese individuals without metabolic syndrome, *Diabetes Metab. Syndr.* 8 (2014) 197–204.
- [22] R.M. Dallal, J. Leighton, A. Trang, Analysis of leukopenia and anemia after gastric bypass surgery, *Surg. Obes. Relat. Dis.* 8 (2012) 164–168.
- [23] B.D. Bennett, G.P. Solar, J.Q. Yuan, et al., A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis, *Curr. Biol.* 6 (1996) 1170–1180.
- [24] R. Faggioni, J. Jones-Carson, D.A. Reed, et al., Leptin-deficient (ob/ob) mice are protected from T cell-mediated hepatotoxicity: role of tumor necrosis factor alpha and IL-18, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 2367–2372.
- [25] C. Lorenzo, A.J. Hanley, S.M. Haffner, Differential white cell count and incident type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis Study, *Diabetologia* 57 (2014) 83–92.
- [26] G. Twig, A. Afek, A. Shamiss, et al., White blood cells count and incidence of type 2 diabetes in young men, *Diabetes Care* 36 (2013) 276–282.
- [27] J.J. Milner, M.A. Beck, The impact of obesity on the immune response to infection, *Proc. Nutr. Soc.* 71 (2012) 298–306.
- [28] M.W. Lensch, An evolving model of hematopoietic stem cell functional identity, *Stem Cell. Rev.* 8 (2012) 551–560.
- [29] A. Wilson, A. Trumpp, Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches, *Nat. Rev. Immunol.* 6 (2006) 93–106.
- [30] T. Sugiyama, T. Nagasawa, Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells, *Inflamm. Allergy Drug Targets* 11 (2012) 201–206.
- [31] J. Hoggatt, D.T. Scadden, The stem cell niche: tissue physiology at a single cell level, *J. Clin. Invest* 122 (2012) 3029–3034.
- [32] I.H. Oh, R.K. Humphries, Concise review: multidimensional regulation of the hematopoietic stem cell state, *Stem Cells* 30 (2012) 82–88.
- [33] N. Novershtern, A. Subramanian, L.N. Lawton, et al., Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis, *Cell* 144 (2011) 296–309.
- [34] S.H. Orkin, L.I. Zon, Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology, *Cell* 132 (2008) 631–644.
- [35] N.K. Wilson, S.D. Foster, X. Wang, et al., Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators, *Cell. Stem Cell.* 7 (2010) 532–544.
- [36] H. Cao, A. Oteiza, S.K. Nilsson, Understanding the role of the microenvironment during definitive hemopoietic development, *Exp. Hematol.* 41 (2013) 761–768.
- [37] D.S. Krause, D.T. Scadden, F.I. Preffer, The hematopoietic stem cell niche—home for friend and foe? *Cytom. B Clin. Cytom.* 84 (2013) 7–20.
- [38] J.M. Gimble, C.E. Robinson, X. Wu, et al., The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update, *Bone* 19 (1996) 421–428.
- [39] J. Corre, V. Planat-Benard, J.X. Corberand, et al., Human bone marrow adipocytes support complete myeloid and lymphoid differentiation from human CD34 cells, *Br. J. Haematol.* 127 (2004) 344–347.
- [40] J.M. Gimble, M.A. Dorheim, Q. Cheng, et al., Adipogenesis in a murine bone marrow stromal cell line capable of supporting B lineage lymphocyte growth and proliferation: biochemical and molecular characterization, *Eur. J. Immunol.* 20 (1990) 379–387.
- [41] P. Laharrague, A.M. Fontanilles, J. Tkaczuk, et al., Inflammatory/haematopoietic cytokine production by human bone marrow adipocytes, *Eur. Cytokine Netw.* 11 (2000) 634–639.
- [42] P. Laharrague, D. Larrouy, A.M. Fontanilles, et al., High expression of leptin by human bone marrow adipocytes in primary culture, *FASEB J.* 12 (1998) 747–752.
- [43] G.M. Lord, G. Matarese, J.K. Howard, et al., Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression, *Nature* 394 (1998) 897–901.
- [44] P. Laharrague, J.M. Oppert, P. Brousset, et al., High concentration of leptin stimulates myeloid differentiation from human bone marrow CD34+ progenitors: potential involvement in leukocytosis of obese subjects, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 24 (2000) 1212–1216.
- [45] Y. Umemoto, K. Tsuji, F.C. Yang, et al., Leptin stimulates the proliferation of murine myelocytic and primitive hematopoietic progenitor cells, *Blood* 90 (1997) 3438–3443.
- [46] K. Claycombe, L.E. King, P.J. Fraker, A role for leptin in sustaining lymphopoiesis and myelopoiesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 2017–2021.
- [47] L. DiMascio, C. Voermans, M. Ugoezwa, et al., Identification of adiponectin as a novel hemopoietic stem cell growth factor, *J. Immunol.* 178 (2007) 3511–3520.
- [48] T. Yokota, C.S. Meka, T. Kouro, et al., Adiponectin, a fat cell product, influences the earliest lymphocyte precursors in bone marrow cultures by activation of the cyclooxygenase-prostaglandin pathway in stromal cells, *J. Immunol.* 171 (2003) 5091–5099.
- [49] M.C. Cunha, S. Lima Fda, M.A. Vinolo, et al., Protein malnutrition induces bone marrow mesenchymal stem cells commitment to adipogenic differentiation leading to hematopoietic failure, *PLoS One* 8 (2013) e58872.
- [50] J.G. Xavier, M.E. Favero, M.A. Vinolo, et al., Protein-energy malnutrition alters histological and ultrastructural characteristics of the bone marrow and decreases haematopoiesis in adult mice, *Histol. Histopathol.* 22 (2007) 651–660.
- [51] B.J. Adler, K. Kaushansky, C.T. Rubin, Obesity-driven disruption of haematopoiesis and the bone marrow niche, *Nat. Rev. Endocrinol.* 10 (2014) 737–748.
- [52] H. Kojima, J. Kim, L. Chan, Emerging roles of hematopoietic cells in the pathobiology of diabetic complications, *Trends Endocrinol. Metab.* 25 (2014) 178–187.
- [53] H. Chiba, K. Ataka, K. Iba, et al., Diabetes impairs the interactions between long-term hematopoietic stem cells and osteopontin-positive cells in the endosteal niche of mouse bone marrow, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 305 (2013) C693–C703.
- [54] G.P. Fadini, F. Ferraro, F. Quaini, et al., Concise review: diabetes, the bone marrow niche, and impaired vascular regeneration, *Stem Cells Transl. Med.* 3 (2014) 949–957.
- [55] F. Ferraro, S. Lympieri, S. Mendez-Ferrer, et al., Diabetes impairs hematopoietic stem cell mobilization by altering niche function, *Sci. Transl. Med.* 3 (2011), 104ra101.
- [56] C.J. Loomans, E.J. de Koning, F.J. Staal, et al., Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes, *Diabetes* 53 (2004) 195–199.
- [57] P.R. Nagareddy, A.J. Murphy, R.A. Storzaker, et al., Hyperglycemia promotes myelopoiesis and impairs the resolution of atherosclerosis, *Cell. Metab.* 17 (2013) 695–708.
- [58] A. Orlandi, E. Chavakis, F. Seeger, et al., Long-term diabetes impairs repopulation of hematopoietic progenitor cells and dysregulates the cytokine expression in the bone marrow microenvironment in mice, *Basic Res. Cardiol.* 105 (2010) 703–712.
- [59] O. Naveiras, V. Nardi, P.L. Wenzel, et al., Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment, *Nature* 460 (2009) 259–263.
- [60] P.R. Nagareddy, M. Kraakman, S.L. Masters, et al., Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytosis in obesity, *Cell. Metab.* 19 (2014) 821–835.
- [61] B.J. Adler, D.E. Green, G.M. Pagnotti, et al., High fat diet rapidly suppresses B lymphopoiesis by disrupting the supportive capacity of the bone marrow niche, *PLoS One* 9 (2014) e90639.
- [62] M.D. Trottier, A. Naaz, Y. Li, et al., Enhancement of hematopoiesis and lymphopoiesis in diet-induced obese mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 7622–7629.
- [63] M. Cortez, L.S. Carmo, M.M. Rogero, et al., A high-fat diet increases IL-1, IL-6, and TNF-alpha production by increasing NF-kappaB and attenuating PPAR-gamma expression in bone marrow mesenchymal stem cells, *Inflammation* 36 (2013) 379–386.
- [64] L.S. do Carmo, M.M. Rogero, E.J. Paredes-Gamero, et al., A high-fat diet increases interleukin-3 and granulocyte colony-stimulating factor production by bone marrow cells and triggers bone marrow hyperplasia and neutrophilia in Wistar rats, *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 238 (2013) 375–384.
- [65] P. Chhabra, K.L. Brayman, Stem cell therapy to cure type 1 diabetes: from hype to hope, *Stem Cells Transl. Med.* 2 (2013) 328–336.
- [66] C. Fotino, C. Ricordi, V. Lauriola, et al., Bone marrow-derived stem cell transplantation for the treatment of insulin-dependent diabetes, *Rev. Diabet. Stud.* 7 (2010) 144–157.
- [67] S. Ikehara, H. Ohtsuki, R.A. Good, et al., Prevention of type I diabetes in non-obese diabetic mice by allogeneic bone marrow transplantation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82 (1985) 7743–7747.
- [68] D.M. LaFace, A.B. Peck, Reciprocal allogeneic bone marrow transplantation between NOD mice and diabetes-nonsusceptible mice associated with transfer and prevention of autoimmune diabetes, *Diabetes* 38 (1989) 894–901.
- [69] H. Li, C.L. Kaufman, S.S. Boggs, et al., Mixed allogeneic chimerism induced by a sublethal approach prevents autoimmune diabetes and reverses insulinitis in nonobese diabetic (NOD) mice, *J. Immunol.* 156 (1996) 380–388.
- [70] C.L. Lv, J. Wang, T. Xie, et al., Bone marrow transplantation reverses new-onset immunoinflammatory diabetes in a mouse model, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7 (2014) 5327–5336.
- [71] G.F. Beilhack, Y.C. Scheffold, I.L. Weissman, et al., Purified allogeneic hematopoietic stem cell transplantation blocks diabetes pathogenesis in NOD mice, *Diabetes* 52 (2003) 59–68.
- [72] D.V. Serreze, E.H. Leiter, S.M. Worthen, et al., NOD marrow stem cells adoptively transfer diabetes to resistant (NOD x NON)F1 mice, *Diabetes* 37 (1988) 252–255.
- [73] L.S. Wicker, B.J. Miller, A. Chai, et al., Expression of genetically determined diabetes and insulinitis in the nonobese diabetic (NOD) mouse at the level of bone marrow-derived cells. Transfer of diabetes and insulinitis to nondiabetic

