



HAL
open science

Rôle délétère des macrophages résidents de la moelle osseuse dans la réponse des cellules souches hématopoïétiques aux radiations ionisantes

Marion Chalot

► **To cite this version:**

Marion Chalot. Rôle délétère des macrophages résidents de la moelle osseuse dans la réponse des cellules souches hématopoïétiques aux radiations ionisantes. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Cité, 2021. Français. NNT : 2021UNIP7068 . tel-03624903

HAL Id: tel-03624903

<https://theses.hal.science/tel-03624903>

Submitted on 30 Mar 2022

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 de Doctorat de l'Université de Paris

Spécialité Hématologie

École doctorale n°561 « Hématologie, Oncogénèse et Biothérapies »

Préparée dans le laboratoire

LRTS-Laboratoire de Réparation et Transcription dans les cellules souches hématopoïétiques

CEA – Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire

INSERM U1274 – Niche et Cancer dans l'Hématopoïèse

Rôle délétère des macrophages résidents de la moelle osseuse dans la réponse des cellules souches hématopoïétiques aux radiations ionisantes

Présentée et soutenue publiquement le 16 Mars 2021 par

Marion CHALOT

Sous la co-direction du Dr. Paul-Henri ROMEO

et du Dr. Stéphanie MORENO

Membres du Jury :

Dr. François PARIS	Président	DR	Université de Nantes
Dr. William VAINCHENKER	Rapporteur	DR	Université de Paris-Saclay
Pr. Eric SOLARY	Rapporteur	PU-PH	Université de Paris-Saclay
Dr. Marie-Catherine VOZENIN	Examinatrice	PR	Université de Lausanne
Dr. Michèle GOODHARDT	Examinatrice	DR	Université de Paris
Dr. Paul-Henri ROMEO	Directeur de thèse	DR	Université de Paris
Dr. Stéphanie MORENO	Directrice de thèse	CR	Université de Paris



Except where otherwise noted, this is work licensed under
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier mes rapporteurs, le Dr. William Vainchenker et le Dr. Eric Solary pour avoir accepté la tâche d'évaluer mon manuscrit de thèse. Je remercie également mes examinateurs, le Dr. Marie-Catherine Vozenin et le Dr. Michèle Goodhardt et mon président de jury le Dr. François Paris d'avoir accepté de prendre part à mon jury de thèse. Merci à vous tous d'avoir pris de votre temps pour évaluer mon travail de thèse. Un merci supplémentaire au Dr William Vainchenker et au Dr. Marie-Catherine Vozenin pour leurs nombreux conseils lors de mes comités de suivi de thèse.

Merci également aux institutions qui ont financés ce projet, le CEA et la Fondation pour la Recherche Médicale.

Ce travail n'aurait jamais été possible si je n'avais pas été aussi bien entourée. C'est pourquoi je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont accompagnées au cours de cette aventure.

Tout d'abord un grand merci à mes co-directeurs de thèse, le Dr. Paul-Henri Romeo et le Dr. Stéphanie Moreno.

Merci Paul-Henri de m'avoir accueillie dans ton laboratoire. Toujours exigeant tu m'as poussé à me remettre en question et à être une meilleure scientifique.

Merci Stéphanie de m'avoir encadrée et guidée dans le quotidien des manip et dans la compréhension de mon sujet. Ton sens du détail et ta rigueur ont été un moteur pour le développement du sujet et de ma pensée scientifique. Merci aussi pour toutes les heures de relecture que tu as effectué du rapport de M1 à ce manuscrit de thèse.

Un merci particulier au Dr. Nathalie Gault qui a été pour un temps mon encadrante et qui a réussi à me guider malgré la distance.

Je voudrais aussi remercier les collaborateurs de ce travail. Tout d'abord le Dr. Françoise Hoffschir pour son aide scientifique mais aussi pour nos nombreuses conversations à la fois scientifiques et personnelles. Un grand merci aussi au Dr. Vilma Barroca et à Caroline Devanand pour les nombreuses heures de travail effectuées ensemble, ainsi que les bons moments qui les ont accompagnées.

Merci à ceux qui ont participé à ce travail. Le Dr. Jan Baijer et Nathalie Déchamps pour leur support technique en cytométrie en flux. Véronique Ménard pour son aide technique sur la plateforme d'irradiation ainsi que Lamya Irbah de la plateforme microscopie. Véronique Neuville, Silvia Vincent-Naulleau et les équipes de Charles River puis d'Animalliance pour leur aide dans la gestion de nos souris.

Un grand merci à tous mes collègues du LRTS sans qui ces nombreuses années auraient été beaucoup moins colorées : Daniel Lewandowski, Vanessa Petit, Germain Rousselet, Anne Bravard, Federica Ferri, Claire Torres et Jacqueline Bernardino-Sgherri (alias Mamie JaX) mais aussi les anciens (Giulia Ghinatti, Anne-Sophie Gallouet, Denise Gay, Shohei Murakami, Cécile Mathe, Sabine Le Gouvello, Quy Nguyen...). Une pensée toute particulière à Anais Assouvie et Honorine Dushime mes co-thésardes, compagnes des galères scientifiques et personnelles, des pauses, des fou-rires et des longues soirées au labo. Je suis ravie que la thèse m'est apportée deux nouvelles amies proches.

Merci aussi aux membres du LSHL, tout particulièrement au Dr. Françoise Pflumio qui a suivi mon travail depuis le début et a toujours été disponible pour des conseils scientifiques ou personnels.

Un grand merci à mes co-organisateur du Student Live Forum : Thomas Guerin, Hélène Bordelet, Simon Willaume et Florent Dobe. Merci également à tous les autres thésards pour le soutien, l'aide, les moments complices qui ont permis de rendre inoubliable cette expérience de thèse. Je ne peux malheureusement pas citer tout le monde mais je tenais à remercier spécialement Elia, Florian, Paula, Charly et Rajaa. Je vous souhaite à tous une très bonne continuation !

Un grand merci bien sûr à mes amis les plus proches. Les plus anciens d'abord : Sandro bien sûr (16 ans maintenant et encore plus à venir !), Arthur, Marina, Nico, Elise ... Les joueurs compulsifs Edouard, Titi et Adé. Les rescapés de médecine Alexis, JC, Mathias, Hélène et Maël. Et enfin les globes trotteurs Sofia, Patou et Stéphane. Merci pour votre présence, votre soutien, les soirées et les vacances qui ont été des grandes bouffées d'air frais.

Pour finir un grand merci à ma famille sans qui je ne serais pas là aujourd'hui. Nani en première place, la liste de ce pourquoi je suis reconnaissante est bien trop longue pour être énoncée ici. Merci à la tribu, Papa, Flo, Gaëlle, Emilie, Hugo et Antoine dans leur ordre d'apparition dans ma vie. Patrice, Jeanne-marie, Sophie et Bertrand pour leur présence inconditionnelle. Dominique, Jean-Marc et Pierre pour m'avoir accueillie dans leur famille. Un merci particulier à ceux qui malgré leur absence m'accompagne encore au quotidien.

Pour finir un immense et très spécial merci à Vincent. La thèse a été notre première aventure et j'ai hâte de vivre toutes celles qui suivront avec toi. Je t'aime.

Un grand merci à tous et bonne lecture !

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	3
Liste des figures	5
Liste des abréviations	6
Introduction	11
I. L'hématopoïèse et son microenvironnement	14
A. Hématopoïèse	14
1) Historique et concepts	14
a) Découverte de la cellule souche hématopoïétique	14
b) Hématopoïèse : notion de hiérarchie et modèles	17
2) Ontogenèse du système hématopoïétique murin	20
3) Les Cellules Souches Hématopoïétiques murines	22
a) Caractérisation et méthodes d'études	22
b) Biologie de la CSH	26
B. La niche hématopoïétique	39
1) Les acteurs cellulaires de la niche	39
a) Les populations non hématopoïétiques	39
b) Les populations hématopoïétiques	49
c) L'organisation spatiale de la niche	53
d) Les autres acteurs de la régulation des CSH	56
2) Les macrophages	57
a) Ontogénie des macrophages	57
b) Fonctions des macrophages	61
c) Les macrophages résidents de la moelle osseuse	71
d) Les modèles de déplétion des macrophages résidents de la moelle osseuse	80
II. Les radiations ionisantes	84
A. Définitions et effets biologiques	84
1) Physique des radiations ionisantes	84
a) Les rayonnements gamma	84
b) Les unités de mesure	86
2) Effets moléculaires	86
3) Effets cellulaires	89
a) Les modèles « dose-réponse »	90
b) La théorie de la cible	90
4) Effets cliniques	92
a) Effets stochastiques <i>versus</i> déterministiques	92
b) Effets aigus <i>versus</i> chroniques	93
B. Réponse cellulaire aux radiations ionisantes	93
1) La réponse anti-oxydante	94
a) Antioxydants cellulaires	94

b) Voies de détoxification	95
2) La réponse aux dommages à l'ADN	97
a) Réparation des DSB : NHEJ et HR	97
b) Rôle d'ATM et de p53 dans la DDR	100
3) Mort cellulaire radio-induite	101
a) La sénescence	101
b) L'apoptose	103
c) La nécrose	105
III. Réponse des populations hématopoïétiques aux radiations ionisantes	106
A. Réponse des cellules souches hématopoïétiques	106
1) Stress oxydatif radio-induit	106
2) Réparation des dommages à l'ADN	108
3) Mort cellulaire radio-induite	109
a) La sénescence	109
b) L'apoptose	110
4) Prolifération et différenciation après l'irradiation	111
5) Impact des faibles doses de radiations ionisantes sur les CSH	112
B. Réponse des macrophages	113
1) Etudes <i>in vitro/ex vivo</i>	113
2) Etudes <i>in vivo</i>	114
a) Rôle du génotype dans la réponse des macrophages à l'irradiation	115
b) Balance entre rôles pro- et anti-inflammatoires	115
3) Oxydes nitriques (NO) et peroxy-nitrites	117
Objectifs	120
Résultats	122
Discussion et Perspectives	147
Annexe	161
Références	162

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de l'hématopoïèse.	13
Figure 2 : Historique de la recherche sur la Cellule Souche Hématopoïétique et l'hématopoïèse.	15
Figure 3 : Représentation schématique des différents modèles de hiérarchie hématopoïétique.	18
Figure 4 : Les CSH et leurs micro-environnements pendant la vie fœtale.	21
Figure 5 : Test clonogénique ou Colony Forming Cell assay (CFC).	24
Figure 6 : Les facteurs extrinsèques et intrinsèques régulent le destin des CSH.	27
Figure 7 : Régulation du cycle cellulaire dans les CSH.	28
Figure 8 : Voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR	32
Figure 9 : Régulation métabolique énergétique de la CSH.	34
Figure 10 : Représentation schématique des différentes voies de différenciation des MSC.	42
Figure 11 : Représentation schématique de la niche hématopoïétique.	54
Figure 12 : Les trois vagues de colonisation des tissus par les macrophages.	59
Figure 13 : Représentation des principaux signaux « trouvez-moi » des cellules apoptotiques et nécrotiques.	63
Figure 14 : Représentation des principaux signaux « mangez-moi » des cellules apoptotiques et nécrotiques ainsi que des récepteurs associés sur les cellules phagocytaires.	64
Figure 15 : Représentation schématique des mécanismes de l'endocytose et de la phagocytose.	66
Figure 16 : Représentation schématique de l'activation des lymphocytes T CD4 ⁺ (LT CD4) par une cellule présentatrice d'antigènes (APC).	67
Figure 17 : Illustration des caractéristiques des macrophages classiquement activés (M1) ou alternativement activés (M2).	69
Figure 18 : Représentation schématiques des macrophages résidents de la moelle osseuse.	73
Figure 19 : Les macrophages au centre des îlots érythroblastiques.	74
Figure 20 : L'interaction du récepteur DARC des macrophages et du récepteur CD82 des CSH permet le maintien de la quiescence des CSH.	77
Figure 21 : Phagocytose des clodronate-liposomes par une cellule phagocytaire.	81
Figure 22 : Les trois formes majeures d'interactions entre les rayonnements gamma et la matière.	85
Figure 23 : Effets directs et indirects des radiations ionisantes.	87
Figure 24 : Principales réactions physiques et chimiques se produisant lors de la radiolyse de l'eau.	88
Figure 25 : Diagramme schématique représentant différents modèles dose-réponse des radiations ionisantes.	89
Figure 26 : Représentation schématique de la chaîne de détoxification des ROS.	95
Figure 27 : La régulation du facteur de transcription Nrf2.	96
Figure 28 : Les voies du NHEJ et de la HR.	98
Figure 29 : ATM et p53, des effecteurs centraux de la DDR.	100
Figure 30 : Mécanisme de l'arrêt du cycle cellulaire suite à l'irradiation.	102
Figure 31 : Voies de signalisation extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose.	104
Figure 32 : Réponse transcriptionnelle des macrophages aux radiations ionisantes.	117
Table 1 : Tableau récapitulatif des différentes cellules de la niche hématopoïétique, de leur localisation, de leur rôle et de leurs sécrétions exerçant une action directe sur les CSH.	55

Liste des abréviations

53BP1 : p53 Binding Protein 1	BM : Moelle osseuse
5-FU : Fluorouracile	BMDM : Macrophage dérivé de la moelle osseuse
A2AR : Adenosine 2A Receptor	BMP : Protéine Osseuse Morphogénétique
ABC : ATP Binding Cassette	BRCA : Breast Cancer Susceptibility protein
AEC : Cellule Endothéliale Artériolaire	BSO : L-Butathionine-sulfoximine
AGM : Aorte-Gonade-Mésonéphros	CAF-C : Cobblestone Area Forming Cell
ALN : Biphosphonate Alendronate	CAR : CXCL12-Abundant Reticular
AMPK : Protéine Kinase AMP dépendante	CCL : C-C motif Chemokine Ligand
α -NHEJ : NHEJ alternatif	CD : Cluster de Différenciation
APAF-1 : Apoptotic Peptidase Activating Factor 1	CD40-L : Ligand CD40
APC : Antigen Presentating Cell	CDK : Kinase Cycline-dépendante
aPC : Protéine C activée	CFU-G : Colony Forming Unit-Granulocyte
AppCCI2p : Adénosine 5' ($\beta\gamma$ -dichlorométhylène) triphosphate	CFU-GEMM : Colony Forming Unit-Granulocyte/Erythrocyte/Macrophage/Megakaryocyte
ARE : Elément de réponse antioxydante	CFU-GM : Colony Forming Unit Granulocyte/Macrophage
Aspp : Protéine stimulant l'apoptose de p53	CFU-M : Colony Forming Unit monocyte/macrophage
Atg : Gène relié à l'autophagie	CFU-S : Colony Forming Unit In Spleen
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated	CHK : Kinase Checkpoint
ATP : Adénosine Triphosphate	CIP/KIP : Protéine d'Intéraction CDK/Protéine Inhibitrice de Kinase
ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad-3 related protein	Cited 2 : Cbp/p300 Interacting Transactivator with Glu/Asp Rich Carboxy-Terminal Domain 2
BAI-1 : Brain Specific Angiogenesis Inhibitor 1	CKI : Inhibiteur de complexe Cycline/CDK
BAK : Bcl-2 homologous Antagonist Killer	CLP : Common Lymphoid Progenitor
BatF : Basic leucine zipper ATF-like Transcription Factor	CMP : Common Myeloid Progenitor
BAX : Bcl2-Associated X	c-NHEJ : NHEJ classique
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2	COX-2 : Cyclooxygénase 2
BCL-XL : B-Cell Lymphoma-extra Large	
BER : Réparation par Excision de Base	
BFU-E : Burst Forming Unit-Erythroid	
Bid : BH3 interacting-domain death agonist	

CRP : Protéine C-réactive

CSF1R : Colony Stimulating Factor 1 Receptor

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CSPH : Cellules Souches et Progéniteurs Hématopoïétiques

Cul3 : Cullin 3

CX3CL1 : C-X3-C Motif Chemokine Ligand 1

CXCL12 : C-X-C motif chemokine 12

CXCL4 : C-X-C chemokine Ligand 4

CXCR4 : Récepteur membranaire de la protéine CXCL12

DAMP : Damage Associated Molecular Pattern

DARC : Duffy Antigen/Chemokine Receptor

DC : Cellule Dendritique

DDR : Réponse de Dommages à l'ADN

DETA-NO : Diethylenetriamine/Nitric Oxide adduct

DISC : Complexe de Signalisation Inducteur de mort

Dll1 : Delta Like Non canonical Notch Ligand 1

DNA-PKc : Complexe de la Protéine Kinase dépendante de l'ADN

DPI : Diphenyleneonium

DSB : Cassures Doubles Brins

DTR : Récepteur à la Toxine Diphtérique

DUOX1 : Dual Oxidase 1

EC : Cellule endothéliale

eEF2K : Kinase du facteur d'élongation eucaryote 2

EGF : Endothelial Growth Factor

Egr1 : Early growth response protein 1

EHT : Transition Endothéliale-Hématopoïétique

EIM : Macrophage des îlots érythroblastique

EMP : Progéniteur Erythromyéloïde

EPCR : Endothelial Protein C Receptor

EPO : Erythropoïétine

ERK : Extracellular-signal-Regulated Kinase

Evi1 : Ecotropic viral integration site-1

Exo-1 : Exonucléase 1

FADD : Fas-Associated protein with Death Domain

FAO : Voie d'Oxydation des Acides Gras

FGF : Fibroblast Growth Factor

Flk2 : Fetal liver kinase-2

Flt3 : Fms-like tyrosine kinase 3

Fox : Forkhead Box

Gas6 : Growth arrest specific 6

G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor

GM-CSF : Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages

GMP : Granulocyte/Monocyte Progenitor

GPX1 : Glutathion peroxydase

GSH : Glutathion

Gtl2 : Glycosyltransferase-like Protein

Gy : Gray

H₂ : Hydrogène

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

H₃O⁺ : Ion hydronium

Hif : Facteurs induits par l'hypoxie

HO-1 : Hème Oxygénase 1

HO₂[•] : Radical hydroperoxyl

HR : Recombinaison Homologue

HRG : Glycoprotéine riche en histidine

HSC70 : Heat Shock Cognate 71 kDa protein

ICAM : Intercellular Adhesion Molecule

IDH : Isocitrate Déshydrogénase

IFN-γ : Interféron-gamma

IGF-1 : Insulin-like Growth Factor-1

IL : Interleukine

IL1-RA : IL-1 Receptor Antagonist 1

iNOS : inducible Nitric Oxide Synthase

IRF1 : Interferon Regulatory Factor 1

IT-HSC : Intermediate-Term Hematopoietic Stem Cell

J : Joule

JNK : Kinase c-Jun N-Terminale

Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein 1

Kg : Kilo

KLS : Kit⁺ Lin^{neg} Sca⁺

LECT2 : Leukocyte Cell-derived Chemotaxin-2

LEPR : Récepteur à la Leptine

LKB1 : Kinase hépatique B1

LMPP : Lymphoid Primed Multipotent Progenitor

L-NAME : L-N^G-Nitro arginine methyl ester

L-NNA : Nitroarginine

LNT : Linear Non Threshold

LPC : Lysophosphatidylcholine

LPS : Lipopolysaccharide

LT CD4 : Lymphocyte T CD4

LTB4 : Leucotriène B4

LT-CIC : Long-Term Culture-Initiating Cell

LT-HSC : Long-Term Hematopoietic Stem Cell

LXR : Liver X Receptor

Mac-1 : Antigène Macrophage-1

MAFIA : Macrophage Fas Induced Apoptosis

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MBL : Mannose-Binding Lectin

Mcl-1 : Myeloid leukemia cell differentiation protein

M-CSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor

M-CSFR : Macrophage-CSFR

MD : Myeloid Differentiation factor

MDM2 : Mouse Double Minute 2 homolog

MEC : Matrice Extra-Cellulaire

Meis1 : Meis Homeobox 1

MEP : Megakaryocyte/Erythrocyte Progenitor

Mfn2 : Mitofusin-2

MGFE8 : Milk Fat Globule Epidermal growth factor 8

MGK : Megakaryocyte

MHCII : Major Histocompatibility Complex II

mi-ARN : micro-ARN

MMP9 : Métalloprotéase Matricielle 9

MPL : Myeloproliferative Leukemia Protein

MPP : Multipotent Progenitor

MS5 : Murine Stromal Cells 5

MSC : Mesenchymal Stem Cell

mTOR : Cible de la Rapamycine chez les mammifères

NAC : N-Acetyl-L-Cystéine

NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

N-Cadh : N-Cadhérine

NER : Réparation par Excision de Nucléotide

NFκB : Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NG2 : Antigène Neural/Glial 2