- (NOD X B10) F1 mice with bone marrow cells from NOD mice, *J. Exp. Med.* 167 (1988) 1801–1810.
- [74] M. Flaquer, M. Franquesa, J. Barquinero, et al., Bone marrow transplantation induces normoglycemia in a type 2 diabetes mellitus murine model, *Transpl. Proc.* 41 (2009) 2282–2285.
- [75] K. Singer, J. DelProposto, D.L. Morris, et al., Diet-induced obesity promotes myelopoiesis in hematopoietic stem cells, *Mol. Metab.* 3 (2014) 664–675.
- [76] S. Bour, S. Caspar-Bauguil, Z. Iffu-Soltesz, et al., Semicarbazide-sensitive amine oxidase/vascular adhesion protein-1 deficiency reduces leukocyte infiltration into adipose tissue and favors fat deposition, *Am. J. Pathol.* 174 (2009) 1075–1083.
- [77] S. Poglio, F. De Toni, D. Lewandowski, et al., In situ production of innate immune cells in murine white adipose tissue, *Blood* 120 (2012) 4952–4962.
- [78] B. Cousin, M. Andre, E. Arnaud, et al., Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301 (2003) 1016–1022.
- [79] J. Han, Y.J. Koh, H.R. Moon, et al., Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells, *Blood* 115 (2010) 957–964.
- [80] M.D. Minana, F. Carbonell-Uberos, V. Mirabet, et al., IFATS collection: identification of hemangioblasts in the adult human adipose tissue, *Stem Cells* 26 (2008) 2696–2704.
- [81] S. Poglio, F. De Toni-Costes, E. Arnaud, et al., Adipose tissue as a dedicated reservoir of functional mast cell progenitors, *Stem Cells* 28 (2010) 2065–2072.
- [82] E. Luche, C. Sengenès, E. Arnaud, Differential hematopoietic activity in White adipose tissue depending on its localization, *J. Cell. Physiol.* (2015 May 18), <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.25045> (Epub ahead of print).
- [83] F. De Toni, S. Poglio, A.B. Youcef, et al., Human adipose-derived stromal cells efficiently support hematopoiesis in vitro and in vivo: a key step for therapeutic studies, *Stem Cells Dev.* 20 (2011) 2127–2138.
- [84] G.E. Kilroy, S.J. Foster, X. Wu, et al., Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors, *J. Cell. Physiol.* 212 (2007) 702–709.
- [85] S.J. Kim, H.H. Cho, Y.J. Kim, et al., Human adipose stromal cells expanded in human serum promote engraftment of human peripheral blood hematopoietic stem cells in NOD/SCID mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329 (2005) 25–31.
- [86] N. Nakao, T. Nakayama, T. Yahata, et al., Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells facilitate hematopoiesis in vitro and in vivo: advantages over bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Am. J. Pathol.* 177 (2010) 547–554.
- [87] J. Corre, C. Barreau, B. Cousin, et al., Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors, *J. Cell. Physiol.* 208 (2006) 282–288.
- [88] D.A. De Ugarte, Z. Alfonso, P.A. Zuk, et al., Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow, *Immunol. Lett.* 89 (2003) 267–270.
- [89] U. Kintscher, M. Hartge, K. Hess, et al., T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 (2008) 1304–1310.
- [90] H.M. Russo, K.J. Wickenheiser, W. Luo, et al., P-selectin glycoprotein ligand-1 regulates adhesive properties of the endothelium and leukocyte trafficking into adipose tissue, *Circ. Res.* 107 (2010) 388–397.
- [91] C. Sengenès, A. Miranville, M. Maumus, et al., Chemotaxis and differentiation of human adipose tissue CD34+/CD31- progenitor cells: role of stromal derived factor-1 released by adipose tissue capillary endothelial cells, *Stem Cells* 25 (2007) 2269–2276.
- [92] F. Ginhoux, S. Jung, Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis, *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014) 392–404.
- [93] Y. Deng, P.E. Scherer, Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1212 (2010) E1–E19.
- [94] N. Klöting, M. Bluher, Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome, *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 15 (2014) 277–287.

ORIGINAL ARTICLE

Identification of the ectoenzyme CD38 as a marker of committed preadipocytes

A Carrière¹, Y Jeanson¹, J-A Côté², C Dromard¹, A Galinier^{1,3}, S Menzel⁴, C Barreau¹, S Dupuis-Coronas¹, E Arnaud¹, A Girusse¹, V Cuminetti¹, J Paupert¹, B Cousin¹, C Sengenès¹, F Koch-Nolte⁴, A Tchernof² and L Casteilla¹

BACKGROUND/OBJECTIVES: Characterisation of the adipocyte cellular lineage is required for a better understanding of white adipose tissue homeostasis and expansion. Although several studies have focused on the phenotype of the most immature adipocyte progenitors, very few tools exist to identify committed cells. In haematopoiesis, the CD38 ectoenzyme is largely used to delineate various stages of stem cell lineage commitment. We hypothesise that this marker could be used to identify committed preadipocytes.

METHODS: Complementary strategies including flow cytometry, cell-sorting approaches, immunohistochemistry and primary cultures of murine adipose progenitors isolated from different fat pads of control or high-fat diet exposed C57BL/6 J mice were used to determine the molecular expression profile, proliferative and differentiation potentials of adipose progenitors expressing the CD38 molecule.

RESULTS: We demonstrate here that a subpopulation of CD45⁻ CD31⁻ CD34⁺ adipose progenitors express the cell surface protein CD38. Using a cell-sorting approach, we found that native CD45⁻ CD31⁻ CD34⁺ CD38⁺ (CD38⁺) adipose cells expressed lower CD34 mRNA and protein levels and higher levels of adipogenic genes such as *Pparg*, *aP2*, *Lpl* and *Cd36* than did the CD45⁻ CD31⁻ CD34⁺ CD38⁻ (CD38⁻) population. When cultivated, CD38⁺ cells displayed reduced proliferative potential, assessed by BrdU incorporation and colony-forming unit assays, and greater adipogenic potential. *In vitro*, both CD38 mRNA and protein levels were increased during adipogenesis and CD38⁻ cells converted into CD38⁺ cells when committed to the adipogenic differentiation programme. We also found that obesity development was associated with an increase in the number of CD38⁺ adipose progenitors, this effect being more pronounced in intra-abdominal than in subcutaneous fat, suggesting a higher rate of adipocyte commitment in visceral depots.

CONCLUSIONS: Together, these data demonstrate that CD38 represents a new marker that identifies committed preadipocytes as CD45⁻ CD31⁻ CD34^{low} CD38⁺ cells.