NHEJ : Jonction d'Extrémités Non Homologue

NK : Natural Killer

NO : Oxyde Nitrique

NOS : Nitric Oxyde Synthase

NOX : NADPH Oxydase

NPY : Neuropeptide Y

Nrf2 : Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

O_2^- : Superoxyde

Ogg1 : 8-oxoguanine glycosylase

OH⁻ : Anion hydroxyde

OH[•] : Radical hydroxyle

ONOO⁻ : Peroxynitrite

OPN : Ostéopontine

OXPPOS : Processus de la Phosphorylation Oxydative des mitochondries

PAF : Platelet Activating Factor

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern

PARP : Poly [ADP-ribose] Polymérase

Pbx1 : Pre-B-cell leukemia transcription factor 1

PDGF : Platelet Derived Growth Factor

PDGFR α : Platelet Derived Growth Factor Receptor alpha

PDK : Kinase Pyruvate-Déshydrogénase

PGC1- α : Peroxysome proliferator-activated Receptor gamma coactivator 1-alpha

PGE2 : Prostaglandine E2

PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase

PIP : Phosphatidylinositol

PKc : Sous-unité catalytique de la Protéine Kinase dépendante de l'ADN

PML : Protéine Proleucémie Myéloïde

PP2A : Protéine Phosphatase 2

PPAR δ : Récepteur activé par les proliférateurs du Peroxysome

PPRs : Récepteurs à PTH/PTHrP

ProS : Protéine S

PRR : Pattern Recognition Receptor

PRX1 : Péroxirédoxine 1

PS : Phosphatidyl-Sérine

PTEN : Phosphatase and TENSin homolog

PTH : Hormone Parathyroïdienne

PTHrP : PTH-related protein

PTN : Pléiotrophine

PTP : Pore de Transition de la Perméabilité

PTP ζ : PTN Receptor Tyrosine Phosphatase zeta

PTX3 : Pentraxine 3

Puma : p53 upregulated modulator of apoptosis

Rb : Rétinoblastome

Rheb : Ras homolog enriched in brain

RIC : Régimes de Conditionnement à Intensité réduite

RISP : Rieske Iron-Sulfur Protein

ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène

RPA : Protéine de Réplication A

RTK : Récepteur Tyrosine Kinase

S1P : Sphingosine-1-Phosphate

SASP : Facteurs Sécrétés Associés à la Sénescence

SA- β -gal : Senescence-associated beta-galactosidase

Sca-1 : Stem cell antigen-1

SCARF-1 : Scavenger Receptor Class F member 1

SCF : Stem Cell Factor

Scl : Stem Cell Leukemia

SDF-1 : Stromal cell Derived Factor 1

SEC : Cellule Endothéliale Sinusoïdale

Siglec-1 : Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin 1

SIN-1 : 3-morpholinosydnonimine
 SNC : Système Nerveux Central
 SNO : Spindle shaped N-cadherin⁺ CD45^{neg}
 osteoblastic cell
 SNS : Système Nerveux Sympathique
 SOD : Superoxyde Dismutase
 SP : Side Population
 SRC-3 : Steroid Receptor Coactivator-3
 SSA : Single Strand Annealing
 SSB : Cassures Simples Brins
 Stat-3 : Signal transducer and activator of
 transcription 3
 ST-HSC : Short-Term Hematopoietic Stem Cell
 Sv : Sievert
 TBI : Irradiation corporelle totale
 tBID : Protéine BID activée
 TCR : Récepteur des Cellules T
 TGFβ : Transforming Growth Factor beta
 TLR : Toll Like Receptor
 TMC : 2-trifluoromethyl-2'-methoxychalone
 TNFα : Tumor Necrosis Factor-alpha
 TPO : Thrombopoiétine
 TRAIL : Tumor necrosis-factor Related
 Apoptosis Inducing Ligand
 T^{reg} : Lymphocytes T régulateurs
 TREM2 : Triggering Receptor Expressed on
 Myeloid cells 2
 TSP1 : Thrombospondine
 TTP : Tristetraprolin
 UPR : Mitochondrial Unfolded Proteine
 Response
 V-ATPase : ATPase de type Vacuolaire
 VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion protein 1
 VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
 VLA-4 : Very Late Antigen-4
 XLF : Facteur XRCC4-like
 Xpg : Xeroderma pigmentosum group G
 complementing factor
 α-sma : alpha smooth muscle actin

Introduction

Depuis plusieurs décennies, l'exposition de la population aux radiations ionisantes n'a fait que s'accroître, notamment par l'intermédiaire de l'utilisation grandissante de techniques de diagnostic tel que le CT-Scan, ou de méthodes curatives comme la radiothérapie. Malgré leur efficacité et l'amélioration grandissante des protocoles, le principal inconvénient de ces techniques est l'irradiation des tissus sains qui peut entraîner à court et long-termes de nombreux effets secondaires plus ou moins délétères pour le patient. Au niveau de la cellule, l'exposition aux rayonnements ionisants est connue pour induire divers types de dommages à l'ADN et une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène, les ROS (Reactive Oxygen Species). Ces ROS intracellulaires peuvent entraîner une instabilité génétique, l'oxydation de protéines et/ou la peroxydation de lipides. Selon la dose reçue, ces effets peuvent conduire à court terme, à la défaillance de certains organes et à long-terme, à certaines pathologies comme par exemple des cancer radio-induits (cancer de la thyroïde, leucémies ...).

Le tissu hématopoïétique est l'un des plus radiosensibles de l'organisme. Chez la souris, le syndrome hématopoïétique est généralement la première conséquence d'une irradiation à des doses allant de 1 à 10 Gy (Bolus, 2017). Ce syndrome se manifeste par une déplétion sévère des cellules du sang, mais aussi de la moelle osseuse qui contient les cellules responsables de la formation du tissu sanguin : les cellules souches hématopoïétiques (CSH).

Dans la moelle osseuse, les CSH constituent le réservoir de cellules à l'origine de l'ensemble des cellules sanguines tout au long de la vie d'un individu. Il est donc important de caractériser les effets d'une irradiation sur ces CSH. Il a été montré qu'une irradiation directe des CSH à des doses de rayonnements couramment utilisées en radiothérapie fractionnée, génère des modifications génétiques (Mohrin et al., 2010). Cependant, dans la moelle osseuse, les CSH se trouvent dans un microenvironnement cellulaire appelé niche hématopoïétique. Cette niche a une importance majeure dans la protection et le maintien de l'intégrité des CSH. Toutefois, il a été montré que des doses modérées de rayonnements ionisants peuvent avoir des effets délétères sur cette niche (Mohrin et al., 2010; Shao et al., 2014a). Mon laboratoire de thèse a étudié l'importance du microenvironnement médullaire dans la protection des CSH après irradiation à faibles doses. En utilisant des cytokines inflammatoires induisant la sortie des CSH hors de leur niche hématopoïétique, l'équipe a montré que les effets de ces faibles doses d'irradiation sur les CSH sont dépendants de leur microenvironnement (Rodrigues-Moreira et al., 2017).

Au sein de ce microenvironnement composé de nombreux types cellulaires, on peut distinguer les macrophages résidents de la moelle osseuse, caractérisés par l'expression de la protéine de surface CD169 (Chow et al., 2011). Ceux-ci ont un rôle majeur dans le maintien des CSH dans leur niche. Ils sont résistants à l'irradiation et protègent les CSH lors d'un stress oxydatif en limitant la production de ROS intracellulaires, mais aussi l'apoptose et/ou la sénescence des CSH (Ludin et al., 2012).

Dans ce manuscrit, je présente un résumé de ce qui est actuellement connu sur le tissu hématopoïétique murin et sa réponse aux radiations ionisantes, en me focalisant particulièrement sur les CSH et les macrophages.

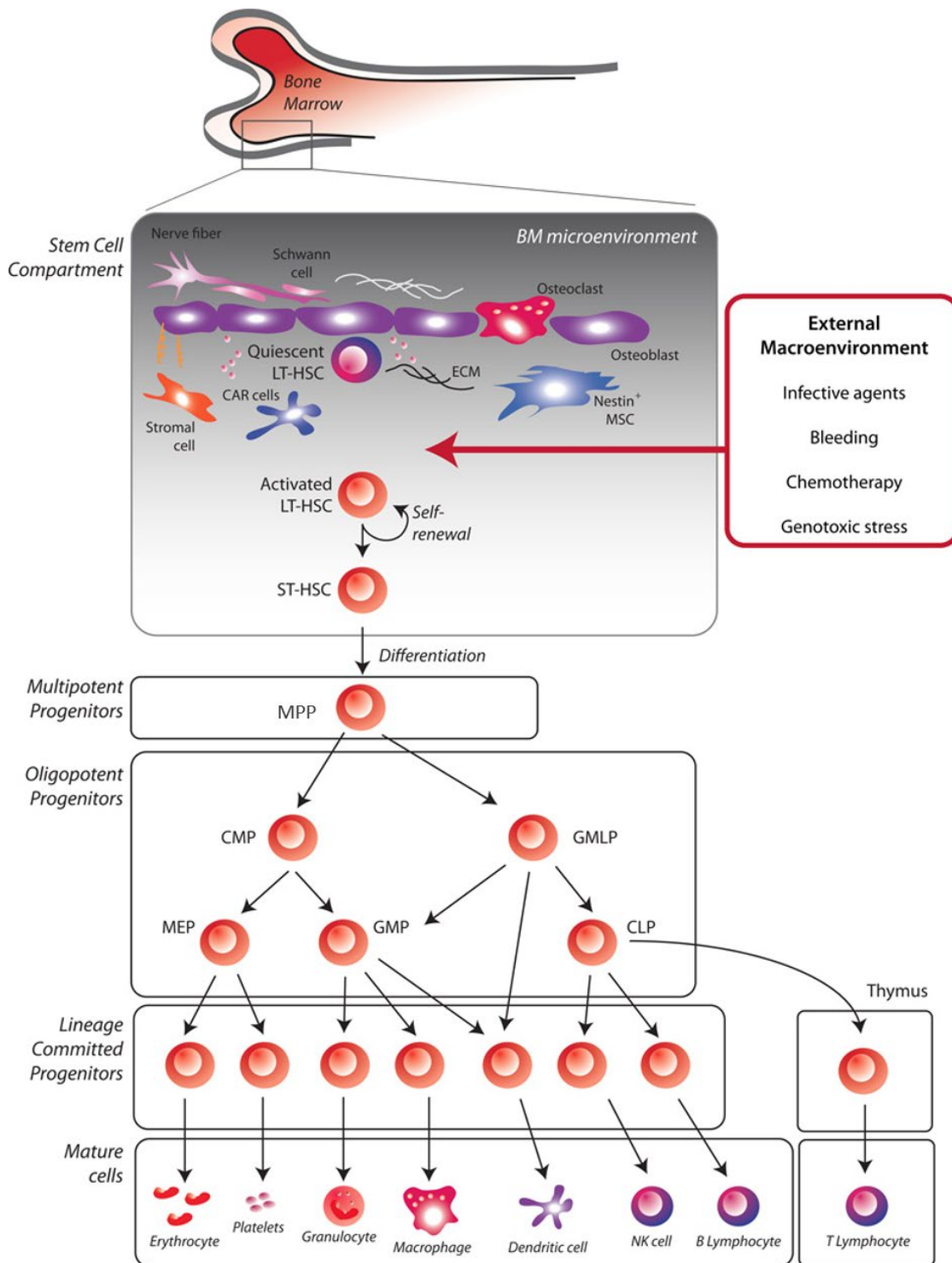


Figure 1 : Représentation schématique de l'hématopoïèse.

Au sein de la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques se trouvent dans un microenvironnement cellulaire appelé niche hématopoïétique. Les signaux extérieurs arrivant au niveau de la niche vont pouvoir activer les CSH et déclencher leur différenciation et/ou leur prolifération. Les différentes étapes de différenciations successives vont entraîner une perte progressive de leur capacité d'auto-renouveler et de leur multipotence et conduire à l'obtention des cellules matures du sang.

Modifiée de (Rossi et al., 2012)

I. L'hématopoïèse et son microenvironnement

L'hématopoïèse est la fonction par laquelle l'organisme produit les cellules sanguines tout au long de la vie d'un individu. Chez l'adulte elle a lieu majoritairement dans la moelle osseuse et permet un renouvellement régulier des cellules matures du sang (environ 10^{11} à 10^{12} cellules néoformées par jour).

Ce processus hiérarchique a pour origine une cellule unique : La Cellule Souche Hématopoïétique (CSH), dont chaque individu possède un réservoir depuis sa naissance. Ces CSH sont capables de s'auto-renouveler afin de maintenir ce réservoir, mais aussi de se différencier en cellules progénitrices qui elles-mêmes se différencieront en cellules matures (**Figure 1**). Au vu de leur rôle central dans le processus hématopoïétique, il est indispensable de maintenir l'intégrité des CSH (nombre et fonctionnalité) sous peine d'entraîner des phénomènes pathologiques au niveau du tissu sanguin (anémie, cancer...).

Dans la moelle osseuse, la régulation du maintien, de la différenciation et de la protection des CSH est majoritairement effectuée par leur microenvironnement cellulaire, appelé niche hématopoïétique. Cette dernière est composée de nombreux types cellulaires différents, chacun impliqué à sa façon dans la régulation des CSH, mais aussi dans la protection de leur intégrité.

A. Hématopoïèse

1) Historique et concepts

a) Découverte de la cellule souche hématopoïétique

C'est au 19^{ème} siècle que la recherche sur les CSH émerge avec le travail de Franz Ernst Christian Neumann qui établit que la moelle osseuse est à la base de la formation du sang. Il est également le premier à poser l'hypothèse, très controversée pour l'époque, qu'une « cellule unique » est à l'origine de toutes les lignées sanguines. Alexander A. Maximow a développé cette théorie d'une cellule commune à la mise en place de l'hématopoïèse, puis ajouta le concept d'une niche micro-environnementale autour de la CSH, au sein de la moelle osseuse (Boisset and Robin, 2012) (**Figure 2**).

Dans les années 1950, les travaux sur le tissu hématopoïétique ont connu un tournant décisif, suite à l'utilisation des armes atomiques. En effet l'étude des effets de l'irradiation sur les tissus sains a mis

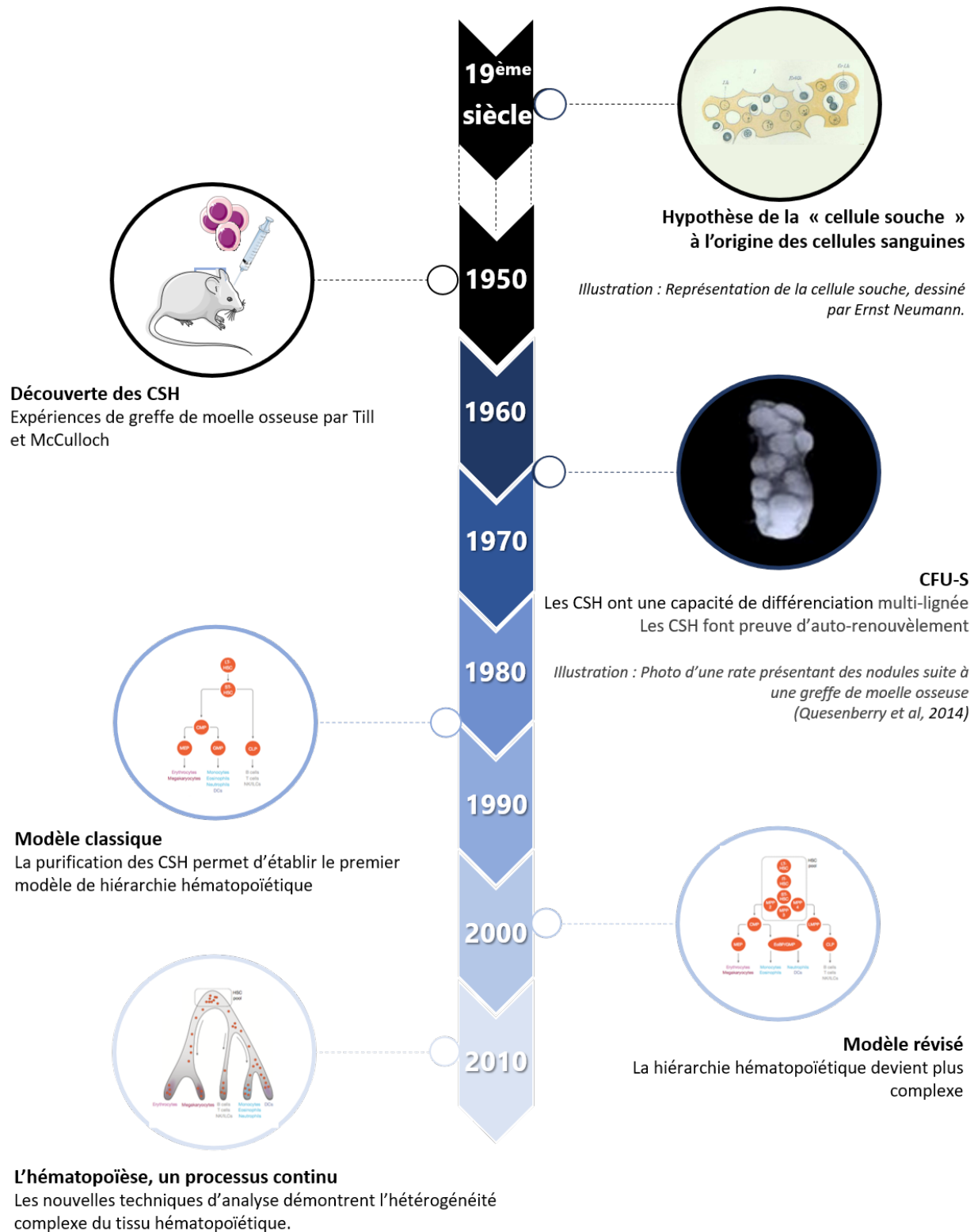


Figure 2 : Historique de la recherche sur la Cellule Souche Hématopoïétique et l'hématopoïèse.

(https://en.wikipedia.org/wiki/Franz_Ernst_Christian_Neumann) et (Quesenberry et al., 2014; Laurenti and Göttgens, 2018)

en évidence que la moelle osseuse était l'un des tissus les plus radiosensibles de l'organisme. Dès lors, de nombreuses études ont été menées afin de mieux comprendre les effets de l'irradiation sur l'hématopoïèse, mais également afin de trouver des alternatives thérapeutiques à la myéloablation radio-induite.

Dans les années 1950, les premières expériences menées dans cette optique thérapeutique ont montré qu'une greffe de moelle osseuse (ou d'un organe hématopoïétique comme la rate) dans des animaux irradiés pouvait permettre la restauration du tissu hématopoïétique ainsi qu'une augmentation de la survie (Lorenz et al., 1951; Ford et al., 1956). Si certaines équipes ont d'abord privilégié la piste d'un facteur extracellulaire, c'est le remplacement intégral des cellules de la moelle osseuse par les cellules du donneur qui a permis de conclure à la présence d'une population cellulaire ayant des capacités de repopulation.

A partir de 1960, James Till et Ernest McCulloch vont démontrer l'existence des cellules souches adultes et plus précisément des cellules souches hématopoïétiques par des expériences de greffe de moelle osseuse après irradiation.

En effet, onze jours après une greffe de moelle osseuse dans des souris irradiées létalement (950 rad), ils ont mis en évidence à la surface de la rate, de petits nodules qu'ils définissent comme des colonies de différentes cellules hématopoïétiques (érythroblastes, cellules myéloïdes et mégacaryocytes). (McCulloch and Till, 1960; Till and McCULLOCH, 1961). En greffant des cellules présentant un caryotype anormal (anomalies chromosomiques induites par irradiation) dans des souris receveuses létalement irradiées, ils vont prouver que ces nodules sont de vrais clones et semblent chacun provenir d'une cellule unique alors appelée Colony Forming Unit in Spleen (CFU-S)(Becker et al., 1963).

Des transplantations secondaires de cellules provenant de ces nodules ont démontré la capacité de certaines de ces cellules « fille » à redonner de nouveaux nodules : c'est la mise en évidence pour la première fois de la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches (Siminovitch et al., 1963).

Une autre caractéristique établie par ces expériences est l'état majoritairement quiescent des CSH (Becker et al., 1965), qui ne semblent entrer en cycle que dans des situations où les cellules sanguines doivent se renouveler.

Plus tard, d'autres études vont montrer que ces nodules semblent capables de se différencier en cellules de la lignée myéloïde (Wu et al., 1967) mais également de la lignée lymphoïde (Wu et al., 1968).

Tous ces travaux ont permis de mettre en évidence la présence dans la moelle osseuse d'une population cellulaire rare, quiescente, capable d'auto-renouvellement et détenant le potentiel de se différencier en cellules des lignées lymphoïde et myéloïde.

La transposition de cette technique *in vivo* de colonies clonales à la surface de la rate, à des cultures *in vitro* (Bradley and Metcalf, 1966) a également permis d'identifier des CFU présentant des capacités de prolifération et de différenciation hétérogènes (Wu et al., 1968; Worton et al., 1969).

Ceci a permis d'identifier un stade intermédiaire de différenciation entre les cellules souches et les cellules matures : les progéniteurs.

Cette découverte a aidé à introduire le concept de hiérarchie hématopoïétique avec à son sommet les cellules souches hématopoïétiques, responsables de la formation de toutes les cellules sanguines matures.

b) Hématopoïèse : notion de hiérarchie et modèles

Le développement de nouveaux outils et nouvelles techniques, comme les anticorps monoclonaux et la cytométrie en flux ont permis d'identifier des marqueurs de surface cellulaire spécifiques des différentes populations hématopoïétiques, notamment des cellules immatures (Spangrude et al., 1988; Morrison and Weissman, 1994). C'est la naissance du modèle « classique » de la hiérarchie hématopoïétique (Zhang et al., 2018) (**Figure 3a**).

La classification des cellules immatures a donc été établie comme suit (pour plus de simplicité les noms de certaines cellules ont été laissés en anglais dans ce paragraphe) :

Les LT-HSCs (Long-term Hematopoietic Stem Cells), au sommet de la hiérarchie, sont considérées comme les cellules les plus immatures. Très rares dans la moelle osseuse et majoritairement quiescentes, elles sont capables de s'auto-renouveler et ont le potentiel de reconstituer de façon totale et permanente une hématopoïèse chez des souris irradiées létalement (Christensen and Weissman, 2001).

Les ST-HSCs (Short-Term Hematopoietic Stem Cells), quant à elles, possèdent une capacité de repopulation plus rapide mais moins pérenne dans le temps (Yang and Bryder, 2005).

Les MPPs (MultiPotent Progenitors), issus des ST-HSCs, ne possèdent plus cette capacité d'auto-renouvellement, prolifèrent beaucoup plus et sont déjà engagés dans un processus de différenciation cellulaire (Morrison et al., 1997).

A partir de ces MPPs, la différenciation s'effectuera selon deux branches distinctes, conduisant aux lignées lymphoïde (via les CLPs) et myéloïde (via les CMPs) :

- Les CLPs (Common Lymphoid Progenitors) donneront naissance aux cellules matures de la lignée lymphoïde à savoir les lymphocytes B et T, les cellules dendritiques et les Natural Killer (NK) (Kondo et al., 1997).
- Les CMPs (Common Myeloid Progenitors) donneront naissance aux GMPs (Granulocytes/Monocytes Progenitor) et au MEP (Megakaryocytes/Erythrocytes Progenitors) qui eux-mêmes donneront naissances aux cellules matures de la lignée myéloïde (Akashi et al., 2000).

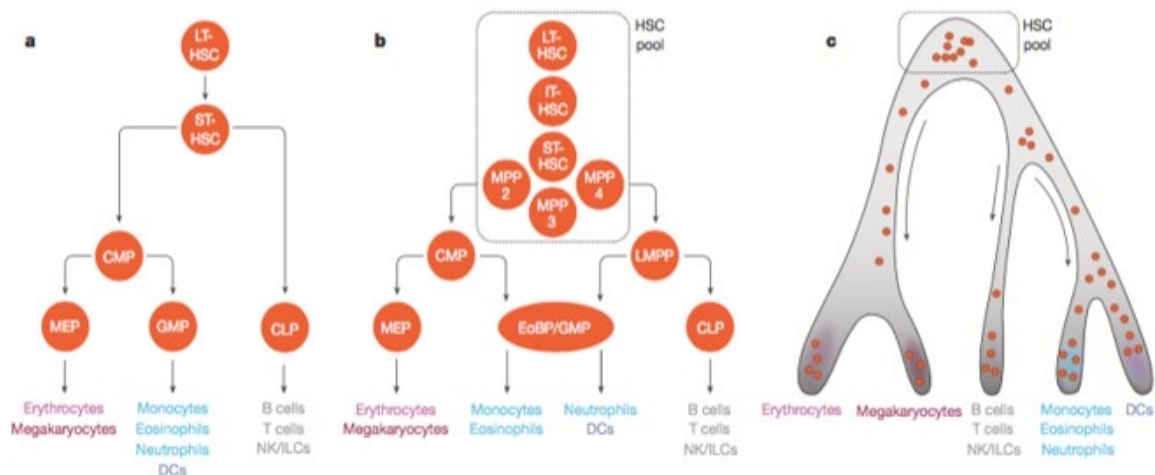


Figure 3 : Représentation schématique des différents modèles de hiérarchie hématopoïétique.

(a) Modèle classique. Ce modèle, accepté jusque dans les années 2000, présente le tissu hématopoïétique de façon très hiérarchisée avec au sommet les CSH, puis les progéniteurs et enfin les cellules matures

(b) Modèle révisé. La découverte de nouveaux types cellulaires entraîne la complexification du modèle classique.

(c) L'hématopoïèse, un processus continu. Les techniques omiques de « *single cell* » mettent en évidence l'hétérogénéité cellulaire du tissu hématopoïétique

(Laurenti and Göttgens, 2018)

Toutefois, ce modèle classique a rapidement été remis en question grâce à la découverte de nouveaux marqueurs cellulaires qui ont permis de mettre en évidence une plus grande hétérogénéité cellulaire : c'est le début des modèles dit « révisés » (**Figure 3b**).

On citera notamment la caractérisation des IT-HSCs (Intermediate-Term Hematopoietic Stem Cells) qui possèdent des capacités de repopulation transitoire (6 à 8 mois), plus efficaces que celles des ST-HSCs (4 à 6 semaines). Elles sont donc considérées comme une population intermédiaire entre LT-HSCs et ST-HSCs (Benveniste et al., 2010).

Les groupes de A. Trumpp (Wilson et al., 2008) et E. Passegué (Pietras et al., 2015) ont divisé la population de MPPs en plusieurs sous-types : MPP1, MPP2, MPP3 et MPP4. Bien que les marqueurs phénotypiques de ces différentes populations de MPPs ne soient pas forcément en accord entre les différentes études, des caractéristiques communes à chaque population se dégagent.

A la différence des LT-HSCs qui sont majoritairement quiescentes, les MPP1 sont considérées comme des HSC métaboliquement actives. Elles se distinguent chez la souris par l'expression du cluster de différenciation CD34.

Les MPP2 sont capables de donner des cellules de différentes lignées tout en orientant néanmoins vers un biais myéloïde et une propension à donner des mégacaryocytes. Ces cellules possèdent une forte activité mitochondriale et cyclent beaucoup plus que les HSC. De fait, cette population cellulaire se trouve très augmentée lors d'un épisode de stress hématopoïétique qui nécessite une régénération rapide du tissu hématopoïétique.

Les MPP3 favorisent également un biais myéloïde avec une tendance à donner des cellules granulocytaires et monocytaires.

Pour finir les MPP4 orientent vers un biais lymphoïde, bien qu'ils soient capables de donner des cellules de la lignée myéloïde lors d'un épisode de stress ou de régénération du tissu hématopoïétique (Cabezas-Wallscheid et al., 2014).

Enfin, les LMPPs (Lymphoid Primed Multipotent Progenitors), caractérisés par une expression forte du marqueur de surface « Fms-like tyrosine kinase 3 » (Flt3) aussi appelé « Fetal liver kinase-2 » (Flk2) ou CD135, ont été décrits comme capables de se différencier en cellules des différentes lignées, ce qui les place en amont des CMPs et CLPs (Adolfsson et al., 2005; Forsberg et al., 2006). Phénotypiquement et fonctionnellement, les LMPPs sont très proches des MPP4.

Ce modèle « révisé », plus complet que le modèle « classique », considérait encore l'hématopoïèse comme un processus pyramidal organisé en strates de différenciation, avec des frontières claires entre les différentes populations cellulaires. L'avènement des différentes techniques Omiques sur cellules uniques et des approches de bar-coding ont toutefois permis de mettre en évidence que l'hématopoïèse doit plutôt être considérée comme un processus de différenciation continu (Nestorowa et al., 2016; Velten et al., 2017) (**Figure 3c**).

De plus, certaines études sur les mégacaryocytes ont montré qu'ils pouvaient être obtenus directement depuis les HSC sans passer par tous les stades progéniteurs décrits dans les anciens modèles (Sanjuan-Pla et al., 2013; Woolthuis and Park, 2016), ce qui remet encore plus en question le principe de hiérarchie hématopoïétique.

De nos jours, on considère ainsi que les CSH ne passent pas par plusieurs stades bien définis, mais acquièrent graduellement des états transcriptomiques spécifiques des différentes lignées d'une façon plus continue. Dans le modèle actuel, les étapes du développement des CSH dont la différenciation en MPP, CLP ou CMP doivent être considérées plus comme des états transitoires dans le continuum que représentent les CSPH, plutôt que comme des types cellulaires distincts (Haas et al., 2018).

Toutes ces nouvelles études mettent donc en évidence la complexité du processus de différenciation hématopoïétique, qui doit être considéré comme un phénomène dynamique et adaptatif selon que l'on observe le tissu dans des conditions homéostatiques ou perturbées.

2) Ontogenèse du système hématopoïétique murin

Chez la souris, le système hématopoïétique est d'origine mésodermale et commence à se mettre en place dès les premiers jours de vie embryonnaire en trois vagues d'événements successifs (McGrath et al., 2015).

La première vague se passe dans le sac vitellin au 7^{ème} jour de vie embryonnaire (E7) et représente l'hématopoïèse primitive. Cela se traduit par la formation de cellules hématopoïétiques primitives et transitoires qui vont pouvoir répondre aux besoins immédiats de l'embryon en croissance. Les progéniteurs des macrophages, parfois considérés comme des progéniteurs érythromyéloïdes (EMP) précoces ou des analogues d'EMP, servent au remodelage des tissus et à la défense de l'embryon (Bertrand et al., 2005; Hoeffel et al., 2015). Les progéniteurs érythroïdes primitifs vont, quant à eux, assurer l'oxygénation (Palis, 2014). Enfin, les mégacaryocytes primitifs jouent un rôle dans la maintenance vasculaire (Tober et al., 2007).

La seconde vague à E8,25, toujours dans le sac vitellin, se traduit par l'émergence des EMP (Chen et al., 2011), parfois désignés comme EMP tardifs (Hoeffel et al., 2015) et des progéniteurs lymphoïdes (Böiers et al., 2013).

La troisième vague commence à E10,5 et correspond à l'émergence des CSH dans la région aorte-gonade-mésonephros (AGM) de l'embryon. Les CSH sont en fait générées à partir de l'endothélium hémogénique par un processus appelé la transition endothéliale-hématopoïétique ou « Endothelial to Hematopoietic Transition » (EHT) (Boisset et al., 2015). En plus du rôle central des cellules endothéliales lors de ce phénomène d'EHT, d'autres cellules du microenvironnement interviennent dans sa régulation. Par exemple, les cellules stromales ont une fonction de support des CSH (Oostendorp et al., 2002) et les nerfs du système nerveux sympathique ont un rôle dans la génération des CSH depuis l'AGM, via la libération de catécholamines (Fitch et al., 2012) (**Figure 4A**).

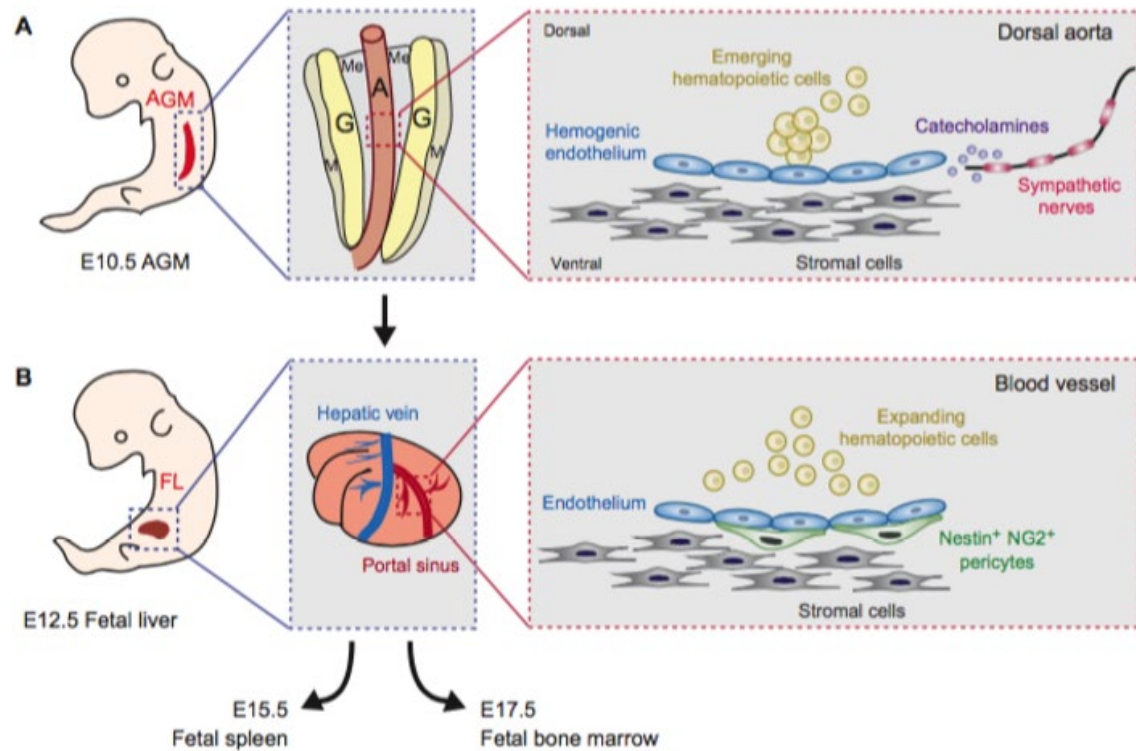


Figure 4 : Les CSH et leurs micro-environnements pendant la vie fœtale.

(A) Représentation schématique d'un embryon de 10 jours (E10,5). La zone magnifiée au centre donne une représentation schématique de la région AGM à partir de laquelle les premières CSH émergeront. A droite, la zone magnifiée représente l'émergence des CSH à partir de l'endothélium hémogénique lors du phénomène d'EHT. Les CSH naissantes se trouvent dans un micro-environnement constitué de l'endothélium hémogénique, de cellules stromales et de nerfs sympathiques.

(B) Représentation schématique d'un embryon à E12,5. La zone magnifiée au centre représente le foie fœtal et celle de droite le micro-environnement régulant l'expansion des cellules souches. Il est composé de cellules stromales et de péricytes Nestin⁺NG2⁺ associés aux cellules endothéliales des vaisseaux hépatiques.

(Gao et al., 2018)

Les CSH issues de l'EHT vont ensuite migrer jusqu'au foie fœtal à E11. A ce stade, elles sont déjà capables de donner toutes les cellules de l'arbre hématopoïétique (Crisan and Dzierzak, 2016). De E11 à E16, les CSH vont s'expandre de façon importante dans le foie fœtal (Bowie et al., 2007). Cette expansion est régulée par des cellules faisant partie du microenvironnement, tels que les cellules stromales, qui joueraient un rôle de support (Zhao et al., 2015) et les péricytes positifs pour la Nestin et pour l'antigène Neural/Glial 2 (NG2) qui, associés aux cellules endothéliales des vaisseaux hépatiques, favoriseraient la prolifération des CSH (Khan et al., 2016) (**Figure 4B**). Enfin, à partir de E15,5, les CSH vont commencer à coloniser la rate puis la moelle osseuse à E17 (Christensen et al., 2004).

La moelle osseuse forme ainsi le site majeur de l'hématopoïèse à l'âge adulte. Toutefois des CSH restent présentes dans la rate, où elles jouent un rôle dans les phénomènes d'hématopoïèse extramédullaire notamment déclenchés lors d'épisodes de stress. Ainsi, au contraire des CSH de la moelle osseuse, elles présentent un métabolisme moins quiescent qui semble être régulé par le microenvironnement splénique (Coppin et al., 2018).

3) Les Cellules Souches Hématopoïétiques murines

a) Caractérisation et méthodes d'études

De nombreuses méthodes ont été développées afin de pouvoir localiser, quantifier et évaluer la fonctionnalité des CSH (Frisch and Calvi, 2014). La méthode la plus répandue et la plus efficace pour identifier et isoler ces cellules est la cytométrie en flux. Cependant, cette méthode ne permet pas d'obtenir des données fonctionnelles. Pour cela des méthodes *in vitro* tels que le test clonogénique et la co-culture ont été développées. Toutefois, la seule méthode permettant d'évaluer à la fois la capacité d'auto-renouvellement et la capacité de redonner une hématopoïèse complète est le test de reconstitution hématopoïétique.

La cytométrie en flux

L'analyse et le tri des CSH par cytométrie en flux repose sur l'identification de nombreux marqueurs membranaires spécifiques des différentes populations hématopoïétiques (Mayle et al., 2013). Les premiers papiers décrivant ces marqueurs commencent par établir que les CSH ne présentent pas la majorité des antigènes que l'on trouve sur les cellules matures tels que B220, Gr1, Macrophage-1 (Mac-1), CD4 et CD8 : elles sont donc désignées « lineage negative » ou Lin^{neg}. Elles sont également étiquetées Thy1^{low} (CD90) et Sca1⁺ (« Stem cell antigen-1 » ou Ly6a) (Spangrude et al., 1988). La découverte de l'expression de c-kit (CD117) par les CSH (Ikuta et al., 1992; Morrison and Weissman, 1994) donne naissance à la classification KLS (c-kit⁺ Lin^{neg} Sca1⁺) encore très utilisée de nos jours. Toutefois ces KLS englobent une population très hétérogène dont l'ensemble des MPPs.

Afin d'obtenir une population plus enrichie en CSH, l'ajout d'autres marqueurs membranaires est nécessaire. Ainsi, les CSH murines ont été définies comme étant Flk2^{neg} (CD135) (Mackarehtschian et al., 1995), CD34^{neg} (Osawa et al., 1996), CD48^{neg}, CD150⁺ et CD244^{neg} (Kiel et al., 2005).

En plus de ces marqueurs de surface, certaines équipes ont développé des méthodes d'identification basées sur des sondes comme la rhodamine 123 (Spangrude and Johnson, 1990) et sur le Hoechst 33342 (Wolf et al., 1993; Goodell et al., 1996). Cette méthode se base sur le fait que les CSH possèdent des pompes membranaires très actives, les transporteurs à « ATP Binding Cassette » (ABC), permettant

l'efflux rapide des sondes. De fait les CSH sont caractérisées comme étant Rhodamine^{low} et étiquetées « Side Population » (SP) pour l'exclusion du Hoechst 33342.

D'autres marqueurs moins utilisés ont également été décrits comme l'endogline (CD105) (Chen et al., 2002) ou encore Hoxb5 (Hox-2.1) qui identifie les seules CSH avec un potentiel de reconstitution à long-terme après transplantation (Chen et al., 2016). Pour finir l'Endothelial protein C receptor (EPCR ou CD201) identifie les CSH associées aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Ces cellules sécrètent de la protéine C activée ou « activated C Protein » (aPC) qui, en se fixant sur le récepteur EPCR des CSH, va induire leur rétention en y maintenant un faible niveau de Nitrique Oxide (NO) (Balazs et al., 2006; Gur-Cohen et al., 2015).

Ces marqueurs permettent ainsi d'identifier une population cellulaire représentant de 0,01% à 0,05% des cellules de la moelle osseuse, selon la combinaison d'anticorps choisie. Il est en effet très rare d'utiliser la totalité des marqueurs disponibles et la plupart des équipes établissent leur propre stratégie. Il faut en effet noter que l'expression de certains de ces marqueurs peut varier comme par exemple le CD34 qui peut être augmenté lors de l'activité des CSH (Tajima et al., 2000) et l'EPCR qui peut être modifié lors de phénomènes inflammatoires (Rabe et al., 2020). Le choix des marqueurs doit donc être adapté en fonction des expériences à mener. Il est également à noter que dans tous les cas, ces marqueurs permettent d'obtenir une population encore hétérogène, mais très enrichie en CSH.