International Journal of Obesity advance online publication, 4 July 2017; doi:10.1038/ijo.2017.140

INTRODUCTION

The resurgence of interest of the scientific community for adipose tissue biology parallels the obesity epidemic and is highlighted by several recent groundbreaking discoveries in the biology of this complex tissue.¹ White adipose tissue (WAT) development can result from both adipocyte hypertrophy (enlargement of existing adipocytes) and adipocyte hyperplasia (increase of adipocyte number owing to the proliferation and/or differentiation of adipose progenitor cells). The extreme plasticity of WAT is also highlighted by its ability to convert into a brown-like adipose tissue, dissipating energy through uncoupling protein-1-mediated thermogenesis.^{2,3} In addition to transdifferentiation of mature white into brown-like adipocytes (also called beige or brite adipocytes),^{4–7} *de novo* differentiation from pre-existing adipose progenitors^{8,9} would be a source of uncoupling protein-1-expressing adipocytes in WAT. Thus, adipose progenitors are key elements for adipose depot formation, maintenance, expansion and plasticity in response to various stimuli.¹⁰ However, much remains unknown about their identity and how they may control adiposity in response to homeostatic and external cues.

Several observations suggest that different subpopulations of adipose progenitors with independent lineages (adult versus developmental progenitors¹¹), differentiation potentials (white versus brown/beige^{9,12–14}) and activities could exist inside the same fat pad.^{10,15–17} Furthermore, it appears that they may exist in various stages of adipocyte lineage commitment.^{18,19} Adipose progenitors, also named adipose-derived stromal cells (ASC), belong to a CD34-positive cell population among the stromal vascular fraction (SVF) of both murine and human WAT, and are negative for haematopoietic (CD45) and endothelial (PECAM1 also named CD31) markers.^{20,21} These cells are multipotent and can give rise to osteoblasts, chondrocytes and adipocytes. They also show important paracrine and immunomodulatory activities, which render them attractive for regenerative medicine.²² Recently, an ASC subset expressing the CD24 antigen has been shown to be capable of generating a functional WAT depot following transplantation into a residual WAT depot of lipodystrophic mice, indicating that the CD24 population contains immature adipose progenitors. Interestingly, CD24 is lost as the cells become committed to adipogenic differentiation.^{18,19}

¹STROMALab, Université de Toulouse, CNRS ERL 5311, EFS, INP-ENVT, Inserm, UPS, Toulouse, France; ²Centre de Recherche de l'UUCPO, Quebec, QC, Canada; ³Laboratoire de Biochimie Nutritionnelle, IFB-Purpan, F- 31 059 Toulouse, Cedex 9, France and ⁴Institute of Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. Correspondence: Dr A Carrière or Professor L Casteilla, STROMALab, Université de Toulouse, EFS, ENVT, Inserm U1031, ERL CNRS 5311, CHU Rangueil, 1 avenue Jean Poulhès Bât L1–2ème étage toulouse Cedex, 31403 Toulouse, France.

E-mail: audrey.carriere-pazat@inserm.fr or louis.casteilla@inserm.fr

Received 14 December 2016; revised 20 April 2017; accepted 28 May 2017; accepted article preview online 14 June 2017

CD38 expression reflects distinct levels of cell immaturity. The more immature human haematopoietic stem cells (HSC) are isolated according to the CD34⁺ CD38⁻ phenotype, as this subset is highly enriched in multipotent progenitor cells, long-term culture initiating cells and long-term reconstituting stem cells.²³ In addition to being a receptor (CD31 is its main ligand), CD38 is a multifunctional ectoenzyme that catalyses the synthesis and hydrolysis of cyclic ADP-ribose from NAD⁺ to ADP-ribose, and thus constitutes a major regulator of intracellular NAD⁺ and Ca²⁺ levels.²⁴ Thus, CD38 has been implicated in the regulation of a wide variety of signalling pathways, mainly studied in haematopoietic cells, where it regulates proliferation, activation and migratory processes.²⁴ Although CD38 has been shown to partly mediate insulin and PPAR γ agonist-induced GLUT4 translocation at the plasma membrane of adipocytes,²⁵ little is known about its role in adipose cell biology. We demonstrate here that a subpopulation of CD45⁻ CD31⁻ CD34⁺ adipose progenitors express the cell surface protein CD38. We found that the CD38⁺ subset, whose percentage is higher in visceral than in subcutaneous fat depots and increases with obesity, was more committed to adipogenesis and less immature than the more proliferative CD38⁻ subset. CD38⁻ cells transformed into CD38⁺ cells during adipocyte differentiation, providing further evidence that CD38 constitutes a new marker for adipogenic commitment.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All experiments were carried out in compliance with European Community legislation (2010/63/UE) and approved by the French ethics committee. Experiments were performed on 6–8-week-old male C57BL/6J mice (Harlan, Gannat, France). Animals were housed in a 12-h light/12-h dark cycles at 21 °C with unrestricted access to water and a standard chow diet (UAR) in a pathogen-free animal facility (US006/CREFRE INSERM/UPS) and were killed by cervical dislocation. For high-fat diet (HFD) experiments, 6-week-old mice were exposed to normal-fat diet (NFD; 10% lipids, D12450H Research Diet) or HFD (45% lipids, D12451 Research Diet).

Table 1. Antibodies used for flow cytometry experiments

Name	Clone	Supplier
CD34-FITC	RAM34	BD Biosciences
CD38-PE	90	BD Biosciences
CD45-PerCp	30-F11	BD Biosciences
CD31-PeCy7	390	BD Biosciences

Table 2. Sequences of primers used for quantitative real-time RT-PCR analyses

Target (murine)	Forward	Reverse
36b4	AGTCGAGGAATCAGATGAGGAT	GGCTGACTTGTTGCTTTGG
Cd38	GGAGAGCCTACCAGAAAGCA	TGTA CTAGTATCTCTGGCAGTTCT
Cd34	GGAGTTCTGCTGGCCATCTT	ATAAGGGTCTTACCCAGCC
Cd24	ACGGAGCGGACATGGGCAGA	TTGGTTGCAGTAAATCTGCGTGGGT
Cebpb	GCGCACCGGGTTTCG	CAGGGCCCCGGTGACA
Cebpd	CGACTTCAGCGCCTACATTG	TGAAGAGGTCGGCGAAGAGT
Cebpa	GAGCCGAGATAAAGCCAAACA	GCGCAGGCGGTATTG
Chop10	GCCAACAGAGGTCACACGC	CCTGGCCATAGA ACTCTGACT
Pparg	AGTGTGAATTACAGCAAATCTGTGTTT	GCACCATGCTCTGGGTCAA
Lpl	ATCTGCAGAAGGGAAAGGACTC	CTCTTGTGTTTGTCCAGTGT
aP2	GATGCCTTTGTGGGAACCTG	GCCATGCCTGCCACTTTC
Cd36	GATGTGGAACCCATAACTGGATTAC	GGTCCCAGTCTCATTAGCCACAGTA
Tmem26	ACCCTGTACATCCACAGAG	TGTTTGGTGAGTCTCTAAGGTC
Cd137	CTCTGTGCTCAAATGGATCAGGAA	TGTGGACATCGGCAGCTACAA

Isolation of SVF cells from murine adipose tissues

SVF of fat pads from 6–8-week-old mice were obtained as previously described.²⁶ Inguinal (ING), epididymal (EPI) and inter-scapular brown adipose tissues (iBAT) were dissected, mechanically dissociated and digested for 30 min at 37 °C with collagenase (collagenase NB 4 Standart Grade from Coger, concentration of 0.4 U/ml diluted in proliferative medium, see below for medium composition) under agitation. After filtration, cells were centrifuged (630 g for 10 min). The pellet defined as SVF was incubated for 5 min in haemolysis buffer (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) and washed by centrifugation in phosphate-buffered saline (PBS). Cells were counted and used for flow cytometric, cell sorting or culture process.

Primary culture of ASCs and adipocyte differentiation

Following centrifugation, murine SVF cells (isolated from a pool of ING fat pads from five mice per experiment) resuspended in proliferative medium (α MEM plus 0.25 U/ml amphotericin, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 0.016 mM biotin, 100 μ M ascorbic acid, 0.018 mM pantothenic acid and 10% new-born calf serum (NCS)) were plated (10000 cells/cm²) and rinsed with PBS 3 h after plating. Adherent ASC were grown to confluence in proliferative medium. At confluence, ASC were exposed to an adipogenic cocktail containing 5 μ g/ml insulin, 2 ng/ml T3, 33.3 nM dexamethazone, 10 μ g/ml transferrin and 1 μ M rosiglitazone in complete medium. Cells were cultured at 37 °C (5% CO₂). The medium was changed every 2–3 days all along the culture process. Cells were harvested at the time points indicated in the figure legends.