Test clonogénique ou "Colony Forming Cell assay" (CFC)

Suite à l'observation par Till et McCulloch de nodules sur la rate après greffe de moelle osseuse, des techniques de culture de cellules de moelle ont été développées afin de pouvoir observer et caractériser ces colonies *in vitro*. Ceci a permis le développement du test CFC tel qu'on le connaît aujourd'hui (Miller and Lai, 2005). Ce test est basé sur la capacité des progéniteurs hématopoïétiques à proliférer et à se différencier en colonies caractéristiques de leurs lignées. La population cellulaire d'intérêt estensemencée dans un milieu semi-solide, généralement de la méthylcellulose, et cultivée en présence de différentes cytokines recombinantes. Les cytokines utilisées habituellement sont les interleukines (IL) IL3 et IL6, le Stem Cell Factor (SCF), l'érythropoïétine (EPO) et l'insuline mais selon les colonies désirées d'autres facteurs peuvent être ajoutés tel que d'autres types d'interleukines, le « Granulocyte Colony Stimulating Factor » (G-CSF) ...

Au bout d'une dizaine de jours de culture, il est alors possible d'observer et de dénombrer les différentes colonies en fonction de leur aspect, chaque colonie étant donc issue d'un progéniteur myéloïde ou Colony Forming Cell (CFC). On distingue la BFU-E ou Burst Forming Unit-Erythroid, la CFU-G ou Colony Forming Unit-Granulocytes, la CFU-M ou Colony Forming Unit monocytes/macrophages et la CFU-GM ou Colony Forming Unit-Granulocytes/Macrophages. La CFU-GEMM ou Colony Forming

Unit-Granulocyte/Erythrocyte/Macrophages/Mégacaryocytes est considérée comme la plus immature des CFC (**Figure 5**).

Cette technique permet donc de détecter la présence de progéniteurs mais pas de cellules plus immatures tels que les CSH. Toutefois, elle présente l'avantage d'être rapide à réaliser.

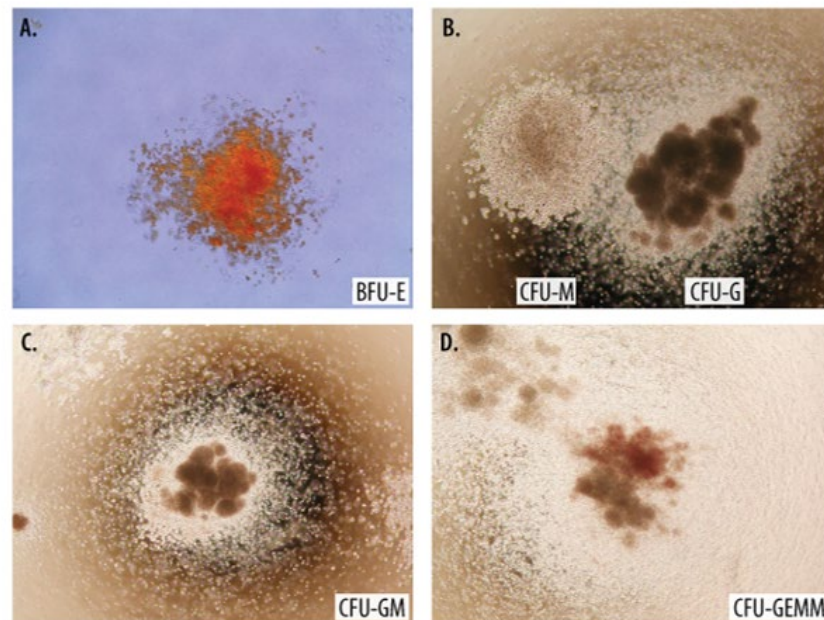


Figure 5 : Test clonogénique ou Colony Forming Cell assay (CFC).

Illustration des différentes colonies observables lors d'un test clonogénique murin.

(A) BFU-E ou Burst Forming Unit-Erythroid

(B) A droite, CFU-M ou Colony Forming Unit monocytes/macrophages et à gauche CFU-G ou Colony Forming Unit-Granulocytes

(C) CFU-GM ou Colony Forming Unit-Granulocytes/Macrophages

(D) CFU-GEMM ou Colony Forming Unit-Granulocyte/Erythrocyte/Macrophages/Megakaryocytes.

(https://www.rndsystems.com/products/mouse-methylcellulose-complete-media_hsc007#data-examples)

Les techniques de co-culture

Les techniques de co-culture ont été développées dans les années 70 (Dexter et al., 1977) suite à l'observation d'un meilleur maintien des cellules immatures en culture lorsqu'elles étaient cultivées sur un tapis de cellules issues de moelle osseuse. Cette technique permet en effet de mimer certaines interactions que les cellules ont *in vivo* avec leur microenvironnement. Afin de simplifier l'obtention du tissu stromal nécessaire à la co-culture, de nombreuses équipes ont créé des lignées cellulaires telles que la « Murine Stromal Cells 5 » (MS5) (Itoh et al., 1989), dérivée de cellules de moelle de souris

adultes et très couramment utilisée. On pourra également citer les lignées S-17 (Collins and Dorshkind, 1987) et M2-1034 (Lemoine et al., 1990), également issues de moelle de souris adulte ou encore la lignée AFT024 (Moore et al., 1997) issue de foie fœtal de souris.

Deux techniques majeures de co-culture existent :

- Le "Cobblestone Area Forming Cell" : CAF-C (Ploemacher et al., 1989)
- Le « Long-term Culture-Initiating Cell » : LT-CIC dans la continuité du CAF-C (Sutherland et al., 1989)

Le CAF-C consiste à co-cultiver en dilution limite une population hématopoïétique enrichie en cellules immatures sur un tapis de cellules stromales. Après 5 semaines de culture, il est alors possible d'observer des cellules en suspension et des cellules présentant une forme pavimenteuse, nichées dans le tapis stromal. Ces cellules pavimenteuses démontrent la présence de cellules hématopoïétiques immatures dans la populationensemencée.

Afin de pouvoir attester des capacités de différenciation de ces cellules, le CAF-C doit être suivi par le LT-CIC. Ainsi, les cellules en suspension et les cellules nichées dans le tapis stromal sont récupérées et ensemencées dans de la méthylcellulose. Au bout d'une dizaine de jours et de façon similaire au test clonogénique, il est alors possible d'observer les différentes colonies représentatives des différentes lignées myéloïdes.

Ces tests complémentaires permettent donc de conclure à la présence, dans la population initiale, de cellules hématopoïétiques immatures et de tester leur potentiel de différenciation. Ils permettent de détecter des cellules plus immatures que dans le test clonogénique, mais sont plus long à réaliser.

Le test de reconstitution hématopoïétique

Même si les tests *in vitro* décrits précédemment permettent d'identifier la présence de cellules immatures dans une population donnée et d'attester de leur capacité à se différencier en cellules de la lignée myéloïde, ils ne permettent pas de conclure à la présence de CSH fonctionnelles. Le seul test capable de conclure à la présence de CSH, capables d'auto-renouvellement à long-terme, ayant la capacité de se nicher dans la moelle et possédant la capacité à redonner une hématopoïèse complète, est le test de reconstitution hématopoïétique (Mcculloch and Till, 1960; Szilvassy et al., 1990).

Il consiste à greffer une population cellulaire d'intérêt (généralement de la moelle osseuse totale ou une fraction de moelle enrichie en cellules immatures) dans une souris receveuse dont la moelle osseuse a préalablement été éliminée. On parle de test de reconstitution hématopoïétique non compétitif.

La déplétion de moelle osseuse des souris receveuses se fait généralement *via* une dose létale d'irradiation (9,5 Gy/950 rad) (McCulloch and Till, 1960) ou l'utilisation de substances myélosuppressives comme le Busulfan combiné à la cyclophosphamide (Santos et al., 1983). Toutefois ces traitements ont pour inconvénient d'affecter la souris dans son ensemble et plus particulièrement les cellules de la niche hématopoïétique. De fait, des modèles de souris ne nécessitant aucun conditionnement préalable à une greffe de moelle osseuse ont vu le jour, comme par exemple la création de la lignée de souris transgéniques Rag2^{-/-}γc^{-/-}Kit^{W/W^v}, déficientes en cellules B, T et NK, mais également déficientes en CSH ce qui permet une prise de greffe sans effets délétères pour les autres cellules de la moelle osseuse. (Waskow et al., 2009).

Pour réaliser ce test, la population de cellules donneuses pour la greffe devra également présenter une caractéristique singulière permettant de la distinguer des cellules de l'hôte (marqueur membranaire, marque génétique ...).

Il est également possible de réaliser un test de reconstitution hématopoïétique compétitif en greffant la population d'intérêt avec une population cellulaire contenant un nombre défini de CSH. L'évaluation de la contribution de chaque population à l'hématopoïèse finale permet alors de conclure à la qualité fonctionnelle de la population d'intérêt.

Ces deux tests de reconstitution permettent donc d'évaluer les capacités de nichage, prolifération et différenciation de la population cellulaire d'intérêt. Mais pour tester la capacité d'auto-renouvellement à long-terme des CSH, il faut se référer au test de transplantations sériées. Ce test consiste à greffer la population cellulaire donneuse initiale plusieurs fois au cours du temps, dans un hôte secondaire voire tertiaire, permettant ainsi d'évaluer au cours du temps et à très long-terme la qualité fonctionnelle des CSH.

b) Biologie de la CSH

Du fait de leur rôle central dans le maintien de l'hématopoïèse, les CSH doivent se maintenir à un nombre relativement constant et ainsi assurer un équilibre entre quiescence, auto-renouvellement et différenciation. Elles doivent également être capables de se protéger de toutes sortes de stress, dont le stress oxydatif qui pourrait les endommager sur le long-terme, c'est pourquoi elles disposent de plusieurs mécanismes leur permettant de limiter la production, ou de détoxifier les espèces réactives de l'oxygène (ROS). En effet ces espèces réactives, bien que nécessaires à la signalisation cellulaire, peuvent s'avérer toxiques lorsqu'elles sont en trop grande concentration.

La balance quiescence/prolifération/différenciation

En conditions homéostatiques, les CSH sont majoritairement quiescentes (phase G0 du cycle cellulaire) (Hao et al., 2016). Un ensemble de facteurs externes et internes vont, soit maintenir les CSH dans cet état quiescent, soit favoriser leur division et/ou leur différenciation (**Figure 6**).

Cette balance entre quiescence, prolifération (auto-renouvellement) et différenciation dépend de plusieurs mécanismes :

- La régulation du cycle cellulaire ;
- La régulation du métabolisme ;
- Certaines voies de signalisation, telles que la voie PI3K/Akt/mTOR ou la voie d'Oxydation des Acides Gras (« *Fatty acid β -oxidation* » : FAO) ;
- La régulation par des miRNA.

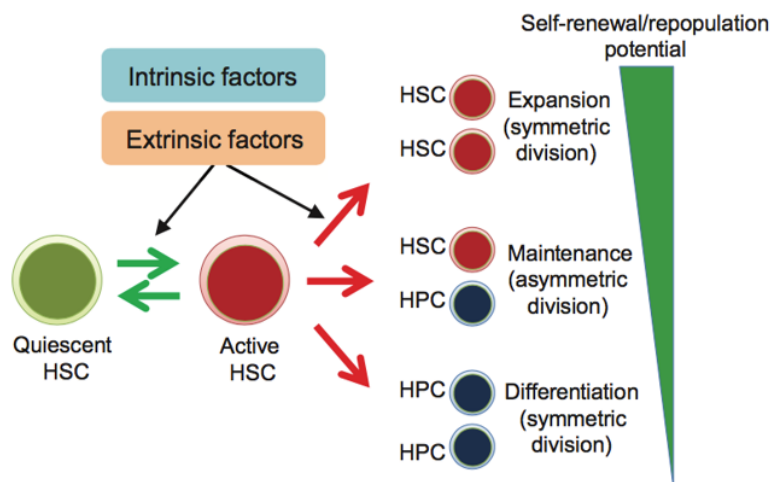


Figure 6 : Les facteurs extrinsèques et intrinsèques régulent le destin des CSH.

Les facteurs extrinsèques et intrinsèques vont agir sur les CSH et réguler la balance entre maintien de la quiescence, expansion (division symétrique), maintenance (division asymétrique) et différenciation (division symétrique).

(Nakamura-Ishizu et al., 2014a)

La régulation du cycle cellulaire

Le maintien en quiescence des CSH implique principalement des processus permettant de bloquer la progression du cycle cellulaire. En dehors de la phase G0, le cycle cellulaire est composé de 4 phases : la phase G1, la phase S ou phase de synthèse de l'ADN, la phase G2 et la phase M ou phase de division cellulaire. La phase G1 revêt une importance particulière car c'est à ce niveau qu'un ensemble de mécanismes est mis en place afin de réguler/orienter l'entrée de la cellule dans le cycle cellulaire (Nakamura-Ishizu et al., 2014a) (**Figure 7**).

Parmi les acteurs permettant de bloquer l'entrée dans le cycle cellulaire, on distingue les protéines de la famille du Rétinoblastome (Rb). Ces protéines empêchent la transition de la phase G1 vers la phase S en séquestrant le facteur de transcription E2F (Cho et al., 2019).

Un modèle de souris triple KO des protéines de la famille Rb, à savoir pRb, p107 et p130, entraîne une perte de quiescence des CSH, associée à une prolifération, une mobilisation augmentée, ainsi qu'à une altération du potentiel de reconstitution des CSH après une greffe (Viatour et al., 2008).

Ces protéines Rb sont elles-mêmes régulées négativement par des complexes constitués des protéines Cyclines et de Kinases Cyclines-Dépendantes (CDK). La phosphorylation des protéines Rb par le complexe Cyclin D-Cdk4/6 entraîne l'inactivation partielle de Rb et sa séparation du facteur de transcription E2F, permettant ainsi la progression du cycle cellulaire vers la phase G1. Par la suite, une seconde phosphorylation de pRb par le complexe Cycline E-Cdk2 entraîne l'activation complète de E2F, ce qui permet l'entrée des cellules en phase S (Pietras et al., 2011).

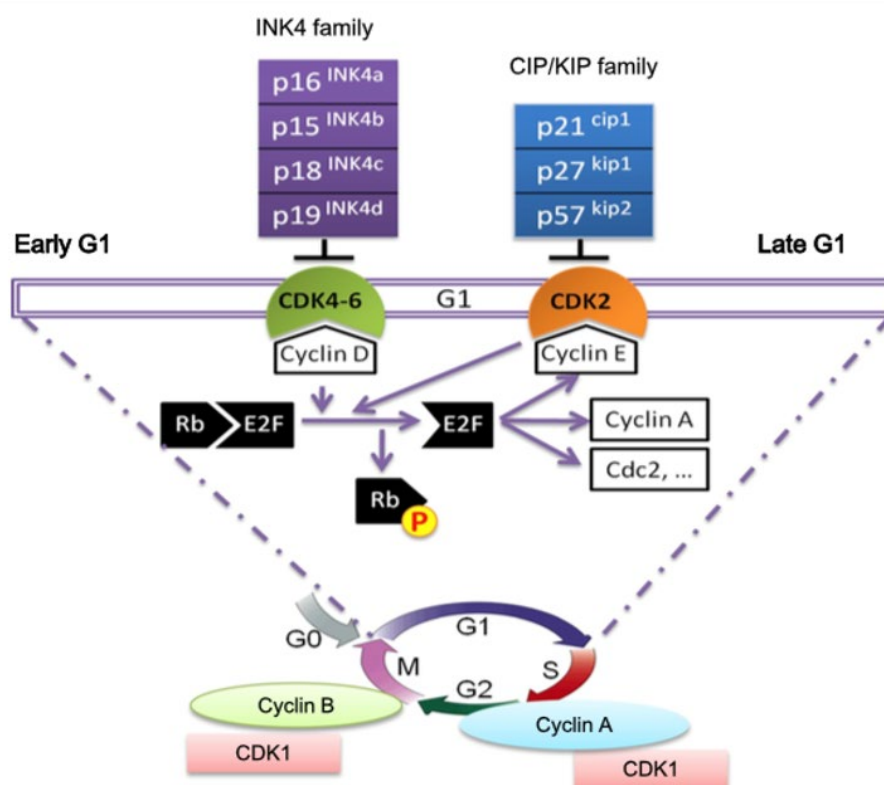


Figure 7 : Régulation du cycle cellulaire dans les CSH.

La régulation du cycle cellulaire est majoritairement effectuée par les complexes Cyclines/Kinases dépendantes des cyclines (CDK). Ces complexes sont régulés par des inhibiteurs de CDK (CKI) qui appartiennent à la famille INK4 et CIP/KIP. Les complexes CD4-6/Cycline D et CDK2/Cycline E phosphorylent les protéines de la famille Rb dé-réprimant E2F et lui permettant d'activer la transcription des gènes pour passer de la phase G1 à la phase S. (Hao et al., 2016)

Pour finir, il existe des Inhibiteurs des complexes Cyclines/CDK (CKI) qui agissent en bloquant leur activité kinase. Les CKI sont divisés en deux familles : les Inhibiteurs de CDK4 (INK4) et les Protéines d'Interactions CDK/Protéines Inhibitrices de Kinases (CIP/KIP).

La famille INK4 compte plusieurs membres, $p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p18^{INK4c}$ et $p19^{INK4d}$ qui jouent le rôle d'antagonistes du complexe Cycline D-CDK4/6, bloquant ainsi l'entrée en phase S. Dans les CSH, la délétion de $p18^{INK4}$ entraîne une augmentation de l'auto-renouvellement des cellules souches, ce qui améliore leur capacité à se greffer à long-terme (Yu et al., 2006). A l'inverse, la dérégulation de $p16^{INK4a}$ et $p19^{INK4d}$, provoque une perte de l'auto-renouvellement des CSH (Oguro et al., 2006).

La famille CIP/KIP compte trois membres, $p21^{Cip1/Waf1}$, $p57^{Kip2}$ et $p27^{Kip1}$ qui contrôlent également l'entrée en phase S en inhibant l'activité du complexe Cycline E-CDK2. $p21^{Cip1/Waf1}$ et $p57^{Kip2}$ ont un rôle central dans la régulation des CSH. Dans un modèle de souris KO pour $p21^{Cip1/Waf1}$, il a notamment été montré une augmentation de la prolifération des CSH (Cheng et al., 2000a) et dans un modèle de souris KO pour $p57^{Kip2}$ une perte de quiescence des CSH, due à une augmentation de la phosphorylation de Rb, a été mise en évidence (Matsumoto et al., 2011). La délétion de $p27^{Kip1}$ n'a montré aucun effet sur les CSH (Cheng et al., 2000b). En revanche, la double délétion de $p27^{Kip1}$ et $p57^{Kip2}$ a montré l'importance de ces deux facteurs dans la rétention du complexe composé de la « Heat Shock Cognate 71 KDa protein » (HSC70) et de la CyclineD1 dans le cytoplasme, permettant le maintien de la dormance des CSH (Zou et al., 2011).

De nombreux facteurs de transcription revêtent une importance particulière dans la régulation des protéines du cycle cellulaire dans les CSH, comme par exemple p53, « gardien du génome » et acteur central dans les mécanismes d'apoptose, de sénescence et d'arrêt du cycle cellulaire, mais également dans la quiescence cellulaire (Liu et al., 2009). De façon non exhaustive on citera également les facteurs de transcription « Stem cell Leukemia » (Scf) (Lacombe et al., 2010), « Early growth response protein 1 » (Egr1) (Min et al., 2008), « Ecotropic viral integration site-1 » (Evi1) (Kustikova et al., 2013) ou encore PU.1 (Staber et al., 2013).

Le métabolisme

Le métabolisme des CSH est régulé par différents mécanismes tels que la régulation mitochondriale (fonctions et masse), l'autophagie ou encore le métabolisme lipidique.

Les mitochondries sont le centre du métabolisme énergétique cellulaire, mais également une des sources primaires de ROS. Le maintien d'un métabolisme ralenti des mitochondries dans les cellules contribue à maintenir un niveau de ROS assez bas et donc de préserver leur intégrité. Toutefois, certaines fonctions mitochondriales sont nécessaires au maintien de la quiescence des CSH. En effet,

l'inactivation de la sous-unité « Rieske Iron-Sulfur Protein » (RISP) du complexe III de la chaîne mitochondriale entraîne une altération de la respiration mitochondriale qui conduit à une perte de quiescence des CSH (Ansó et al., 2017).

La régulation de la masse mitochondriale par les CSH participe au maintien d'un métabolisme ralenti.