Flow cytometry and cell sorting

Freshly isolated SVF cells (isolated from fat pads from one mouse per experiment) were stained with 5% new-born calf serum-PBS containing FcR blocking reagent (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Phenotyping was performed by immunostaining with conjugated rat anti-mouse antibodies and compared with isotype-matched control antibodies (Table 1). Cells were washed and analysed on a FACSCanto II or LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences). Data were acquired with FACSDiva software (BD Biosciences). Data analysis was performed using Kaluza software (Beckman Coulter, Roissy CDG, France).

For ASC cell-sorting experiments, SVF cells from ING fat pads (collected from 20 mice per experiment) were stained with fluorescein isothiocyanate-conjugated CD34, PeCy7-conjugated CD31, PerCP-conjugated CD45 and PE-conjugated CD38 antibodies. Cells negative for CD45 and CD31 were gated, and CD34⁺ CD38⁻ and CD34⁺ CD38⁺ cells were sorted (ARIA FUSION SORP, BD Biosciences). The purity of the enrichments determined by flow cytometry is shown in Supplementary Figure S1.

Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation

Sorted CD45⁻ CD31⁻ CD34⁺ CD38⁻ or CD38⁺ cells were plated in proliferative medium and treated with BrdU (10 μ M) for 5 days to get an optimal BrdU incorporation and signal. Cells were then stained using the BrdU Flow kits (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA). Cell staining was analysed on a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences). Data were

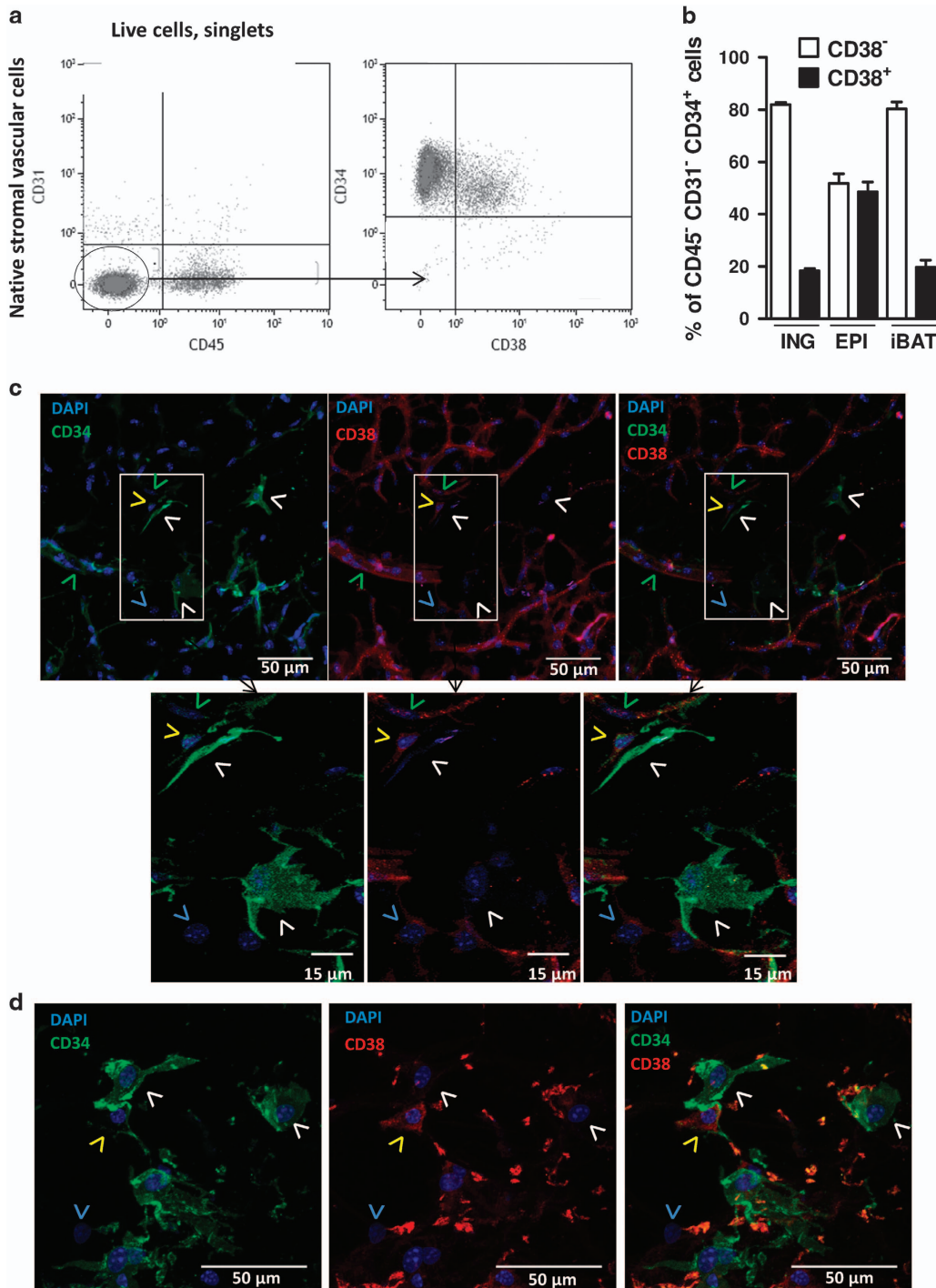


Figure 1. A subset of CD45⁻ CD31⁻ CD34⁺ cells from murine adipose stromal vascular fraction expresses CD38. **(a)** Flow cytometry was performed on inguinal (ING) SVF to identify CD34⁺ CD38⁺ cells in the CD45⁻ CD31⁻ population gated on singlet live cells. Dot plots are representative of 13 independent animals. **(b)** Percentage of CD45⁻ CD31⁻ CD34⁺ CD38⁻ (white bars) and CD45⁻ CD31⁻ CD34⁺ CD38⁺ (black bars) cells in ING ($n = 13$), epididymal (EPI, $n = 11$) and inter-scapular brown adipose depots (iBAT, $n = 3$). **(c, d)** Immunostainings of CD34 (green) and CD38 (red) performed on ING sections. Yellow arrow: CD34⁺ CD38⁺ cells. White arrow: CD34⁺ CD38⁻ cells. Blue arrow: CD34⁻ cell. Green arrow: CD34⁺ CD38⁺ cells with endothelial phenotype (aligned cells with flattened nuclei). Nuclei are stained blue. Images are representative of three independent experiments.

acquired with FACSDiva software (BD Biosciences) and analysis was performed using the Kaluza software (Beckman Coulter).

Colony-forming unit fibroblast assay. Sorted CD45⁻ CD31⁻ CD34⁺ CD38⁻ or CD38⁺ cells were seeded in 25 cm² flasks at a concentration of 16 cells/cm² in proliferative medium as previously described.²⁷ After 10 days, cells were washed with PBS and dried at room temperature overnight. The colony-forming unit fibroblasts (CFU-f) were stained with RAL stainer

MCDH (Ral Diagnostics, Martillac, France) and scored under an optical microscope. Colonies were defined as clusters of >50 cells.

RNA extraction and quantitative real-time RT-PCR

Total RNA from either native FACS-sorted or cultivated cells was purified using RNeasy micro-columns. Total RNA of 250–500 ng was reverse-

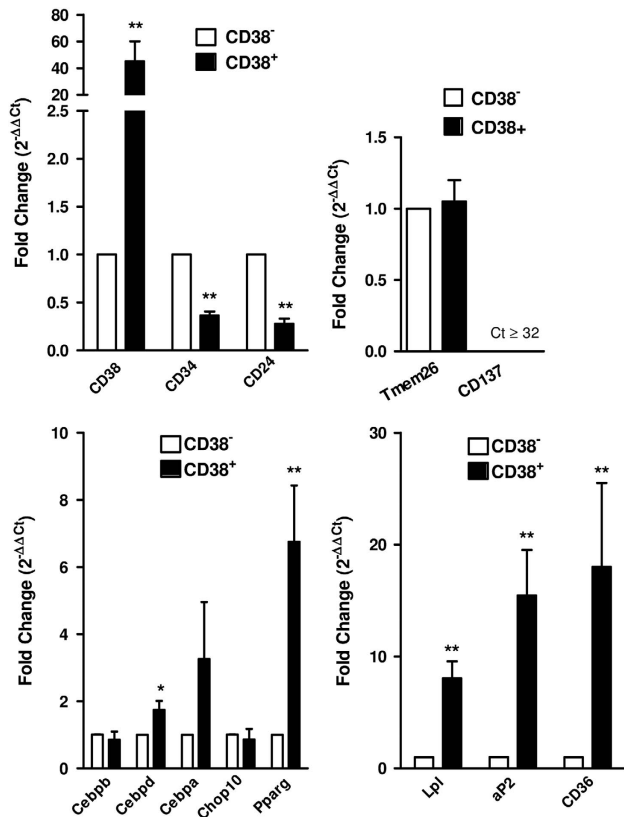


Figure 2. Gene expression in native CD38⁺ and CD38⁻ adipose progenitors. Native CD45⁻ CD31⁻ CD34⁺ CD38⁻ and CD45⁻ CD31⁻ CD34⁺ CD38⁺ subsets were sorted using FACS. Total RNA was then isolated and assayed for mRNA levels of *Cd38*, *Cd34*, *Cd24*, *Tmem26*, *Cd137*, *Cebpb*, *Cebpd*, *Cebpa*, *Chop10*, *Pparg*, *Lpl*, *aP2* and *Cd36* by RT-QPCR. ($n = 5$) * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with CD38⁻ cells.

transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystem, Waltham, MA, USA), SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem), and 0.2 mM primers, on a Viia7TM (Applied Biosystem) instrument. Relative gene expression was determined using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method and normalised to 36B4. The primers are listed in Table 2.

Immunohistochemistry

Adipose tissue sections 300 μ m thick (from ING, EPI and iBAT) were incubated in blocking solution (2% normal horse serum and 0.2% triton X-100 in PBS) for 4 h at room temperature and then incubated with primary antibody against CD38 (1:100, Biolegend, San Diego, CA, USA) and CD34 (1:250, Abcam, Cambridge, UK) for 24 h at room temperature. After several rinses in PBS-0.2% triton X-100, sections were incubated overnight at 4 °C with Alexa 488 conjugated anti-rabbit and Alexa Fluor 594 conjugated anti-rat secondary antibodies (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) and sections were mounted on a coverslip. Imaging was performed using a confocal Laser Scanning microscope (LSM 780, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Image analysis was performed using Fiji software (NIH, Bethesda, MA, USA).

Statistical analysis

The number of independent experiments are detailed in each Figure Legend. Experiments done previously were used to determine sample size with adequate statistical power. No animals or data were excluded. Data collection and analysis were not randomised but performed blind to investigators. All data are expressed as mean \pm s.e.m. A Mann-Whitney statistical test (two-tailed) was used to calculate final P -values using GraphPad Prism software. Differences among groups were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

A subset of CD45⁻ CD31⁻ CD34⁺ cells from murine adipose SVF expresses CD38

Multi-parameter flow cytometry analyses were performed on native cells from the SVF of murine white (subcutaneous ING and visceral EPI) and brown (iBAT) fat pads using anti-CD45, -CD34, -CD31 and -CD38 antibodies. We found that the CD45⁻ CD31⁻ CD34⁺ adipose progenitor population was heterogeneous regarding the expression of the CD38 molecule (Figure 1a). Although CD38⁺ cells made up < 20% of CD45⁻ CD31⁻ CD34⁺ adipose progenitors in both ING and iBAT depots (Figure 1b), this percentage reached ~49% in the murine EPI fat pad (Figure 1b). Immunohistochemistry experiments performed on murine ING fat sections confirmed the existence of fibroblastic CD34⁺ cells expressing the CD38 antigen (Figures 1c and d, yellow arrows). It is noteworthy that CD38⁺ cells expressed CD34 at lower levels compared to the CD38⁻ population, as shown both by flow cytometry (CD34 mean fluorescent intensity for the CD38⁻ subset: 10.3 ± 0.7 ; CD34 mean fluorescent intensity for the CD38⁺ subset: 5 ± 0.3 , Figure 1a) and immunohistochemistry experiments (Figures 1c and d, yellow and white arrows). CD34^{low} CD38^{high} cells were also present in the EPI and iBAT tissue sections (yellow arrow, Supplementary Figure S2). Mature adipocytes did not express CD38, unlike endothelial cells, which were strongly positive for CD38 (Figure 1c, green arrows and Supplementary Figure S3), and a fraction of haematopoietic cells (Supplementary Figure S3).

CD38⁺ adipose progenitors are more committed to adipogenesis than the more immature and proliferative CD38⁻ subpopulation
In order to characterise CD45⁻ CD31⁻ CD34⁺ CD38⁻ and CD38⁺ subpopulations, a cell-sorting approach using FACS was used (the purity of the sorted populations is shown in Supplementary Figure S1). RT-QPCR analyses showed, as expected, enrichment in *Cd38* mRNA levels in the CD38⁺ compared with the CD38⁻ subset (Figure 2). The native CD38⁺ population also displayed lower *Cd34* expression than the CD38⁻ subset (Figure 2), further confirming the flow cytometry and immunohistochemistry findings (Figures 1a,c and d). The expression of *Cd24*, which is expressed by the more immature adipose progenitors,¹⁹ was also significantly lower in the CD38⁺ subset, suggesting that these cells might be less immature than their CD38⁻ counterparts. No difference was found in the gene expression of several members of the CAAT/enhancer binding protein family including *Cebpb*, *Cebpd* or the dominant-negative isoform *Chop10* and of specific markers of brite progenitors such as *Tmem26* and *Cd137*²⁸ (of note *Cd137* was expressed at very low level in each cell subset). However, expression of transcription factors such as *Cebpd* and *Pparg2* as well as several markers of adipocyte differentiation including *Lpl*, *aP2* and *Cd36* were greatly enhanced in the native CD38⁺ subset (Figure 2). The adipogenic potential of the sorted CD38⁻ and CD38⁺ populations was next analysed *in vitro* after induction of adipogenic differentiation. The vast majority of CD38⁺ cells had accumulated lipid droplets 4 days after the addition of the adipogenic cocktail, whereas few adipocytes were detected in the CD38⁻ subset at that time (Figure 3a, left panel). RT-QPCR analyses revealed higher expression of *aP2*, *Lpl* and *Cd36* in the CD38⁺ subpopulation (Figure 3b, right panel). Note that the CD38⁻ subset was able to reach levels of differentiation and adipogenic gene expression similar to those of CD38⁺ cells but after a longer exposure time in the adipogenic cocktail (that is, 7 days, see Supplementary Figure S4), suggesting that CD38⁻ cells were delayed in the adipogenic programme. To investigate the proliferative capacity of the two subpopulations, sorted cells were plated and assessed for BrdU incorporation and for their ability to give rise to colony-forming unit fibroblasts. Figures 3b and c show that the CD38⁺ subset displayed lower BrdU incorporation and

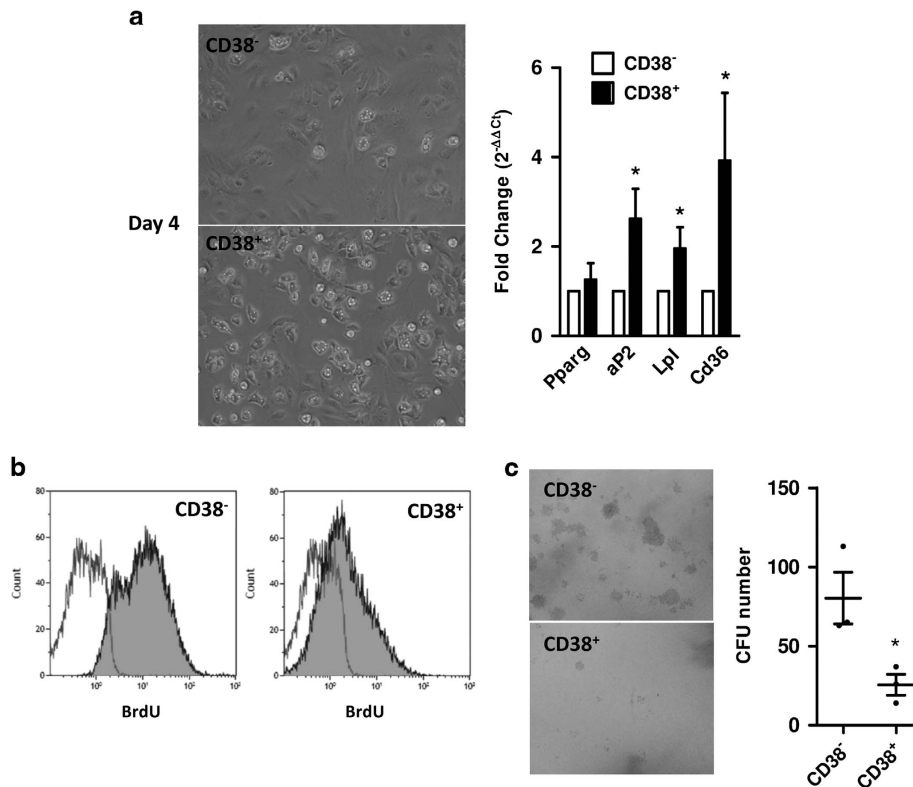


Figure 3. Sorted CD38⁺ subset is more committed to adipogenesis compared to the more immature and proliferative CD38⁻ subpopulation. **(a)** Sorted CD45⁻ CD31⁻ CD34⁺ CD38⁻ and CD45⁻ CD31⁻ CD34⁺ CD38⁺ subsets were plated in adipogenic medium. four days later, lipid accumulation was seen in almost all CD38⁺ cells. Total RNA was isolated and assayed for mRNA levels of *Pparg*, *aP2*, *Lpl* and *Cd36* by RT-QPCR. (*n* = 4) **(b)** Sorted CD45⁻ CD31⁻ CD34⁺ CD38⁻ and CD45⁻ CD31⁻ CD34⁺ CD38⁺ subsets were plated in proliferative medium and incubated with BrdU. Five days later, cells were analysed for BrdU incorporation by flow cytometry. Histograms are representative of three independent experiments. (*n* = 3). **(c)** Sorted CD45⁻ CD31⁻ CD34⁺ CD38⁻ and CD45⁻ CD31⁻ CD34⁺ CD38⁺ subsets were plated in proliferative medium (16 cells/cm² in a 25 cm² flask). Ten days later, CFU were counted. (*n* = 3) **P* < 0.05 compared with CD38⁻ cells.