Cette régulation est assurée par différents mécanismes. On distingue :

- **La mitophagie**, mécanisme permettant d'éliminer les mitochondries endommagées. L'induction de la mitophagie dans une sous-population de CSH, *via* l'activation de la voie des Récepteurs activés par les Proliférateurs du Peroxysome (PPAR δ), a permis de montrer le rôle essentiel de la mitophagie dans l'auto-renouvellement des CSH (Ito et al., 2016).
- **L'autophagie** qui permet d'éliminer de nombreux composés cytoplasmiques et notamment des mitochondries saines et actives, diminuant ainsi le métabolisme de la cellule. La perte de l'autophagie dans les CSH entraîne une accumulation des mitochondries et un état métabolique activé, ce qui impacte le potentiel régénératif et l'auto-renouvellement des CSH (Ho et al., 2017).
- **La biogenèse**, qui permet de produire de nouvelles mitochondries. Dans les CSH, la délétion du « *Peroxisome proliferator-activated Receptor gamma coactivator 1-alpha* » (PGC1- α), un régulateur majeur de la biogenèse mitochondriale entraîne une altération de la capacité de repopulation à long-terme des CSH (Basu et al., 2013).

De plus, la fusion et la fission sont des mécanismes qui vont permettre aux mitochondries de préserver leur forme, leur taille et leurs fonctions physiologiques intactes (Chan, 2012). Dans les CSH, la surexpression ou la délétion de la Mitofusin-2 (Mfn2), protéine impliquée dans la fusion mitochondriale, a montré un rôle dans la maintenance des CSH avec un potentiel lymphoïde, mais pas dans celles ayant un potentiel myéloïde (Luchsinger et al., 2016). L'activité mitochondriale semble donc ainsi réguler la différenciation des CSH vers des lignées hématopoïétiques spécifiques.

La mitochondrie dispose également d'un programme de protection interne de protéolyse, appelé « Mitochondrial Unfolded Protein Response » (UPR^{MT}), montré comme étant activé lors de la sortie de quiescence des CSH, afin d'assurer l'intégrité mitochondriale et un métabolisme sain (Mohrin et al., 2018).

Cité précédemment comme l'un des régulateurs de la masse mitochondriale, l'autophagie a un autre rôle en servant également à la dégradation intracellulaire et au recyclage de composés cytoplasmiques *via* la voie de l'autophagosome. Ce processus permet aux cellules de disposer de nutriments libres mais également d'éliminer les ROS, les déchets cellulaires toxiques et les mitochondries endommagées (Cho et al., 2019). L'altération de ce mécanisme, *via* la délétion de certains des gènes liés à l'autophagie (Atg), ont permis de mettre en évidence son importance dans les CSH. La délétion

conditionnelle de *Atg7* dans le système hématopoïétique contribue à une diminution du nombre et des fonctions normales des CSH. Cette perte de fonctions est accompagnée d'une accumulation de mitochondries et de ROS, d'une prolifération accrue des cellules et d'une augmentation des dommages à l'ADN (Mortensen et al., 2011). La délétion de *Atg12* entraîne une baisse de l'activité d'auto-renouvellement, du potentiel régénératif ainsi que d'une accumulation de mitochondries (Ho et al., 2017). Pour finir, la délétion de *Atg5* entraîne une diminution du nombre de CSH et une baisse de leur capacité de reconstitution. D'un point de vue mécanistique, ces défauts semblent être la conséquence d'une altération du processus d'élimination des mitochondries (Jung et al., 2019).

La régulation des fonctions cellulaires des CSH par l'autophagie semble ainsi étroitement liée à l'élimination des mitochondries dont les CSH se servent peu pour leur besoin en énergie.

En effet, afin d'obtenir l'ATP nécessaire à leur activité, les CSH adultes utilisent très peu le processus de phosphorylation oxydative des mitochondries (OXPHOS) et privilégient la glycolyse (Simsek et al., 2010). Cette observation semble également s'appliquer au CSH circulantes (Bourdieu et al., 2018).

Lors de leur différenciation ou de leur prolifération, les CSH vont subir de nombreux changements métaboliques dont l'augmentation de leur métabolisme mitochondriale. Cela va permettre de fournir des substrats essentiels à la formation de certaines macromolécules, mais également d'entraîner le passage de la glycolyse à l'OXPHOS contribuant à fournir plus d'énergie à la cellule. Cette activation mitochondriale est également accompagnée d'une augmentation des ROS (Ito and Suda, 2014). L'augmentation de l'activation d'OXPHOS entraîne une entrée des CSH en cycle (Maryanovich et al., 2015) et la régulation du métabolisme des mitochondries permet le maintien de leur quiescence (Hu et al., 2018).

La régulation de l'activité métabolique des CSH passe donc principalement par une régulation négative des fonctions mitochondriales, notamment via le mécanisme de l'autophagie.

D'autres acteurs sont également nécessaires au maintien de la quiescence des CSH, tels que certaines voies de signalisation majeures dont la voie PI3K-Akt-mTOR ou certains mi-ARN.

La voie Pi3K-Akt-mTOR

La signalisation impliquant les Phosphoinositide 3-kinases (PI3k), Akt et les cibles de la Rapamycine chez les mammifères (mTOR), appelée encore voie PI3K-Akt-mTOR, est une voie centrale dans la régulation métabolique des CSH. Celle-ci intervient dans la croissance, la régulation du métabolisme et la réponse au stress.

Cette voie de signalisation est activée par la fixation de facteurs de croissance ou de nutriments principalement sur des récepteurs tyrosines kinases (RTK) situés à la surface de la cellule, mais aussi via d'autres récepteurs tels que les récepteurs couplés aux protéines G. Elle peut aussi être déclenchée

par d'autres voies de signalisation tel que la voie Ras/ERK. Cette activation entraîne la phosphorylation de la Phosphatidylinositol-2 (PIP₂) par la kinase PIP3K menant à la production de PIP₃. L'activité de PI3K est négativement régulée par la « Phosphatase and TENSin homolog » (PTEN) qui agit en déphosphorylant PIP₃, limitant sa disponibilité. PIP₃ va ensuite recruter la kinase PDK1 à l'origine de l'activation de la kinase Akt. Une fois activée, Akt peut à son tour indirectement activer l'enzyme mTOR *via* la phosphorylation de ses régulateurs négatifs Tsc1 et Tsc2. Tsc1 et Tsc2 forment un complexe hétérodimérique qui bloque l'activation de la protéine « Ras homolog enriched in brain » (Rheb). La phosphorylation de Tsc2 par Akt inhibe l'activité GTPase du complexe, ce qui permet alors à Rheb d'activer mTOR. L'enzyme mTOR peut en réalité former deux complexes différents, le complexe mTORC1 constitué de mTOR et de la protéine Raptor, et mTORC2 constitué de mTOR et de la protéine Rictor, Raptor et Rictor étant deux protéines régulatrices de cette voie. Il est à noter que le complexe mTORC2 est nécessaire à l'activation complète d'Akt (Laplante and Sabatini, 2013; Darici et al., 2020) (Figure 8).

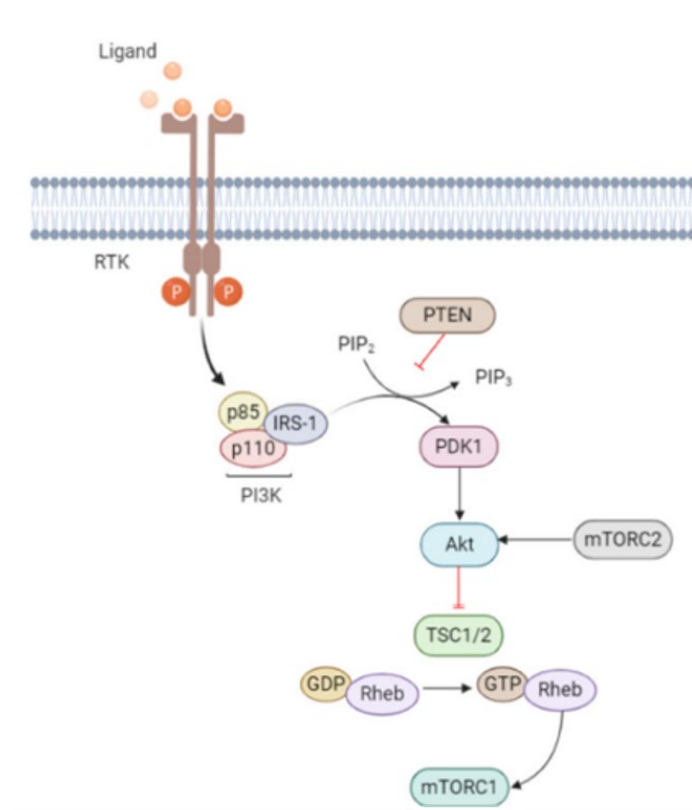


Figure 8 : Voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR

La fixation de ligands aux récepteurs RTK va activer PI3K et permettre ainsi la phosphorylation de PIP₂, menant à la formation de PIP₃. Ce processus est régulé négativement par PTEN. PIP₃ recrute ensuite PDK1, qui va activer Akt. L'activation complète de Akt nécessite également la participation du complexe mTORC2. Akt pourra ensuite inhiber l'activité GTPase du complexe Tsc1/Tsc2, permettant alors l'activation de mTORC1, *via* les protéines Rheb.

Modifié de (Darici et al., 2020)

Dans les CSH, l'activation constitutive d'Akt, la délétion de *PTEN* ou la délétion de *Tsc1* entraînent une expansion des CSH et une altération de leur capacité à greffer (Yilmaz et al., 2006; Zhang et al., 2006; Gan et al., 2008; Kharas et al., 2010). En revanche, une délétion de deux des isoformes d'Akt (AKT1/AKT2) sur les trois existantes, provoque un défaut de différenciation dû à une persistance des CSH dans la phase G0 du cycle cellulaire, corrélé à une diminution de ROS. L'ajout de L-Butathionine-sulfoximine (BSO), qui entraîne une augmentation du taux de ROS, permet de compenser ces défauts de différenciation, démontrant ainsi l'implication d'Akt dans la régulation de la quiescence et du niveau de ROS. Cette étude démontre aussi le rôle de la concentration des ROS dans la différenciation des CSH (Juntilla et al., 2010). Plus précisément, la délétion de *Tsc1* entraîne une perte de la quiescence, associée à une augmentation de la biogenèse mitochondriale et une élévation des ROS. Un traitement avec un « scavenger » des ROS, le N-Acetyl-L-Cysteine (NAC), permet de restaurer le nombre et les fonctions des CSH, mettant en évidence que la voie Tsc-mTOR permet de maintenir la quiescence et les fonctions des CSH en réprimant la production de ROS (Chen et al., 2008).

Les CSH déficientes pour Raptor sont incapables de reconstituer une hématopoïèse (Kalaitzidis et al., 2012), alors que les CSH déficientes pour Rictor ne montrent aucune déficience particulière, démontrant le rôle plus important de mTORC1 par rapport à mTORC2 dans la prolifération des CSH en homéostasie (Magee et al., 2012).

Certains signaux provenant de la niche sont également capables de réguler des éléments de la voie PI3K-Akt-mTOR. Pour exemple, la fixation de la Prostaglandine E2 (PGE2), notamment produite par les monocytes et les macrophages de la niche hématopoïétique, sur son récepteur l'EP4, peut réduire les niveaux de ROS dans les CSH *via* l'inhibition de la kinase Akt (Ludin et al., 2012; Ikushima et al., 2013).

La voie de l'oxydation des acides gras

La kinase hépatique B1 (LKB1) est une Sérine-Thréonine kinase qui agit en amont des voies de la protéine kinase AMP dépendante (AMPK) et mTOR (**Figure 9**). AMPK est un régulateur majeur du métabolisme énergétique avec notamment un rôle dans la voie de l'oxydation des acides gras (FAO) et dans l'inhibition de la voie mTOR. La déplétion de l'AMPK entraîne une dérégulation mitochondriale et une baisse d'ATP (Nakada et al., 2010).

LKB1 a été montrée comme ayant un rôle central dans la régulation des CSH. En effet, sa déplétion entraîne une perte de la quiescence et du potentiel de repopulation des CSH. Une diminution d'ATP, des défauts mitochondriaux et une altération du métabolisme lipidique ont également été observés. Cette altération du métabolisme des lipides est associée à un changement dans l'expression de gènes impliqués dans la voie PPAR δ (Gan et al., 2010; Gurumurthy et al., 2010).

La voie de la Protéine Proleucémie Myéloïde (PML)-PPAR δ -FAO a en effet été identifiée comme ayant un rôle dans le devenir des CSH. La perte de PPAR δ ou l'inhibition de l'oxydation des acides gras dans la mitochondrie entraîne une perte des fonctions des CSH. De plus, cette voie de signalisation semble avoir un rôle dans la division asymétrique des CSH. La délétion de *Ppard* ou *pml* ainsi que l'inhibition de FAO entraîne une division symétrique des CSH alors que l'activation de PPAR δ augmente la division asymétrique (Ito et al., 2012).

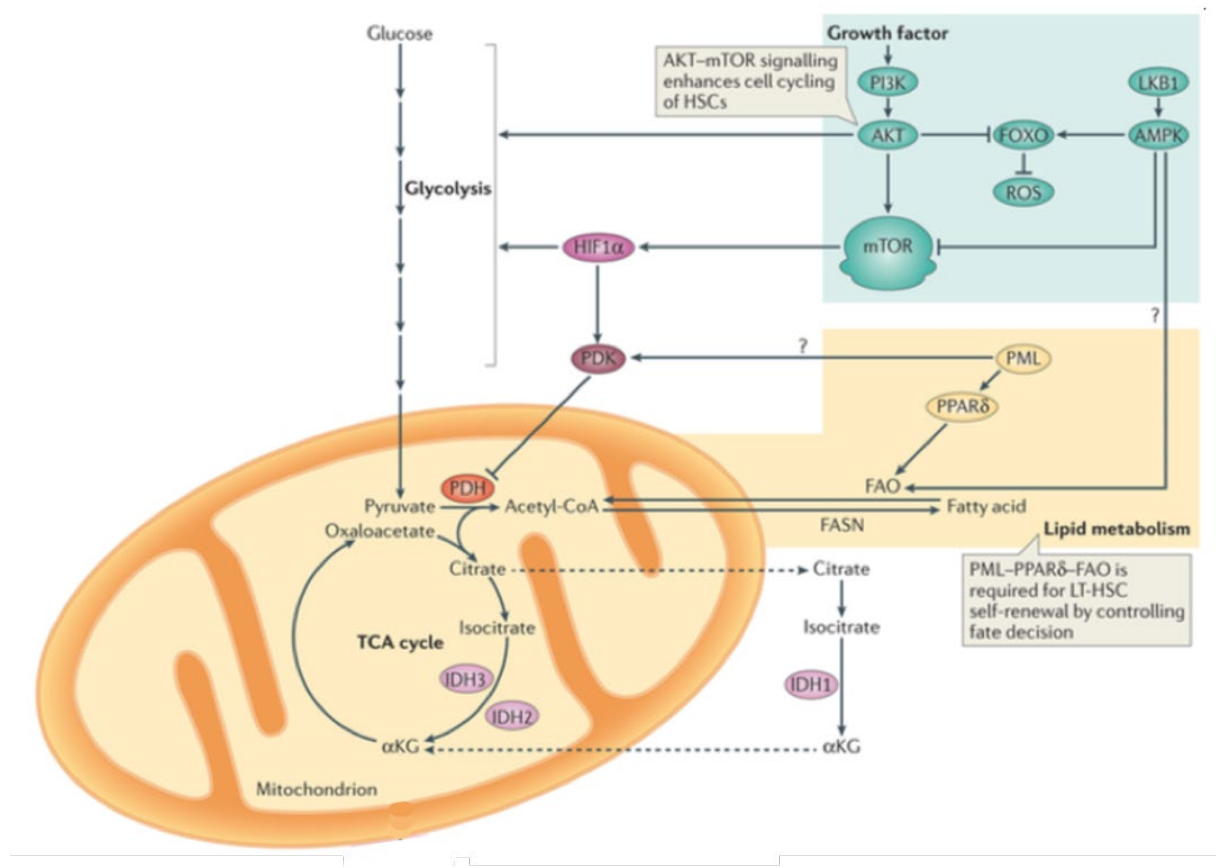


Figure 9 : Régulation métabolique énergétique de la CSH.

La voie de signalisation PI3K/Akt réprime FoxO et active mTOR, favorisant la prolifération des CSH et le métabolisme de phosphorylation oxydatif. La voie de signalisation PML-PPAR δ régule la voie de l'oxydation des acides gras et est nécessaire à l'auto-renouvellement et au maintien de la quiescence des CSH. La famille des Isocitrate Déshydrogénase (IDH) sont une famille d'enzymes centrales dans le cycle de l'acide citrique. Lkb1 régule à la fois la voie de l'AMPK et de mTOR. Modifié de (Ito and Suda, 2014)

Micro-ARN

Les micro-ARN (mi-ARN) sont de petits ARN régulateurs (environ 22 nucléotides), capables de réprimer la traduction ou d'entraîner la dégradation de certains transcrits ARN en se fixant sur eux. Dans les CSH, ces mi-ARN ont notamment été montrés comme ayant un rôle dans le potentiel de reconstitution et dans la régulation de gènes jouant un rôle dans l'auto-renouvellement des CSH, tels que *Hoxb6* et *Hoxa4* (Arnold et al., 2011).

En particulier, la délétion du miR-29a entraîne une diminution du nombre de CSH, de leur auto-renouvellement ainsi qu'une augmentation de la prolifération et de l'apoptose (Hu et al., 2015). L'absence du miR-21 entraîne une perte de la quiescence et de la capacité de reconstitution à long-terme (Hu et al., 2020). Le miR-126 aide à maintenir la quiescence des CSH en bloquant la progression du cycle cellulaire déclenchée par l'activation de la voie PI3K/Akt (Lechman et al., 2012). Le megacluster de miRNA produit par le locus composé des gènes « *Delta Like Non canonical Notch Ligand 1* » (*Dlk1*) et « *Glycosyltransferase-like protein* » (*Gtl2*) inhibe dans son intégralité la voie de signalisation PI3K-mTOR, ce qui en retour supprime la biogenèse mitochondriale et l'activité métabolique, réduisant la production de ROS et protégeant ainsi les CSH (Qian et al., 2016). Pour finir, les souris déplétées en miR-143/145 présentent une diminution des CSH et une activation des progéniteurs, liées à une dérégulation de la voie du « Transforming Growth Factor beta » (TGFβ) (Lam et al., 2018).

Les voies de détoxification

Les ROS sont essentiels dans certains processus physiologiques trouvés dans les CSH. En effet, l'élévation circadienne des niveaux de ROS a été montrée comme favorisant la différenciation des CSH pendant la journée et comme permettant la rétention et le maintien de leur auto-renouvellement pendant la nuit (Golan et al., 2018). En revanche, de trop hauts niveaux de ROS peuvent endommager l'ADN, déclencher l'entrée en cycle des CSH ou encore leur apoptose et au final mener à l'épuisement des CSH (Hu and Wang, 2019). Les CSH disposent ainsi de plusieurs voies de détoxification leur permettant de maintenir un niveau bas de ROS.

La famille des facteurs de transcription FoxO

La famille des protéines « Forkhead Box O » ou FoxO (FoxO1, FoxO3, FoxO4 et FoxO6) constitue l'un des effecteurs de la voie PI3K/Akt et est impliquée dans la résistance au stress et l'apoptose, mais également dans la régulation du cycle cellulaire et dans la différenciation des CSH (Wang et Ema, 2016) (**Figure 9**).

La triple délétion de *FoxO1*, *FoxO3* et *FoxO4* entraîne chez les CSH une augmentation des ROS, du cycle cellulaire, de l'apoptose et un défaut de l'activité de repopulation à long-terme. L'utilisation du NAC

sur les souris permet la réversion du phénotype des CSH délétées en FoxO, mettant en évidence que les protéines FoxO jouent un rôle dans la réponse des CSH au stress oxydatif (Tothova et al., 2007). Ce phénotype déficient des CSH est récapitulé dans un modèle de souris KO spécifiquement déficientes en FoxO3a, suggérant un rôle central de ce facteur de transcription en particulier. Le rôle de FoxO3a dans la détoxification des ROS semble passer par l'activation de gènes codants pour la superoxyde dismutase 2 (SOD2) et la catalase, deux enzymes très impliquées dans la détoxification des ROS (Miyamoto et al., 2007). FoxO3a a également été montrée comme réduisant le taux de ROS en partie *via* la régulation d'ATM, un autre acteur de suppression du stress oxydatif dans les CSH (Yalcin et al., 2008). Pour finir FoxO3a a également été décrite comme ayant un rôle dans l'induction de l'autophagie dans les CSH, mécanisme également connu pour son rôle dans la protection des CSH vis-à-vis du stress oxydatif (Warr et al., 2013).

ATM

La protéine-kinase « Ataxia Telangiectasia Mutated » (ATM) est activée en réponse aux dommages à l'ADN et est nécessaire pour une réparation normale de l'ADN ainsi que pour l'élimination du stress oxydant (Ito and Suda, 2014).

Les souris KO pour ATM ont des CSH avec un taux élevé de ROS, une capacité de reconstitution altérée et une diminution de la proportion de cellules quiescentes. Un traitement au NAC permet de restaurer leur capacité de reconstitution ainsi que leur quiescence, démontrant un rôle d'ATM dans la détoxification des ROS et donc dans la maintenance des CSH (Ito et al., 2004, 2006). Cette régulation des ROS passe notamment par la phosphorylation et l'inhibition de la protéine pro-apoptotique « BH3 interacting-domain death agonist » (Bid) par ATM. La délétion d'ATM ou la perte de phosphorylation de Bid entraîne une augmentation de Bid dans la mitochondrie, corrélée avec une augmentation du stress oxydatif mitochondrial (Maryanovich et al., 2012).

La voie Nrf2/Keap1

La voie de signalisation impliquant la protéine « Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 » (Nrf2) et la protéine « Kelch-like ECH-associated protein 1 » (Keap1) ou voie Nrf2/Keap1 régule de nombreuses enzymes impliquées dans la détoxification des ROS tel que la SOD, la catalase, la thioredoxine ou la Glutathion Peroxydase 1 (GPX1) et est ainsi considérée comme une voie majeure de la détoxification (Hu et al., 2019).

En plus de son rôle bien établi dans la régulation de la réponse au stress oxydatif, Nrf2 joue également un rôle dans l'homéostasie des CSH. En effet, les CSH de souris KO pour Nrf2 montrent une expansion augmentée, une perte de quiescence et une perte de leur capacité d'auto-renouvellement. De plus, la délétion de *Nrf2* entraîne une diminution de l'expression de CXCR4, le récepteur membranaire de la

protéine « C-X-C motif chemokine 12 » (CXCL12) qui est une cytokine majeure de la niche hématopoïétique, responsable du maintien des CSH dans leur niche (Tsai et al., 2013b). Les CSPH de souris KO pour Nrf2 présentent également un taux d'apoptose plus élevé et une survie diminuée lors de l'exposition à un stress oxydatif, bien qu'elles présentent un niveau normal de ROS (Merchant et al., 2011). Au contraire, l'activation persistante de Nrf2, *via* une déficience de son régulateur négatif Keap1, provoque l'entrée des CSH dans le cycle cellulaire et leur différenciation aux dépens de leur quiescence (Murakami et al., 2017).

Les signaux extrinsèques

Les CSH étant responsables du maintien de l'hématopoïèse, elles sont très sensibles aux signaux extérieurs provenant de leur environnement. Ces signaux extérieurs vont permettre d'indiquer aux CSH quels sont les besoins de l'organisme et vont donc agir sur les différentes voies de signalisation régulant ces cellules.

L'hypoxie

Les CSH se trouvent dans un microenvironnement particulier, la niche hématopoïétique, notamment caractérisé par une concentration faible en oxygène. Les CSH sont adaptées à cette niche hypoxique et beaucoup de leurs fonctions dépendent de cette composante. La famille des « Facteurs Induits par l'Hypoxie » (Hif) régule ainsi de nombreux mécanismes responsables du maintien de l'homéostasie des CSH.

Hif1 α est considéré comme un régulateur clé du métabolisme (Kocabas et al., 2012). La délétion de *Hif1 α* entraîne une perte de la quiescence des CSH et une baisse de leur nombre dans des conditions de stress (Takubo et al., 2010). Hif1 α empêche les CSH de s'engager dans la voie de l'acide citrique et maintient ainsi la glycolyse comme source d'énergie principale. Ce mécanisme s'effectue au travers d'un mécanisme dépendant des Kinases Pyruvate-Déshydrogénase (PDK). En effet une perte de PDK2 et PDK4 diminue la quiescence, la glycolyse et la capacité de transplantation des CSH (Takubo et al., 2013).

Plusieurs facteurs de transcription ont été montrés comme ayant un rôle dans la régulation des protéines Hif. Par exemple, la protéine « Meis Homeobox1 » (Meis1) semble être un des grands régulateurs de l'expression de Hif1 α et Hif2 α (Kocabas et al., 2012) et la protéine « Cbp/p300 interacting transactivator with Glu/Asp Rich Carboxy-Terminal Domain 2 » (Cited2) régule la quiescence des HSC en partie *via* la régulation de Hif1 α (Du et al., 2012).

Signaux du micro-environnement

Les signaux provenant des cellules de la niche hématopoïétiques, de la matrice extracellulaire (MEC) mais aussi d'autres structures de l'organisme vont avoir un rôle décisif dans la régulation des CSH. On citera les exemples du TGF β , de la périostine et de la thrombopoïétine.

Le TGF β , sécrété par les macrophages et les mégacaryocytes de la niche, va activer les protéines de la famille smad en se fixant sur ses récepteurs, les TGF β R1 et TGF β R2 (Rossi et al., 2012). Les protéines smad2/3 ont notamment été montrées comme étant activées dans les CSH quiescentes mais pas dans les progéniteurs en cycle (Yamazaki et al., 2011). Le blocage de la voie TGF β pendant l'homéostasie empêche la mise en cycle des CSH alors que son blocage pendant la reconstitution hématopoïétique accélère la régénération et retarde le retour en G0 des CSH. Ces actions semblent notamment passer par la régulation du CKI p57 (Brenet et al., 2013). Des souris déficientes en « Pre-B-cell leukemia transcription factor 1 » (Pbx1), un des régulateurs de la voie TGF β , montrent une altération de leur réponse transcriptionnelle suite à une stimulation au TGF β . Cette réponse est associée à une diminution des CSH, avec perte de leur quiescence et de leur capacité d'auto-renouvellement (Ficara et al., 2008). Récemment, l'endogline (CD105), un des récepteurs de la voie TGF β , a été montré comme un facteur essentiel à la modulation de cette voie et donc au maintien de la quiescence des CSH (Borges et al., 2019).

La périostine, une protéine de la MEC, permet la maintenance de la quiescence des CSH *via* son interaction avec les intégrines- α V à la surface des CSH. Cette interaction entraîne l'inhibition de la voie de signalisation PI3K/Akt conduisant à une augmentation de l'expression de p27^{KIP1}, un CKI, provoquant la maintenance de la quiescence (Khurana et al., 2016).

La fixation de la thrombopoïétine (TPO), hormone synthétisée par les hépatocytes, à son récepteur le « Myeloproliferative Leukemia Protein » (MPL) semble également important pour le maintien de la quiescence des CSH. En effet, les CSH de souris déplétées en TPO présentent une perte de quiescence et une expression réduite des CKI p57 et p19 (Qian et al., 2007).

Ainsi un grand nombre de facteurs internes et externes à la CSH vont permettre de réguler sa quiescence, ses fonctions et son intégrité. Il est à noter que la majorité des facteurs externes responsables de cette régulation proviennent du microenvironnement des CSH, à savoir la niche hématopoïétique.

B. La niche hématopoïétique

Le système hématopoïétique est responsable de la production des cellules sanguines tout au long de la vie d'un individu. Cela implique que son fonctionnement doit être très finement régulé, à la fois dans des conditions homéostatiques mais également lors de phénomènes de réponse au stress. Au niveau des CSH de la moelle osseuse, cette régulation se fait au travers de phénomènes intrinsèques comme la régulation du cycle cellulaire ou du métabolisme (voir partie précédente) et extrinsèques. Les phénomènes extrinsèques proviennent, pour la majeure partie, des cellules formant le microenvironnement des CSH dans la moelle osseuse et qui forment ce qu'on appelle la « niche hématopoïétique ».

Depuis que le concept de niche hématopoïétique a été proposé par Ray Schoefield en 1978, de nombreux acteurs cellulaires ont été identifiés comme composants de celle-ci. De nos jours, la niche hématopoïétique décrit principalement un réseau complexe de cellules qui, par leurs interactions ou leurs sécrétions, vont réguler le maintien, la prolifération, la différenciation et la protection des CSH.

Cette régulation est réalisée à la fois par des cellules non hématopoïétiques, à savoir les cellules de la lignée ostéoblastique, les cellules souches mésenchymateuses, les adipocytes, les cellules endothéliales et les cellules neurales et gliales, mais aussi par des cellules de la lignée hématopoïétique tels que les mégacaryocytes (MGK), les ostéoclastes, les lymphocytes T régulateurs (T^{reg}), les neutrophiles, les cellules dendritiques et les macrophages.

Ces différents acteurs cellulaires ne vont pas former une niche homogène, mais plusieurs microenvironnements qui vont réguler différemment les CSH qui leur sont associées. Ceci va permettre d'assurer à la fois la quiescence nécessaire au maintien de la réserve de CSH, mais également la mise en prolifération et la mobilisation, nécessaires aux CSH afin d'assurer une hématopoïèse fonctionnelle et réactive.

1) Les acteurs cellulaires de la niche

a) Les populations non hématopoïétiques

La lignée ostéoblastique

Les ostéoblastes ont été les premières cellules de la niche hématopoïétique à être identifiées. Dès les années 1970, la région endostéale de l'os, c'est à dire la zone de jonction entre l'os et la moelle

osseuse, a été montrée comme étant enrichie en progéniteurs hématopoïétiques (Lord et al., 1975; Gong, 1978). Des études de greffes ont ensuite démontré un nichage préférentiel des CSH dans cette région (Nilsson et al., 2001) donnant du poids au concept de « niche endostéale ».

Par leur localisation au niveau de cette zone interne de l'os, les ostéoblastes ont donc été rapidement identifiés comme de potentielles cellules régulatrices des CSH. Les premières études *in vitro* de co-culture ont en effet montré que les ostéoblastes pouvaient augmenter la prolifération des CSH (Taichman et al., 1996). De plus, des expériences *in vivo* de co-transplantation ont montré une meilleure prise de greffe lorsque les CSH étaient injectées avec des cellules ostéoblastiques (El-Badri et al., 1998).

Il faudra attendre la création de souris transgéniques pour clarifier le rôle des ostéoblastes dans la régulation des CSH. La déplétion des ostéoblastes dans des souris Col2.3 Δ TK (avec induction au Ganciclovir) a notamment montré une diminution du nombre de KLS (Visnjic et al., 2004) mais aussi de certaines CSH plus immatures, associée à une perte de leur quiescence et de leur capacité d'auto-renouvellement (Bowers et al., 2015).

Par ailleurs, l'inactivation du récepteur de la protéine osseuse morphogénétique (BMP) a montré l'augmentation d'une population particulière d'ostéoblastes appelés « spindle shaped N-Cadherin⁺ CD45^{neg} osteoblastic cells » (SNO) et corrélée à une augmentation des CSH (Zhang et al., 2003). Au vu de la co-localisation de ces deux types cellulaires, cette étude propose également l'hypothèse que les ostéoblastes et les CSH seraient en contact direct *via* l'expression de la N-cadhérine (N-Cadh) à la surface des deux types cellulaires. Ces ostéoblastes N-Cadh⁺ auraient également un rôle dans la régulation de la voie Wnt impliquée dans la maintenance des CSH (Sugimura et al., 2012). Toutefois l'expression de N-Cadh à la surface des CSH et l'interaction directe avec les ostéoblastes N-Cadh⁺ a été depuis remis en question, tout comme le lien entre le nombre d'ostéoblastes et le nombre de CSH (Kiel et al., 2007). Ces conclusions sont donc à considérer avec précaution.

L'activation constitutive des récepteurs à la PTH (hormone parathyroïdienne) et à la PTHrP (PTH-related protein) dans les ostéoblastes du modèle de souris Col1-caPPR entraîne une augmentation de leur nombre, corrélée à une augmentation du réservoir de CSH *via* l'augmentation de la sécrétion de Jagged 1, un ligand de Notch (Calvi et al., 2003). Cette augmentation du nombre de CSH dans la moelle osseuse a également été démontrée après traitement direct des souris avec de la PTH (Adams et al., 2007). Cependant, ces conclusions sont à considérer avec prudence car il a été montré que les récepteurs à PTH/PTHrP (PPRs) pouvaient être exprimés par d'autres cellules de la niche hématopoïétique tels que les ostéocytes qui sont des cellules ostéoblastiques matures, localisées dans la matrice osseuse. Chez des souris transgéniques dont les PPRs sont activés constitutivement et spécifiquement dans les ostéocytes (modèle de souris DMP1-CaPTHrP1), il a été montré une

augmentation des ostéoblastes, mais celle-ci n'est pas corrélée à une augmentation des CSH (O'Brien et al., 2008; Calvi et al., 2012).

En plus de Jagged 1, les ostéoblastes produisent des facteurs de croissance et des cytokines importants dans la régulation des CSH. Par exemple, l'ostéopontine (OPN) participe au mécanisme de localisation des CSH mais joue également un rôle de régulateur négatif de leur prolifération (Nilsson et al., 2005; Stier et al., 2005). Les ostéoblastes sécrètent également du CXCL12, aussi appelé « Stromal cell Derived Factor 1 » (SDF-1), une cytokine majeure dans la régulation des CSH (Jung et al., 2006; Sugiyama et al., 2006). Cependant, la déplétion spécifique de CXCL12 dans les ostéoblastes dans le modèle Col2.3-Cre n'a montré aucun effet sur les CSH mais entraîne la diminution de certains progéniteurs lymphoïdes (CLP et LMPP) (Ding and Morrison, 2013).

L'ensemble des données initiales semblaient donc indiquer un rôle majeur des ostéoblastes dans le maintien, la quiescence et le nombre des CSH dans la moelle osseuse. Toutefois des études plus récentes, permettant une meilleure identification des cellules, sont venues nuancer ces observations et il est maintenant admis que, bien que ces cellules aient une importance dans la niche hématopoïétique, ce rôle est vraisemblablement indirect.

La découverte progressive de nouveaux marqueurs des CSH, mais également l'amélioration des techniques d'imagerie, ont permis d'affiner la localisation des CSH dans la moelle osseuse.

Les études plus récentes ont ainsi démontré une localisation des CSH préférentiellement près des vaisseaux sanguins de la moelle osseuse et non pas au niveau de l'endosteum appuyant le concept de « niche vasculaire » (Kiel et al., 2005).

La découverte de la niche vasculaire a en revanche mis en lumière une famille de cellules très hétérogènes et particulièrement importantes pour la régulation des CSH : Les cellules stromales.

Les cellules souches mésenchymateuses

La découverte de la localisation préférentielle des CSH au niveau des vaisseaux de la moelle osseuse a permis de mettre en lumière une nouvelle population de cellules de la niche hématopoïétique : les cellules péri-vasculaires, également appelé péricytes. Ces cellules représentent en réalité un ensemble hétérogène de cellules stromales immatures : Les « *Mesenchymal Stem Cells* » (MSC). Ces cellules ont une fonction de support de l'hématopoïèse mais ont également des capacités d'auto-renouvellement et sont à l'origine des cellules des lignées ostéoblastiques, adipocytaires et chondrocytaires, comme démontré pour la première fois par Friendenstein en 1987 (**Figure 10**).

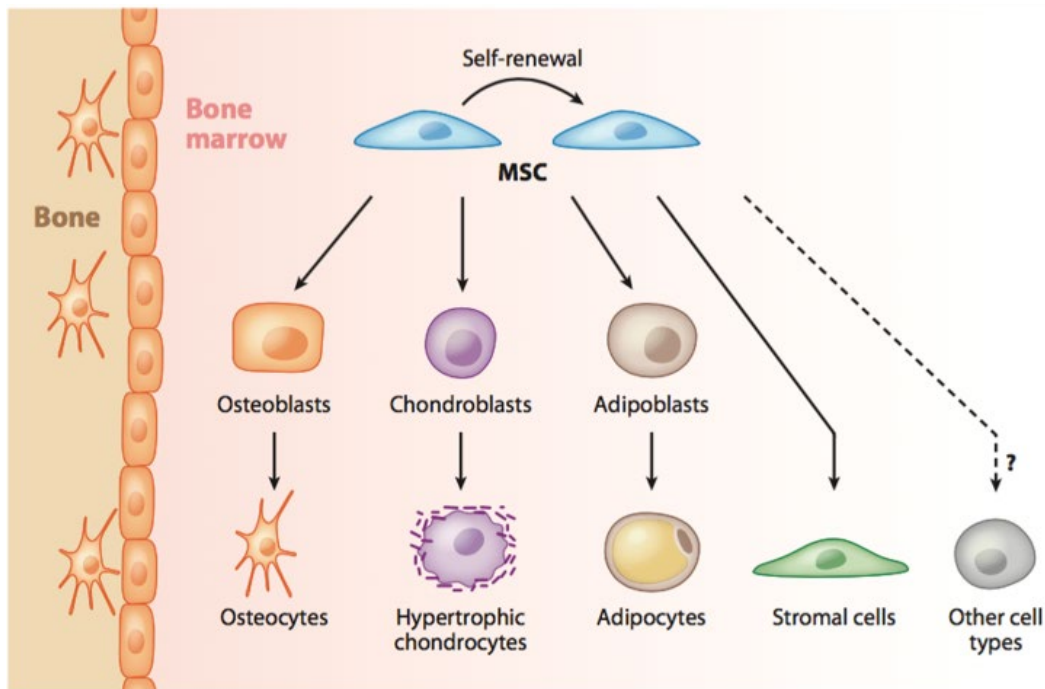


Figure 10 : Représentation schématique des différentes voies de différenciation des MSC.

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) comme toutes cellules souches sont capables d'auto-renouvellement et peuvent également se différencier en plusieurs types cellulaires différents. Les MSC de la moelle osseuse peuvent donner naissance aux ostéoblastes qui en mûrissant donneront les ostéocytes, aux chondroblastes à l'origine des chondrocytes et aux adipoblastes qui donneront des adipocytes matures.

Les MSC de la moelle osseuse peuvent également se différencier en cellules stromales matures voire en cellules provenant des différents feuilletts embryonnaires, mettant en évidence une possible mais encore controversée pluripotence des MSC

(Frenette et al., 2013)

La découverte progressive de nouveaux marqueurs spécifiques des cellules stromales, couplée à la création de modèles de souris transgéniques associés, a permis d'identifier les différentes populations de cellules stromales ayant un rôle dans la régulation des CSH. Malgré l'hétérogénéité des phénotypes référencés, certaines populations se démarquent par leur importance dans la niche hématopoïétique. C'est le cas notamment des cellules CAR, mais aussi des cellules LEPR⁺, Nestin⁺, NG2⁺ et PDGFRα⁺. Des cellules CD73⁺ et Prx1⁺ ont également été identifiées mais ont été moins étudiées.

Les cellules CAR ou « CXCL12-Abundant Reticular Cells » situées au niveau des sinusoides sont des cellules stromales produisant de grandes quantités de CXCL12 et de « Stem Cell Factor » (SCF), deux cytokines très importantes dans la régulation des CSH. Le CXCL12 et le SCF sont en effet des facteurs clés dans le maintien du réservoir de CSH, dans la régulation de leur quiescence et de leur potentiel de

régénération. Leurs récepteurs à la surface des CSH sont respectivement CXCR4 et c-Kit (Sugiyama et al., 2006; Tzeng et al., 2011). La déplétion des cellules CAR dans des souris CXCL12-DTR-GFP entraîne une baisse du nombre des CSH et une augmentation de leur quiescence (Omatsu et al., 2010). Les cellules CAR semblent exprimer fortement l'Hème Oxygénase 1 (HO-1). L'absence de cette molécule entraîne une réduction de la quiescence et du potentiel de régénération des CSH (Szade et al., 2019). L'HO-1 participerait également à la rétention des CSH en modulant positivement le niveau de CXCL12 dans la niche hématopoïétique (Wysoczynski et al., 2015).

Les cellules exprimant le récepteur à la leptine (LEPR), décrites sous le nom de cellules LEPR⁺, expriment également de hauts niveaux de CXCL12 et de SCF. Grâce à l'utilisation de souris LEPR-Cre, il a été montré que la déplétion de CXCL12 dans les cellules LEPR⁺ entraîne une mobilisation des CSH (Ding and Morrison, 2013) et que la déplétion du SCF entraîne une réduction de leur nombre dans la moelle osseuse (Ding et al., 2012). Ces cellules LEPR⁺ ont aussi été montrées comme étant une source importante de pléiotrophine (PTN) qui permet le maintien de l'homéostasie des CSH (Himburg et al., 2018), mais également d'angiopoïétine qui permet, par son caractère angiogénique, de réguler la reconstitution de la niche hématopoïétique après myéloablation (Zhou et al., 2015). Une étude plus récente a également mis en évidence que les cellules LEPR⁺ sont les principaux producteurs de CXCL12, de SCF et d'angiopoïétine de la niche hématopoïétique. Toutefois cette étude a également montré que le marqueur LEPR, bien qu'exprimé par la majorité des cellules stromales, est également exprimé par des cellules de la lignée ostéoblastique et endothéliale (Baryawno et al., 2019).