gave rise to fewer colony-forming unit fibroblasts than the more proliferative CD38⁻ subpopulation. Altogether, these findings demonstrate that native CD38⁺ cells are less immature and more committed to adipogenesis compared with the more proliferative and immature CD38⁻ subset.

CD38 expression increases with adipocyte differentiation

To further study the link between CD38 and adipogenesis, the whole SVF isolated from murine ING fat pad was cultivated and induced to differentiate into adipocytes once cells reached confluence (d0). As shown in Figure 4a, increased expression of the adipogenic markers *Pparg2* and *aP2* was associated with higher *Cd38* mRNA levels 4 and 7 days after induction of differentiation than in undifferentiated cells (d0). Flow cytometry experiments performed in the same conditions showed a large increase in CD38 protein content along with adipogenesis (Figure 4b). Because CD38⁻ cells seemed delayed in the adipogenic programme and because CD38 expression increased during adipogenesis, we then wondered whether CD38⁻ cells became CD38⁺ when committed to adipocyte differentiation. We found that cultivating CD38⁻ sorted cells in the adipogenic medium converted them into CD38⁺ cells, as we detected 19.5 ± 5% and 64.6 ± 8% of CD38⁺ cells in the CD38⁻ cultivated cells after 2 and 5 days, respectively, of culture in adipogenic conditions (Figure 4c). *In vivo*, we next assessed whether adipose tissue expansion was associated with concomitant changes in CD38-expressing adipose progenitors. Mice exposed to a HFD for 8 or 12 weeks showed significant increases in body weight and

white fat pads weights (Supplementary Figure S5). As shown in Figure 4d, while no difference was observed after 8 weeks of HFD, the number of CD45⁻ CD31⁻ CD34⁺ CD38⁺ cells in the ING fat pads was increased in mice submitted for 12 weeks to HFD compared with control mice (NFD). The increase of CD38⁺ cells was faster and more pronounced in the visceral fat pads, as it was already observed after 8 weeks of HFD (Figure 4d). The same trend was observed for the CD38⁻ cell subset (Supplementary Figure S6).

DISCUSSION

The identification and characterisation of adipose progenitors is of crucial interest for our understanding of the cellular and molecular mechanisms regulating adipogenesis. Here, we have identified committed preadipocytes as CD45⁻ CD31⁻ CD34^{low} CD38⁺ cells (Figure 4e). Berry *et al.*^{18,29} recently proposed a model for adipogenesis where loss of CD24 expression was associated with the transition from immature progenitors (that did not express *Pparg2*) to preadipocytes (that expressed *Pparg2*). Our analysis of CD45⁻ CD31⁻ CD34⁺ native cells shows that, compared with CD38⁻ cells, the CD38⁺ subset expressed low *Cd24* and high *Pparg2* levels (as well as additional adipogenic genes), indicating that CD38 is expressed by cells less immature and more committed to adipogenesis. This is supported by the low proliferative capacity and high adipogenic properties of CD38⁺ cells. RT-QPCR, flow cytometry and *in situ* immunofluorescence experiments also showed that the CD38⁺ subset displayed low expression of CD34, known to be lost when preadipocytes

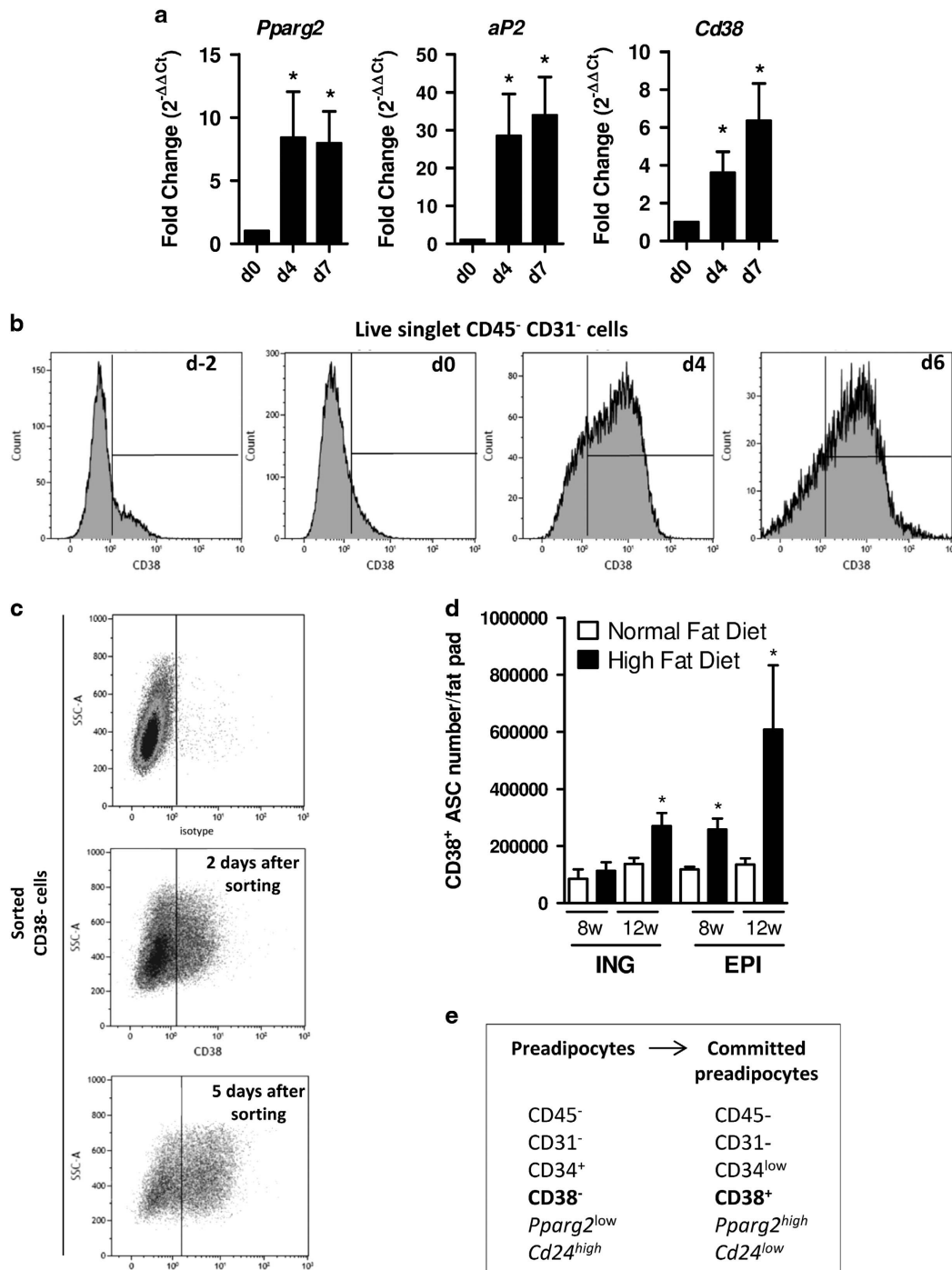


Figure 4. CD38 expression increases during adipogenesis. (a) SVF cells from murine inguinal fat pad were plated in proliferative medium, grown to confluence and either lysed (day 0) or induced to differentiate into adipocytes and lysed at day 4 or day 7. Total RNA was then isolated and assayed for mRNA levels of *Pparg*, *aP2* and *Cd38* by QPCR. $n = 3$ * $P < 0.05$ compared with day 0. (b) SVF cells from murine inguinal fat pad were plated in proliferative medium and harvested 2 days before confluence (d-2), at confluence (d0) and 4 or 6 days after induction of adipocyte differentiation. CD38 expression was analysed by flow cytometry. Histograms are representative of three independent experiments. ($n = 3$). (c) Sorted CD38⁻ cells were plated in adipogenic medium. Two and 5 days later, cells were harvested and analysed for CD38 expression by flow cytometry experiments. Dot plots are representative of three independent experiments. (d) Quantification by flow cytometry of CD45⁻ CD31⁻ CD34⁺ CD38⁺ cell number in the whole SVF of inguinal and epididymal fat pads of mice submitted to normal-fat diet (NFD, 10% lipids) or to high-fat diet (HFD, 45% lipids). ($n = 4-5$ mice per group) * $P < 0.05$ compared with NFD. (e) Schematic representation of the adipocyte cellular lineage. Our findings demonstrate that CD38 expression delineates a subpopulation of cells that are committed to differentiation.

differentiate into mature adipocytes.²⁹ This further reinforces our conclusion that CD38 is expressed by cells committed to the adipogenic programme. The resistance of CD38 knock-out mice to diet-induced obesity is fully consistent with this conclusion.³⁰

Interestingly, CD38⁻ cells become CD38⁺ during the culture process. Such a fluctuation in stem cells markers expression has been already shown including for Sca-1.³¹ Further investigations will be needed to demonstrate whether CD38 is a marker for

multilineage commitment of ASC, as demonstrated for bone marrow progenitor cells³² and whether it is also expressed by ASC committed into brite adipogenesis or into the chondrocyte and osteoblast differentiation pathways.

Although more and more evidence suggest that obesity and associated abnormal glucose and lipid metabolism are associated with modifications of the NADH/NAD⁺ system,^{33,34} the specific molecular components of this pathway involved in diet-induced obesity are not entirely deciphered. However and consistently with our conclusions, high human CD38 expression has been found in adipose tissues of obese/type 2 diabetes subjects.³⁵ Our data revealed a higher percentage of CD38⁺ adipose progenitors in the EPI WAT than in the ING one in steady state, as well as a faster and higher increase in CD38⁺ subset in the EPI pad in HFD fed mice. Because the same trend was observed for CD38⁺ cells, we propose that this proliferative cell subset might be recruited and committed into CD38⁺ cells during the development of adipose tissues in such adipogenic conditions. These results are consistent with the adipocyte hyperplasia phenomenon that was shown to be depot specific and much more pronounced in intra-abdominal than in subcutaneous WAT during obesity development in mice.³⁶ Given that CD38 defines committed preadipocytes, one can reasonably postulate that higher CD38 expression reflects a higher rate of adipogenesis in visceral versus subcutaneous adipose tissues.

This study reveals CD38 as a new marker of commitment into adipocyte differentiation. Analysis of CD38 expression could thus help to detect the appearance of hyperplasia and therefore might provide an index for adipose tissue expandability, a key determinant in protection against the metabolic syndrome associated with obesity.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Adriouch (Faculté de Médecine et de Pharmacie, Inserm U905, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale, Université de Rouen, France), Dr Lund (Charles H. McCauley Professor and Chair Department of Microbiology, University of Alabama, Birmingham, United States) and Dr Pisani and Amri (Institut de Biologie Valrose, CNRS UMR7277, Inserm U1091, UNS Université Nice Sophia Antipolis, France) for fruitful discussions. We are grateful to the I2MC/UMR1048, GeT (Génome et Transcriptome) Platform, Génopole Toulouse. We also thank Dr D'Angelo and Zanoun for assistance and advice with imaging (Cellular Imaging Facility Rangueil-I2MC/TRI Platform). The authors thank the US006/CREFRE INSERM/UPS (Toulouse, France) and specifically the zootechnical core facility for animal care and the Toulouse RIO Imaging. We thank Mrs Zakaroff-Girard and Riant (Cytometry Core Facility, Inserm U1048, part of TRI Imaging Platform, Genotoul) for cell-sorting technical assistance. We especially thank Mrs Ducos for excellent technical assistance as well as Mrs Renoud, Achard, André and Mr De Vecchi (STROMALab) for their help in experiment management. This work was supported by the European Union Framework Programme 7 projects DIABAT [grant number HEALTH-F2-2011-278373] and METABOSTEM [grant number PCIG9-GA-2011-293720].

REFERENCES

- 1 Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell* 2014; **156**: 20–44.
- 2 Kajimura S, Spiegelman BM, Seale P. Brown and beige fat: physiological roles beyond heat generation. *Cell Metab* 2015; **22**: 546–559.
- 3 Jeanson Y, Carrière A, Casteilla L. A new role for browning as a redox and stress adaptive mechanism? *Front Endocrinol (Lausanne)* 2015; **6**: 158.
- 4 Rosenwald M, Perdikari A, Rulicke T, Wolfrum C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol* 2013; **15**: 659–667.
- 5 Smorlesi A, Frontini A, Giordano A, Cinti S. The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. *Obes Rev* 2012; **13**(Suppl 2): 83–96.

- 6 Cousin B, Bascands-Viguerie N, Kassis N, Nibelink M, Ambid L, Casteilla L et al. Cellular changes during cold acclimation in adipose tissues. *J Cell Physiol* 1996; **167**: 285–289.
- 7 Lee YH, Petkova AP, Konkar AA, Granneman JG. Cellular origins of cold-induced brown adipocytes in adult mice. *FASEB J* 2015; **29**: 286–299.
- 8 Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med* 2013; **19**: 1338–1344.
- 9 Lee YH, Petkova AP, Mottillo EP, Granneman JG. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by beta3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab* 2012; **15**: 480–491.
- 10 Berry DC, Jiang Y, Graff JM. Emerging roles of adipose progenitor cells in tissue development, homeostasis, expansion and thermogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 2016; **27**: 574–585.
- 11 Jiang Y, Berry DC, Tang W, Graff JM. Independent stem cell lineages regulate adipose organogenesis and adipose homeostasis. *Cell Rep* 2014; **9**: 1007–1022.
- 12 Long JZ, Svensson KJ, Tsai L, Zeng X, Roh HC, Kong X et al. A smooth muscle-like origin for beige adipocytes. *Cell Metab* 2014; **19**: 810–820.
- 13 Vishvanath L, MacPherson KA, Hepler C, Wang QA, Shao M, Spurgin SB et al. Pdgfrbeta+ mural preadipocytes contribute to adipocyte hyperplasia induced by high-fat-diet feeding and prolonged cold exposure in adult mice. *Cell Metab* 2016; **23**: 350–359.
- 14 Berry DC, Jiang Y, Graff JM. Mouse strains to study cold-inducible beige progenitors and beige adipocyte formation and function. *Nat Commun* 2016; **7**: 10184.
- 15 Pevsner-Fischer M, Levin S, Zipori D. The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. *Stem Cell Rev* 2011; **7**: 560–568.
- 16 Phinney DG. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy. *J Cell Biochem* 2012; **113**: 2806–2812.
- 17 Baer PC. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: an update on their phenotype in vivo and in vitro. *World J Stem Cells* 2014; **6**: 256–265.
- 18 Berry R, Rodeheffer MS. Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo. *Nat Cell Biol* 2013; **15**: 302–308.
- 19 Rodeheffer MS, Birsoy K, Friedman JM. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell* 2008; **135**: 240–249.
- 20 Maumus M, Peyrafitte JA, D'Angelo R, Fournier-Wirth C, Bouloumie A, Casteilla L et al. Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int J Obes (Lond)* 2011; **35**: 1141–1153.
- 21 Sengenes C, Lolmede K, Zakaroff-Girard A, Busse R, Bouloumie A. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol* 2005; **205**: 114–122.
- 22 Casteilla L, Planat-Benard V, Bourin P, Laharrague P, Cousin B. [Use of adipose tissue in regenerative medicine]. *Transfus Clin Biol* 2011; **18**: 124–128.
- 23 Xiao M, Dooley DC. Cellular and molecular aspects of human CD34+ CD38- precursors: analysis of a primitive hematopoietic population. *Leuk Lymph* 2000; **38**: 489–497.
- 24 Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E et al. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev* 2008; **88**: 841–886.
- 25 Song EK, Lee YR, Kim YR, Yeom JH, Yoo CH, Kim HK et al. NAADP mediates insulin-stimulated glucose uptake and insulin sensitization by PPARgamma in adipocytes. *Cell Rep* 2012; **2**: 1607–1619.
- 26 Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibelink M, Tamarat R et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004; **109**: 656–663.
- 27 Dromard C, Bourin P, Andre M, De Barros S, Casteilla L, Planat-Benard V. Human adipose derived stroma/stem cells grow in serum-free medium as floating spheres. *Exp Cell Res* 2011; **317**: 770–780.
- 28 Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 2012; **150**: 366–376.
- 29 Berry R, Jeffery E, Rodeheffer MS. Weighing in on adipocyte precursors. *Cell Metab* 2014; **19**: 8–20.
- 30 Barbosa MT, Soares SM, Novak CM, Sinclair D, Levine JA, Aksoy P et al. The enzyme CD38 (a NAD glycohydrolase, EC 3.2.2.5) is necessary for the development of diet-induced obesity. *FASEB J* 2007; **21**: 3629–3639.
- 31 Goldberg LR, Dooner MS, Deng YH, Papa E, Pereira M, DelTatto M et al. Defining engraftment potential within the lineage positive population in murine marrow. *Blood* 2014; **124**: 21.
- 32 Wiernik P, Goldman J, Dutcher J, Kyle R. Neoplastic diseases of the blood. *Springer Science & Business Media* 2012; **439**: 203–206.