De plus, sachant que la majorité des cellules CAR, expriment également le LEPR et que les cellules CAR et LEPR⁺ se situent toutes deux principalement au niveau des sinusoides de la moelle osseuse, les études s'accordent à dire que les cellules CAR et les cellules LEPR⁺ représenteraient, pour leur grande majorité, la même population cellulaire (Zhou et al., 2014; Baryawno et al., 2019).

Les cellules CAR forment d'ailleurs une population hétérogène. On citera notamment (i) les cellules Adipo-CAR, qui se dirigent plutôt vers la lignée adipocytaire, présentent de hauts niveaux de LEPR et ont une localisation plutôt sinusoidale, (ii) les cellules Ostéo-CAR, qui se dirigent vers la lignée ostéoblastique et se situent plutôt dans les régions endostéale et artériolaire. Ces deux sous-populations représentent les principaux producteurs de CXCL12 et dédient la plus grande partie de leur activité transcriptionnelle à la production de facteurs pro-hématopoïétiques (IL7, Csf1 ...) (Baccin et al., 2020).

Les cellules stromales exprimant la Nestin ont également été identifiées comme ayant un rôle dans la maintenance des CSH puisque leur déplétion entraîne une réduction du nombre de CSH (Méndez-Ferrer et al., 2010; Asada et al., 2017). Ces cellules Nestin⁺ ont également un rôle dans la régulation de

l'érythropoïèse *via* la régulation des macrophages qui se trouvent au centre des îlots érythroblastiques (Sakamoto et al., 2019). Il est toutefois à noter que le marqueur Nestin permet d'identifier certaines cellules stromales, mais aussi des ostéoblastes et certaines cellules neurales (Coutu et al., 2017).

Les cellules exprimant le « *Neural/Glial Antigen 2* » dénommées NG2⁺ sont également une source de CXCL12 et de SCF. La déplétion de CXCL12 dans ces cellules (modèle de souris NG2-Cre) entraîne une réduction du nombre de CSH, alors que la déplétion du SCF ne semble pas avoir d'impact (Asada et al., 2017). Cette dernière observation peut être expliquée par la proportion de cellules NG2⁺ par rapport aux cellules LEPR⁺/CAR cells. En effet les cellules Nestin⁺ NG2⁺ LEPR^{neg} situées au niveau des artérioles de la région endostéale ne représentent que 10% des cellules Nestin⁺, alors que les cellules Nestin⁺ NG2^{neg} LEPR⁺ situées au niveau des sinusoides représentent les 90% restants (Kunisaki et al., 2013). Toutefois, il est à noter que l'existence de cellules à la fois Nestin⁺ et LEPR⁺ a été discutée dans une étude utilisant la cytométrie de masse plutôt que des souris transgéniques (Severe et al., 2019).

L'analyse de ces résultats se complique également par le fait que le marqueur NG2 identifie certaines MSC, mais aussi d'autres cellules de la moelle osseuse comme les chondrocytes, certains ostéoblastes et les ostéocytes (Zhou et al., 2014).

En plus de ces marqueurs, d'autres cellules exprimant le « Platelet Derived Growth Factor Receptor alpha » (PDGFR α) ont été montrées comme faisant partie de la niche périvasculaire (Morikawa et al., 2009) et exprimant fortement des gènes impliqués dans la maintenance des CSH (Pinho et al., 2013). Les cellules LEPR⁺ ont été montrées comme exprimant ce marqueur (Zhou et al., 2014).

On pourra citer également les cellules exprimant la peroxyrédoxine 1 (PRX1) qui, lorsqu'elles sont déplétées en CXCL12, contribuent à une perte du nombre de CSH, de leur capacité de repopulation et de leur quiescence. Il est toutefois à noter que le modèle Prx1-Cre cible les cellules stromales mais également les ostéoblastes et les ostéocytes (Greenbaum et al., 2013).

Récemment un nouveau type de cellules stromales exprimant le CD73 a été identifié. Leur déplétion entraîne une légère baisse du nombre de CSH, mais surtout, il a été montré que des KLS greffées dans des souris *CD73*^{-/-} préalablement irradiées létalement ont un défaut de nichage puisque deux fois moins de KLS ont été mesurées au niveau du calvarium des souris 48h après transplantation (Severe et al., 2019).

Pour finir, les cellules N-Cadh⁺, précédemment identifiées comme des ostéoblastes (voir partie sur ostéoblastes et (Zhang et al., 2003), seraient en fait des MSC localisées dans la niche endostéale et

permettant la protection et la restauration du réservoir de CSH après un stress. En effet, la délétion du SCF dans ces cellules N-Cadh⁺ entraîne une diminution du nombre de CSH lors d'épisodes de stress, comme par exemple une chimiothérapie myélosuppressive au fluorouracile (5-FU) (Zhao et al., 2019).

L'ensemble de ces études montre qu'il existe un très vaste panel de MSC impliqué dans la régulation des CSH. Seules les cellules les plus décrites dans la littérature ont été présentées ici. Toutefois il est compliqué de pouvoir conclure quant au rôle précis de chacune de ces cellules stromales ou même de leurs descendants ostéoblastiques, car les principaux modèles d'études sont des souris transgéniques plus ou moins spécifiques d'une population définie. En plus des modèles déjà décrits on pourra citer le modèle Ocn-Cre, utilisé dans de nombreuses études sur les ostéoblastes, qui dépléterait également 70% des cellules CAR et certaines cellules stromales NG2⁺ artériolaires. De même, le modèle de souris utilisant le promoteur DMP1 pour la déplétion des ostéocytes ciblerait 40% des cellules CAR (Zhang and Link, 2016).

L'ensemble de ces données permet donc de conclure que les MSC jouent un rôle central dans la régulation de la niche hématopoïétique, mais également que la plupart des populations décrites ont des marqueurs communs et une action redondante possible sur les CSH.

Il faut également noter qu'en plus d'agir directement sur les CSH, les MSC sont également à l'origine d'autres cellules de la niche hématopoïétique comme les cellules ostéoblastiques et adipocytaires.

Les adipocytes

La population adipocytaire joue un rôle important dans la moelle osseuse. Cependant les adipocytes ont d'abord été identifiés comme des cellules à fonction de remplissage et non comme des régulateurs potentiels de l'hématopoïèse (Cuminetti and Arranz, 2019). Les premières études sur leur rôle dans la niche hématopoïétique ont décrit les adipocytes comme des régulateurs négatifs des CSH. Tout d'abord, une corrélation a été établie entre la fréquence des CSH et la proportion d'adipocytes dans la moelle osseuse. Chez la souris, au niveau des vertèbres caudales riches en adipocytes, la fréquence des CSH est faible, alors qu'au niveau des vertèbres thoraciques, pauvres en adipocytes, la fréquence des CSH est élevée. De plus, la capacité de greffe des CSH est accélérée dans des modèles chimiques ou génétiques de souris où l'adipogenèse est réduite (Naveiras et al., 2009). Il a également été montré qu'à la suite d'une chimiothérapie à haute dose, la reconstitution hématopoïétique était meilleure dans des souris dont l'adipogenèse était inhibée (Zhu et al., 2013). Pour finir, il a été montré qu'une greffe intra-tibiale de cellules adipocytaires inhibait la reprise hématopoïétique dans des souris irradiées et greffées (Ambrosi et al., 2017).

De façon contradictoire, d'autres études semblent indiquer un rôle clé des adipocytes pendant la régénération hématopoïétique. En effet, les premières observations ont montré une augmentation de la quantité d'adipocytes dans la moelle osseuse après irradiation, corrélée à une prolifération des CSH (Yamazaki and Allen, 1991). Les adipocytes ont aussi été montrés comme source de SCF. La déplétion de SCF spécifiquement dans les adipocytes entraîne une diminution des CSH, inhibe la régénération hématopoïétique et diminue le nombre de CSH après myéloablation (Zhou et al., 2017; Zhang et al., 2019b).

Les adipocytes sécrètent également des facteurs pouvant agir sur les CSH. L'adiponectine a été montrée comme stimulant la prolifération des CSH *in vitro*, via l'activation de la voie p38/ « Mitogen-Activated Protein Kinase » (MAPK). De plus le prétraitement des CSH avec de l'adiponectine permet l'amélioration de leur potentiel de reconstitution hématopoïétique (DiMascio et al., 2007). Un traitement myélo-suppressif (5-FU ou irradiation sublétales) de souris *Adipoq*^{-/-}, déficientes en adiponectine, entraîne une restauration retardée de l'hématopoïèse, associée à un défaut d'entrée en cycle des CSH (Masamoto et al., 2017).

Les adipocytes sont également une source d'acides gras dont l'oxydation aurait un rôle dans la régulation du réservoir de CSH via leur récepteur Ppar δ (Ito et al., 2012; Cuminetti and Arranz, 2019).

En résumé, les résultats bien que contradictoires semblent indiquer un rôle des adipocytes dans la régénération hématopoïétique, mais pas dans l'homéostasie du tissu hématopoïétique. En effet, une augmentation du nombre d'adipocytes *in vivo* ne semble pas affecter la fréquence des CSH (Spindler et al., 2014).

Les cellules endothéliales

Afin de pouvoir assurer le « turnover » important du tissu hématopoïétique, la vascularisation joue un rôle fondamental au niveau de la moelle osseuse. Les cellules endothéliales (EC) qui composent la paroi des vaisseaux ont une action essentielle dans la régulation des CSH. Dès 2007, le groupe de J.P. Chute a émis l'hypothèse d'une corrélation entre la régénération de l'environnement vasculaire de la moelle osseuse et la reconstitution hématopoïétique *in vivo*. En effet, cette équipe a montré que, suite à une atteinte de la moelle osseuse consécutive à une irradiation sublétales ou létale, l'injection d'EC ou de progéniteurs endothéliaux accélère et améliore de manière significative la reconstitution hématopoïétique (Chute et al., 2007; Salter et al., 2009).

Tout comme les cellules stromales avec lesquelles elles sont en étroite relation, les EC sécrètent du SCF et du CXCL12. La déplétion du SCF dans les cellules endothéliales entraîne une diminution du

nombre de CSH (Ding et al., 2012) et la déplétion du CXCL12 entraîne une légère diminution de leur capacité de repopulation (Greenbaum et al., 2013).

Parmi les autres facteurs produits par les cellules endothéliales, on trouve la PTN qui peut se fixer au niveau du « PTN receptor Protein Tyrosine phosphatase zeta » (PTP ζ) à la surface des CSH (Himburg et al., 2018). En homéostasie, la PTN sécrétée par les cellules LEPR⁺ joue un rôle dans le maintien des CSH. Cependant, suite à une myéloablation, la PTN sécrétée par les EC semble avoir un rôle dans la régénération des CSH (Himburg et al., 2018).

Les cellules endothéliales sécrètent également des ligands de la voie Notch qui aident à la reconstitution du réservoir de CSH après myéloablation (Butler et al., 2010). En particulier, la délétion de *jagged-1* spécifiquement dans les EC entraîne un épuisement précoce du réservoir de CSH (Poulos et al., 2013) alors que celle de *jagged-2* promeut la reconstitution hématopoïétique après myéloablation (Guo et al., 2017).

Tout comme les cellules stromales CAR, les cellules endothéliales expriment également de hauts niveaux d'HO-1 (voir partie cellules stromales CAR et (Szade et al., 2019).

Plus récemment, une sous-population de cellules endothéliales exprimant l'apeline a été montrée comme ayant un rôle dans la régulation des CSH *via* l'expression de PTN et de certains ligands de la voie Notch. Elles auraient également un rôle dans la régénération de la moelle osseuse après myéloablation (Chen et al., 2019).

Enfin, les cellules endothéliales peuvent être séparées en deux grands groupes :

- Les cellules endothéliales artériolaires ou « Arteriolar Endothelial Cell » (AEC)

Ces cellules ont été décrites comme ayant une localisation péri-endostéale (Baryawno et al., 2019) et semblent sécréter la quasi-totalité du SCF produit par les EC (Tikhonova et al., 2019). La déplétion du SCF spécifiquement dans ces AEC entraîne une réduction de la fonctionnalité des CSH (Xu et al., 2018). Les AEC vont également pouvoir favoriser l'adhésion des CSH exprimant l'EPCR et réduire leur migration *via* la sécrétion de son ligand l'aPC (Itkin et al., 2016). De plus, les AEC expriment de façon importante la « Vascular Cell Adhesion protein 1 » (VCAM-1) qui contrôle la rétention des Cellules Souches et des Progéniteurs Hématopoïétiques (CSPH) (Papayannopoulou et al., 2001).

- Les cellules endothéliales sinusoidales ou « Sinusoidal Endothelial Cell » (SEC)

Ces cellules expriment des niveaux importants d'E-selectine, dont le blocage ou la déficience entraîne une augmentation de la quiescence et des capacités d'auto-renouvellement des CSH (Winkler, 2012). Certaines de ces cellules exprimeraient également le LEPR, tout comme une partie des cellules stromales (Coutu et al., 2017).

Les cellules endothéliales sont donc importantes dans la régulation des CSH, notamment *via* la sécrétion de certains facteurs essentiels. Toutefois la distinction des rôles imputables aux AEC et aux SEC semblent dessiner une différence de régulation entre l'environnement artériolaire et sinusoidal.

Les cellules neurales et gliales

Étroitement associé au réseau vasculaire de la moelle osseuse, le réseau neuronal joue également un rôle dans la régulation des CSH. Ce sont principalement les nerfs du système nerveux sympathique (SNS), innervant à la fois l'os et la moelle osseuse (Mach et al., 2002), qui ont été montrés comme ayant un rôle dans l'environnement hématopoïétique. Ces nerfs sont, pour la plupart, associés aux artérioles de la niche hématopoïétique (Pinho and Frenette, 2019).

Les MSC Nestin⁺ précédemment décrites sont sensibles à l'action du SNS dans la niche hématopoïétique. La sécrétion de noradrénaline par les nerfs du SNS va entraîner des oscillations circadiennes dans l'expression de CXCL12 par les MSC Nestin⁺ et provoquer la mobilisation cyclique des CSH (Mendez-Ferrer et al., 2008). Plus récemment, il a été montré que le système parasympathique joue également un rôle dans ce mécanisme. Durant la nuit, les signaux cholinergiques du système parasympathique affaiblissent les signaux noradrénergiques du SNS et donc diminuent la mobilisation des CSH. Ainsi, les deux branches du système nerveux autonome participeraient à cette mobilisation cyclique (García-García et al., 2019).

Les signaux du SNS semblent également importants dans la régénération hématopoïétique puisque l'administration de drogues neuroprotectives entraîne une meilleure récupération hématopoïétique en réponse à un stress génotoxique (Lucas et al., 2013).

Le SNS a aussi été montré comme jouant un rôle dans la mobilisation des CSH en réponse à l'administration de G-CSF. Le G-CSF est une cytokine sécrétée essentiellement par les cellules endothéliales en réponse à une inflammation (Boettcher et al., 2014). Elle est également utilisée comme agent mobilisateur des CSH en thérapie clinique. Le G-CSF entrainerait une déplétion des ostéoblastes et des ostéocytes, médiée par le SNS *via* les récepteurs adrénérgiques présents à la surface de ces cellules. Leur déplétion entrainerait alors une diminution de CXCL12 dans la niche hématopoïétique, provoquant la mobilisation des CSH (Katayama et al., 2006; Asada et al., 2013).

Une autre action du G-CSF *via* le SNS est la libération du neuropeptide Y (NPY) qui, en se fixant sur les ostéoblastes, entraîne la libération de la métalloprotéase matricielle 9 (MMP9) augmentant encore plus la mobilisation des CSH en clivant le CXCL12 (Park et al., 2016).

Des souris KO pour le NPY ont un nombre réduit de CSH et une régénération hématopoïétique altérée après myéloablation. La régénération hématopoïétique médiée par le NPY serait en fait assurée par une action des macrophages stimulés par ce neuropeptide (Park et al., 2015). Plus récemment, il a été montré que le NPY interagissait directement avec les CSH et modulait leur quiescence (Ulum et al., 2020).

Enroulées autour des nerfs associés aux artérioles de la moelle osseuse, on trouve une catégorie de cellules gliales : les cellules de Schwann non myélinisées. Ces cellules favorisent la quiescence des CSH en activant le TGF β latent présent dans l'environnement (Yamazaki et al., 2011).

Elles ont été montrées comme exprimant le NG2 qui est également un marqueur des cellules stromales (Zhou et al., 2014).

En plus de son rôle dans la mobilisation cyclique des CSH, le système parasympathique a été montré comme ayant un rôle sur la régulation de la masse osseuse (Bajayo et al., 2012).

Bien que les nerfs sensitifs aient été décrits dans la moelle osseuse et l'os, aucune étude n'a montré un rôle potentiel de ceux-ci envers les CSH (Mach et al., 2002).

L'ensemble des travaux montre ainsi un rôle du SNS dans de nombreux mécanismes cellulaires affectant la mobilisation des CSH, mais également dans la régénération du système hématopoïétique après myéloablation. Les cellules gliales associées au SNS dans la moelle auraient plutôt un rôle dans le maintien de la quiescence.

En plus de ces différents types de cellules non hématopoïétiques impliqués dans la régulation des CSH, la niche hématopoïétique est également constituée de descendants des CSH, capables d'intervenir dans leur régulation.

b) Les populations hématopoïétiques

Mégacaryocytes

Les mégacaryocytes (MGK), principalement connus comme cellules productrices des plaquettes sanguines, ont également un rôle dans la niche hématopoïétique, où elles sont physiquement proches de certaines CSH.

En effet, la déplétion des MGK augmente la prolifération des CSH. Cette sortie de quiescence passe par l'absence de sécrétion de « C-X-C chemokine Ligand 4 » (CXCL4), une chimiokine sécrétée par les MGK et dont le rôle est de favoriser la quiescence et donc de maintenir le réservoir de CSH (Bruns et al., 2014).

Les MGK réguleraient également la quiescence *via* la sécrétion de la cytokine TGFβ1 (Zhao et al., 2014). Pour finir, les MGK auraient un rôle dans la récupération hématopoïétique suite à une chimiothérapie *via* la sécrétion du facteur de croissance « Fibroblast Growth Factor 1 » (FGF1) (Zhao et al., 2014). Ils auraient également un rôle dans le remodelage de la niche hématopoïétique après irradiation en favorisant l'expansion des cellules ostéoblastiques (Olson et al., 2013).

Les MGK ont donc majoritairement un rôle dans le maintien de la quiescence mais semblent aussi impliqués dans la récupération hématopoïétique.

Les ostéoclastes

L'os est un tissu en perpétuelle évolution. Les ostéoblastes sont responsables de sa formation et les ostéoclastes en opposition sont responsables de sa résorption. Cette résorption du tissu osseux va permettre de renouveler le squelette, mais aussi de créer de nouveaux espaces pour la moelle osseuse (Birbrair and Frenette, 2016).

En plus de son rôle central au sein du tissu osseux, l'action des ostéoclastes va pouvoir affecter de façon plus directe les CSH. En effet, dans un modèle de souris traitées au biphosphonate alendronate (ALN) chez lesquelles la quantité d'ostéoclastes est réduite de plus de la moitié, on observe une diminution du nombre de CSH, ainsi qu'un délai dans la reconstitution hématopoïétique après transplantation de moelle osseuse à ces souris (Lymperi et al., 2011).

La stimulation des ostéoclastes, par exemple par des signaux de stress, va entraîner la sécrétion d'enzymes tel que la cathepsine K ou la MMP9. Ces enzymes vont alors cliver des éléments cruciaux impliqués dans le maintien des CSH dans la niche tels que le SCF, le CXCL12 et l'OPN, altérant ainsi le gradient de ces enzymes et entraînant la mobilisation des progéniteurs hématopoïétiques (Kollet et al., 2006).

Pour finir, la résorption osseuse par les ostéoclastes augmente la concentration de calcium dans l'environnement ce qui permet d'attirer et de retenir les CSH au niveau de la niche endostéale (Adams et al., 2006).

Le remodelage de l'os dû à la balance ostéoblaste/ostéoclaste a donc une importance majeure dans l'environnement des CSH et dans leur régulation.

Les lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs (T^{reg}) sont un sous-type de lymphocytes T CD4⁺ ayant un rôle clé dans l'homéostasie immune, notamment par leur capacité à supprimer la réponse immunitaire (Kawai et al., 2018). Cette capacité est très augmentée chez les T^{reg} de la moelle osseuse (BM-T^{reg}) par rapport

aux T^{reg} périphériques. Les BM-T^{reg} sont caractérisés par une expression du facteur de transcription Foxp3 plus importante que dans d'autres organes (Glatman Zaretsky et al., 2017). Ils semblent également capables de créer un environnement favorable à la greffe de CSH allogéniques afin qu'elles puissent s'établir et de se maintenir sans être rejetées (Fujisaki et al., 2011). Ces observations tendent à appuyer l'idée que la moelle osseuse serait un site de privilège immun.