- 33 Canto C, Houtkooper RH, Pirinen E, Youn DY, Oosterveer MH, Cen Y *et al*. The NAD (+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metab* 2012; **15**: 838–847.
- 34 Drew JE, Farquharson AJ, Horgan GW, Williams LM. Tissue-specific regulation of sirtuin and nicotinamide adenine dinucleotide biosynthetic pathways identified in C57Bl/6 mice in response to high-fat feeding. *J Nutr Biochem* 2016; **37**: 20–29.
- 35 Sanjabi B, Dashty M, Ozcan B, Akbarkhanzadeh V, Rahimi M, Vinciguerra M *et al*. Lipid droplets hypertrophy: a crucial determining factor in insulin regulation by adipocytes. *Sci Rep* 2015; **5**: 8816.
- 36 Jeffery E, Church CD, Holtrup B, Colman L, Rodeheffer MS. Rapid depot-specific activation of adipocyte precursor cells at the onset of obesity. *Nat Cell Biol* 2015; **17**: 376–385.

Supplementary Information accompanies this paper on International Journal of Obesity website (<http://www.nature.com/ijo>)

Résumé :

Le tissu adipeux (TA) contient un grand nombre de leucocytes qui jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'activité métabolique du TA. Chez l'individu sain, les leucocytes du TA ont un profil majoritairement anti-inflammatoire (macrophages M2, polynucléaires éosinophiles, lymphocytes T CD4 Th2 et T régulateurs). Chez le sujet obèse, on observe une modification des populations immunitaires vers un phénotype majoritairement pro-inflammatoire (macrophages M1, polynucléaires neutrophiles, lymphocytes T CD8 et T CD4 Th1). Cet état inflammatoire participe au développement du syndrome métabolique. Chez l'adulte, les leucocytes circulants sont principalement produits dans la moelle osseuse (MO) par des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Notre équipe a montré qu'une partie des leucocytes du TA sont produits *in situ* grâce à la présence de CSH tissulaires spécifiques, dont l'activité hématopoïétique diffère selon le dépôt adipeux. Ce résultat suggère que les CSH du TA pourraient être contrôlées par leur niche, comme c'est le cas dans la MO.

Considérant le rôle prépondérant des leucocytes dans la physiopathologie du TA et le rôle des CSH dans ce tissu, les objectifs de cette thèse ont été les suivants : 1) Caractériser le rôle de l'hématopoïèse du TA dans le développement des maladies métaboliques. 2) Caractériser d'un point de vue cellulaire et moléculaire la niche des CSH du TA et la régulation de leur activité par cet environnement. 3) Mettre en évidence et caractériser l'activité hématopoïétique du TA chez l'homme.

Concernant le premier objectif, nos résultats montrent que dans un modèle de diabète induit par un régime riche en gras, les CSH du TA produisent des macrophages pro-inflammatoires ayant un rôle direct dans le développement des altérations de l'homéostasie glucidique. La greffe de CSH du TA issues d'une souris diabétique dans une souris maintenue sous régime standard induit le transfert de la pathologie. Inversement, la greffe de CSH de TA d'une souris saine dans une souris diabétique améliore le phénotype métabolique. Concernant le second objectif, nous montrons que les CSH du TA se localisent préférentiellement dans le cœur du TA sous-cutané, région principalement composée d'adipocytes beiges, alors que la périphérie, constituée d'adipocytes blancs uniloculaires héberge moins de CSH. L'activation ou l'inhibition des adipocytes beiges diminue la quantité de CSH au cœur du tissu, montrant qu'un déséquilibre du métabolisme des adipocytes beiges a un impact sur les CSH, suggérant que ces adipocytes pourraient alors faire partie d'une niche hématopoïétique. Les approches *in vitro* ne nous ont pas permis d'aller plus loin dans la caractérisation des acteurs cellulaires et/ou moléculaires de cette niche. Concernant le troisième objectif, nous montrons pour la première fois la présence de CSH dans le TA chez l'homme. La fonctionnalité de ces CSH a été testée *in vitro* et *in vivo*. En culture en milieu semi-solide, les CSH de TA humain sont capables de donner des clones myéloïdes, comme chez la souris. *In vivo*, chez des souris immuno-déficientes reconstituées avec des CSH de TA humain, on retrouve des cellules immunitaires humaines dans le tissu adipeux, ce qui démontre leur capacité à reconstituer une partie du système immunitaire de ce tissu.

En conclusion, ce travail de thèse a permis de montrer que l'activité hématopoïétique du TA joue un rôle crucial dans le maintien de la balance énergétique. Les CSH du TA résideraient préférentiellement dans une niche localisée au cœur du tissu, composée d'adipocytes beiges. La caractérisation des signaux moléculaires présents dans les différentes zones du TA permettra de proposer de nouvelles hypothèses sur la régulation de l'activité des CSH du TA. Chez l'homme, notre travail a permis de mettre en évidence une hématopoïèse tissulaire endogène au tissu adipeux, renforçant ainsi l'importance physiopathologique de nos précédents résultats obtenus chez la souris.

Mots-clés : Tissu adipeux, Hématopoïèse, Niche, Métabolisme, Diabète

Abstract

The adipose tissue (AT) contains a lot of leukocytes that play a fundamental role in the regulation of AT metabolic activity. In a physiological situation, AT-leukocytes mostly display an anti-inflammatory profile (M2 macrophages, eosinophils, CD4 Th2 T cells and regulatory T cells). Obesity induces a shift in AT immune cells towards a pro-inflammatory phenotype (M1 macrophages, neutrophils, CD8 and CD4 Th1 T cells). This inflammatory state contributes to the development of the metabolic syndrome. In adults, circulating leukocytes are mostly produced in the bone marrow (BM) by hematopoietic stem cells (HSC). A few years ago, we have shown AT harbors a specific resident HSC population that can renew innate immune cells and especially macrophages in the AT, via *in situ* differentiation. This endogenous hematopoietic activity differs according to the localization of the fat pad, suggesting that like BM-HSC, AT HSC might be controlled by their environment.

Considering the important role of leukocytes in the AT physiopathology and the role of resident HSC in this tissue, the objectives of this work were the followings: 1) To characterize the role of the AT hematopoiesis in the onset of metabolic diseases. 2) To characterize the AT HSC niche from a cellular and a molecular point of view, and the regulation of their activity by this environment. 3) To demonstrate the presence of an endogenous AT-hematopoiesis in humans.

First, by using transplantation of sorted AT-HSC and gain and loss of function studies we showed that some of the inflammatory AT-macrophages inducing metabolic disease originate from resident AT-HSC. Transplantation of AT-HSC sorted from high fat diet-fed (HFD) mice is sufficient to induce AT-macrophage accumulation, and to transfer metabolic disease in control mice. Conversely, the transplantation of control AT-HSC improves both AT-inflammation and glucose homeostasis in HFD mice.

Second, we showed that AT-HSC are preferentially localized in the core of sub-cutaneous AT that contains beige adipocytes, instead of the periphery that mostly harbors unilocular white adipocytes. Activation or inhibition of beige adipocytes induces a loss of this preferential localization, suggesting that modifications of the subcutaneous AT core region metabolism impact HSC behavior. This suggests that beige adipocytes might be a part of a hematopoietic niche in the AT. However, we were unable to characterize the cellular and/or molecular constituents of this niche.

Finally, we showed for the first time that as in mice, human AT contains resident HSC. In methylcellulose semi-solid medium, human AT-HSC are able to produce myeloid clones. *In vivo*, after transplantation of human AT-HSC in immunodeficient mice, human immune cells are observed in the AT. These results show that human AT exhibit a functional endogenous hematopoietic activity.

Altogether, we show in this study that the AT hematopoietic activity plays a crucial role in the control of energy balance. Although AT HSC are localized preferentially at the vicinity of beige adipocytes, molecular signals controlling this population remain to be characterized. Finally, we demonstrate for the first time an endogenous hematopoiesis in human AT, highlighting the physiopathological importance of our previous results obtained in mice.

Key words : Adipose tissue, Hematopoiesis, Niche, Metabolism, Diabetes