Parmi les T^{reg} Foxp3⁺ de la moelle osseuse, une sous-population exprimant fortement le marqueur CD150 (CD150^{high} T^{reg}), a été montré comme pouvant contrôler la quiescence des CSH afin de les protéger d'un stress oxydatif. Cette sous-population permet aussi de favoriser la prise de greffe de CSH allogéniques en évitant leur rejet, *via* la sécrétion d'adénosine qui peut se fixer à l'« Adenosine 2A Receptor » (A2AR) à la surface des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques (CSPH). En effet, la diminution du nombre de CD150^{high} T^{reg} entraîne une augmentation du nombre de CSH (Hirata et al., 2018).

Les lymphocytes T^{reg} semblent donc se situer à l'interface entre les mécanismes de l'immunité et la régulation de l'hématopoïèse.

Les neutrophiles

Les neutrophiles représentent la catégorie de leucocytes qui constitue la première ligne de défense de l'organisme lors d'infections. Ils sont rapidement recrutés sur les sites d'infection et sont capables de reconnaître puis de phagocyter les microbes, ainsi que de tuer certains pathogènes (Cossío et al., 2019).

Ils semblent également avoir un rôle dans les oscillations circadiennes de mobilisation des CSH (voir partie sur le SNS et (Méndez-Ferrer et al., 2008). Les neutrophiles ont une durée de vie courte (entre 6 et 12h environ) et sont des cellules extrêmement nombreuses dans l'organisme. Leur élimination se fait en partie dans la moelle osseuse. Les neutrophiles âgés sont phagocytés par les macrophages résidents de la moelle suivant un rythme circadien qui précède la mobilisation cyclique des CSH. La phagocytose des neutrophiles va entraîner l'activation du récepteur LXR (*Liver X receptor*) des macrophages ce qui, par un mécanisme encore non élucidé, va conduire à la baisse de production de CXCL12 dans la moelle et induire ainsi la mobilisation des CSH (Casanova-Acebes et al., 2013).

Les neutrophiles semblent également avoir un rôle dans la réponse de la niche hématopoïétique au G-CSF. Le G-CSF entraîne une augmentation du nombre de neutrophiles, mais aussi stimule le SNS pour induire la production de PGE2 par les neutrophiles. La PGE2 sécrétée agirait sur la population ostéoblastique qui, en sécrétant de l'OPN, permettrait de retenir les CSH dans la niche

hématopoïétique (Kawano et al., 2017). Cette cascade d'événements permettrait de s'opposer à la mobilisation des CSH observée après administration du G-CSF et dépendant du mécanisme affectant la concentration de CXCL12 (voir partie sur le SNS et (Katayama et al., 2006). Le mécanisme d'action de PGE2 a en effet été montré comme étant indépendant du mécanisme du CXCL12 (Hoggatt et al., 2013).

Ainsi les neutrophiles, bien que n'agissant pas directement sur les CSH, semblent avoir un rôle dans les mécanismes de mobilisation de ces cellules.

Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) sont présentes dans la majorité des tissus de l'organisme et participent à l'activation des cellules immunitaires *via* la sécrétion de nombreuses cytokines et chimiokines.

Dans la moelle osseuse, on les appelle DC résidentes et leur localisation périvasculaire se situe à la fois au niveau des sinusoides et des artérioles.

Grâce au modèle de souris *Zbtb46^{dtr}*, il a été montré que l'élimination des cellules dendritiques de la moelle osseuse entraîne une mobilisation des CSPH en lien avec l'action du G-CSF, ainsi qu'une déplétion en macrophages. Cette mobilisation des CSPH due à l'absence de DC est plus importante que lors d'une élimination des macrophages seuls (Zhang et al., 2019a).

Tout comme les neutrophiles, les cellules dendritiques ne semblent pas avoir de rôle direct dans la régulation des CSH mais plutôt un rôle dans l'équilibre de la niche hématopoïétique et dans le maintien de certaines populations hématopoïétiques matures.

Les macrophages

Les macrophages sont également des acteurs centraux à la fois dans la régulation des CSH et de l'hématopoïèse de façon plus générale. Leurs rôles seront détaillés dans la partie suivante (chapitre B, partie 2) qui leur est dédiée.

c) L'organisation spatiale de la niche

L'ensemble des études ayant identifié et décrit les rôles de chaque population cellulaire de la niche hématopoïétique dans la régulation des CSH, a montré une grande complexité et une grande hétérogénéité de ce microenvironnement. On peut d'ailleurs affirmer qu'il n'existe pas une, mais plusieurs niches, dont les compositions cellulaires et moléculaires diffèrent pour chacune d'entre elles. De façon simplifiée, on définit généralement trois niches principales : endostéale, artériolaire et sinusoidale (**Figure 11 ; Table 1**).

La niche endostéale située dans la région de l'endosteum, c'est à dire à la jonction de l'os et de la moelle osseuse, est principalement constituée des cellules de la lignée ostéoblastique, à savoir les ostéoblastes et leurs cellules filles, les ostéocytes et les ostéoclastes. La régulation des CSH dans cette région est donc fortement liée aux mécanismes de remodelage de l'os assuré par ces différentes populations cellulaires.

La niche artériolaire, souvent proche de l'endosteum, est en rapport étroit avec la niche endostéale. On considère qu'elle ne contient que 10 à 15% des CSH (Acar et al., 2015; Coutu et al., 2017). Elle est composée d'artérioles, associées aux cellules stromales NG2⁺ mais également aux nerfs sympathiques et aux cellules de Schwann non myélinisées qui les accompagnent. Les CSH contenues dans cette niche présentent un métabolisme très quiescent, associé à des niveaux bas d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'oxyde nitrique (NO).

Les seules cellules avec un faible seuil de ROS (ROS^{low}) identifiées loin des artères, sont localisées près des MGK, ce qui soutient l'idée que les MGK produiraient un environnement favorisant la quiescence des CSH et ce, malgré leur localisation sinusoidale.

La niche sinusoidale, quant à elle, contient environ 85% des CSH (Acar et al., 2015) et présente une localisation plutôt centrale au niveau de la moelle osseuse. Elle est composée de vaisseaux sinusoidaux et de cellules stromales exprimant des hauts niveaux de CXCL12, c'est à dire principalement les cellules CAR/LEPR⁺. Les mécanismes de migration trans-endothéliale se passent exclusivement au niveau de ces sinusoides. Les CSH associées aux sinusoides présentent un niveau de ROS plus important que celles associées aux artérioles. Or, il a été montré qu'une quantité élevée de ROS (ROS^{high}) augmente la mobilisation des CSH (Tesio et al., 2011). Une des explications retenues pour expliquer ce niveau de ROS plus important est que, les sinusoides étant plus lâches, les CSH sont en contact plus étroit avec le plasma qui contient des facteurs induisant des ROS (Itkin et al., 2016) comme par exemple la Sphingosine-1-Phosphate (S1P) (Golan et al., 2012).

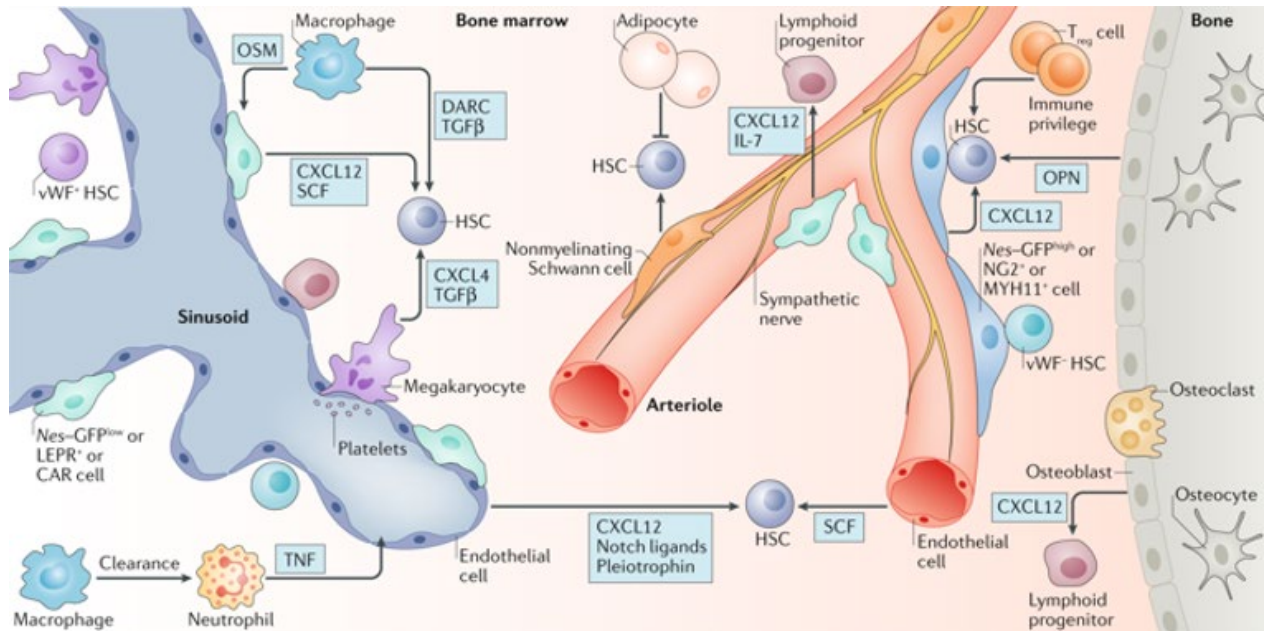


Figure 11 : Représentation schématique de la niche hématopoïétique.

Ce schéma de la niche hématopoïétique représente les principaux acteurs cellulaires et moléculaires ayant un rôle dans la régulation des CSH et de l'hématopoïèse. A droite, on distingue tout d'abord la région endostéale de l'os composée des cellules de la lignée ostéoblastique (ostéoblastes et ostéocytes) et des ostéoclastes. Cette région semble avoir un rôle assez indirect dans la régulation des CSH même si les mécanismes d'homéostasie osseuse sont en relation étroite avec ceux de l'homéostasie de la moelle osseuse.

A gauche de la région endostéale, on trouve le micro-environnement artériolaire qui est souvent décrit à proximité de cette région endostéale. Il est composé de vaisseaux artériolaires entourés de cellules stromales, principalement $NG2^+$, et de nerfs sympathiques associés à des cellules gliales. Cette région favorise la quiescence et le maintien des CSH dans la niche.

Enfin, à gauche du schéma est représentée la région sinusoidale composée de vaisseaux entourés de cellules stromales riches en CXCL12 et qui présente une localisation plus centrale dans la moelle. C'est dans cette région que les CSH pourront être mobilisée et pourront rejoindre la circulation sanguine. (Pinho and Frenette, 2019)

Type cellulaire	Localisation	Rôle envers les CSH	Sécrétion/Récepteurs (CSH)
Ostéoblastes	Endostéale ⁽¹⁾	Rôle indirect dans la rétention dans la niche ⁽²⁾	Ostéopontine/Intégrines ^(3,4) ou CD44 ⁽³⁾ Jagged1/Récepteur Notch ⁽¹⁾
Cellules stromales Cellules CAR Cellules LEPR Cellules Nestin Cellules NG2 ⁺ Cellules PDGFR α Cellules Prx1 Cellules CD73 ⁺ Cellules N-Cadherin ⁺	Périvasculaire et endostéale ^(5,6)	Rétention dans la niche ⁽⁷⁾ Maintien de l'homéostasie ^(8, 9, 10, 11, 12, 13, 14) Protection dans des conditions de stress ^(10,15,16)	CXCL12/CXCR4 ⁽⁸⁾ SCF/cKit ⁽¹⁵⁾ Angiopoïétine-1/Tie2 ⁽¹⁷⁾ PTN/PTP ζ ⁽¹⁰⁾
Adipocytes	Pas de localisation précise	Régénération hématopoïétique ^(18, 19, 20)	SCF/cKit ^(19, 20) Adiponectine/AdipoR1 et R2 ^(21, 22) Acides Gras/PPAR δ ^(23, 24)
Cellules endothéliales AEC SEC	Vasculaire ⁽²⁵⁾	Régénération hématopoïétique ⁽²⁶⁾ Maintien de l'homéostasie ^(27, 28) Rétention dans la niche ⁽²⁹⁾	SCF/cKit ^(28,30,31) CXCL12/CXCR4 ⁽³²⁾ PTN/PTP ζ ^(10, 33) Jagged 1-2/Récepteur Notch ^(26, 27, 33) aPC/EPCR ⁽²⁹⁾
Le système nerveux	Associé aux artérioles ⁽³⁴⁾	Mobilisation circadienne des CSH ^(35, 36) Régénération hématopoïétique ⁽³⁷⁾ Réponse au G-CSF ^(2, 38) Maintien de la quiescence (cellules gliales) ⁽³⁹⁾	NPY/Y1,2,4 et 5 ⁽⁴⁰⁾
Mégacaryocytes	Sinusoidale ⁽²⁹⁾	Maintien de la quiescence ^(41, 42) Régénération hématopoïétique ⁽⁴²⁾	TGF β 1/TGF β 1R ^(42, 43) FGF1/FGF1R ^(42, 44)
Ostéoclastes	Endostéale ⁽⁴⁵⁾	Rétention dans la niche ^(46, 47) Rôle indirect via le remodelage de l'os et la balance ostéoblaste/ostéoclaste ⁽⁴⁵⁾	/
Lymphocytes T régulateurs	Pas de localisation précise	Favorise la greffe des CSH ^(48, 49) Maintien de la quiescence ⁽⁴⁹⁾	Adénosine/A2AR ⁽⁴⁹⁾
Neutrophiles	Sanguine ⁽⁵⁰⁾	Rôle indirect dans la mobilisation circadienne et la réponse au G-CSF ^(51, 52)	/
Les cellules dendritiques	Périvasculaire ⁽⁵³⁾	Réponse au G-CSF ⁽⁵³⁾	/

Table 1 : Tableau récapitulatif des différentes cellules de la niche hématopoïétique, de leur localisation, de leur rôle envers les CSH et de leurs sécrétions exerçant une action directe sur les CSH.

(1) (Calvi et al., 2003) (2) (Katayama et al., 2006) (3) (Nilsson et al., 2005) (4) (Stier et al., 2005) (5) (Baccin et al., 2020) (6) (Kunisaki et al., 2013) (7) (Ding and Morrison, 2013) (8) (Sugiyama et al., 2006) (9) (Ding et al., 2012) (10) (Himburg et al., 2018) (11) (Méndez-Ferrer et al., 2010) (12) (Asada et al., 2017) (13) (Pinho et al., 2013) (14) (Greenbaum et al., 2013) (15) (Tzeng et al., 2011) (16) (Zhao et al., 2019) (17) (Arai et al., 2004) (18) (Zhu et al., 2013) (19) (Zhang et al., 2019b) (20) (Zhou et al., 2017) (21) (DiMascio et al., 2007) (22) (Masamoto et al., 2017) (23) (Ito et al., 2012) (24) (Cuminetti and Arranz, 2019) (25) (Baryawno et al., 2019) (26) (Guo et al., 2017) (27) (Poulos et al., 2013) (28) (Ding et al., 2012) (29) (Itkin et al., 2016) (30) (Tikhonova et al., 2019) (31) (Xu et al., 2018) (32) (Greenbaum et al., 2013) (33) (Chen et al., 2019) (34) (Pinho and Frenette, 2019) (35) (Méndez-Ferrer et al., 2008) (36) (García-García et al., 2019) (37) (Lucas et al., 2013) (38) (Asada et al., 2013) (39) (Yamazaki et al., 2011) (40) (Ullum et al., 2020) (41) (Bruns et al., 2014) (42) (Zhao et al., 2014) (43) (Wang et al., 2018a) (44) (Zhao et al., 2012) (45) (Birbrair and Frenette, 2016) (46) (Kollet et al., 2006) (47) (Adams et al., 2006) (48) (Fujisaki et al., 2011) (49) (Hirata et al., 2018) (50) (Cossío et al., 2019) (51) (Casanova-Acebes et al., 2013) (52) (Kawano et al., 2017) (53) (Zhang et al., 2019a)

Cette description de la niche hématopoïétique est très simplifiée et doit être considérée avec précaution. En effet, toutes les études ne s'accordent pas quant à la répartition des CSH dans la moelle osseuse, ou quant aux rôles exacts des cellules de la niche dans leur régulation. La majorité des études se basent sur l'utilisation de modèles de déplétion constitutifs qui affectent la niche et les CSH depuis l'embryogenèse, entraînant sûrement des conséquences collatérales dans la niche hématopoïétique adulte. De plus, toutes les études ne se basent pas sur les mêmes classifications ou sur le même matériel (les différents os du corps ne présentent pas les mêmes anatomies). Le fait même d'éliminer une population est également discutable au vu de la mort cellulaire et donc de l'inflammation associée qui va s'établir. Pour finir, les effets indirects inhérents à la déplétion d'un certain type cellulaire à la fois dans la niche hématopoïétique, mais également dans tous les autres organes, doublés à la redondance de nombreux mécanismes et marqueurs cellulaires trouvés dans la niche rendent parfois les conclusions difficiles à établir (Kokkaliaris, 2020).

d) Les autres acteurs de la régulation des CSH

La régulation des CSH par les différents acteurs cellulaires de la niche hématopoïétique est un champ d'étude extrêmement vaste, mais une autre structure toute aussi importante du microenvironnement est souvent laissée de côté : la matrice extracellulaire (MEC). Certaines études se sont toutefois focalisées sur la régulation des CSH par les constituants de cette MEC. Par exemple, l'acide hyaluronique, un protéoglycane, a été montré comme réduisant le nichage des CSH après transplantation (Goncharova et al., 2012). La ténascine-C, un autre protéoglycane, a également été identifié comme régulateur de l'hématopoïèse en réponse à un stress. En effet, l'utilisation de souris KO pour la ténascine-C a montré une incapacité de ces souris à reconstituer une hématopoïèse après irradiation (Nakamura-Ishizu et al., 2012). Pour finir, des souris KO pour la périostine, une protéine de la MEC, ont un nombre de CSH augmenté. De plus, il a été montré que l'interaction de la périostine avec les CSH permet un maintien de leur quiescence (Khurana et al., 2016).

Bien que la niche hématopoïétique soit le principal régulateur des CSH, d'autres signaux provenant de cellules localisées en dehors de la moelle osseuse sont impliqués dans cette régulation. De façon non exhaustive, on citera notamment la TPO qui, lorsqu'elle est déplétée dans les hépatocytes, entraîne une perte de CSH dans la moelle osseuse (Decker et al., 2018). Il est à noter que c'est d'abord les cellules ostéoblastiques (Yoshihara et al., 2007) et les MGK (Nakamura-Ishizu et al., 2014b) qui avaient été considérés comme étant la source de TPO dans la niche hématopoïétique. La corticostérone, sécrétée par les glandes surrénales, présente quant à elle des oscillations circadiennes qui auraient un

rôle dans la régulation des oscillations circadiennes de CXCL12 dans la moelle osseuse et donc dans les mécanismes de mobilisation des CSH (Kollet et al., 2013).

Ainsi la régulation des CSH se situe à la fois dans son microenvironnement mais également à l'échelle du corps entier. De nombreuses études seront encore nécessaires afin d'affiner les connaissances actuelles, mais également afin d'appréhender la réelle complexité de la régulation du système hématopoïétique.

2) Les macrophages

Les macrophages ont été décrits pour la première fois dans les années 1900 par Ilya Metchnikoff qui les identifie par leur activité de phagocytose des pathogènes (Munro and Hughes, 2017). Depuis, les macrophages sont reconnus comme étant une population extrêmement hétérogène dans ses phénotypes et ses fonctions. On distingue deux grands types de macrophages qui diffèrent de par leur origine embryonnaire, leurs fonctions et leur répartition dans l'organisme :

- Les macrophages circulants, dérivés des monocytes et spécialisés dans la résolution de l'inflammation.
- Les macrophages résidents des tissus qui, comme leur nom l'indique, se situent dans des environnements définis où ils participent à l'homéostasie et à la régulation du tissu.

Que ce soit dans un contexte homéostatique ou inflammatoire, les macrophages partagent les mêmes fonctions essentielles telle que la phagocytose, la présentation antigénique, l'établissement et la résolution de l'inflammation.

Plus spécifiquement, les macrophages résidents ont également des rôles ciblés en fonction des organes qu'ils occupent. Notamment, les macrophages résidents des organes hématopoïétiques comme la moelle osseuse et la rate ont été montrés comme jouant un rôle dans la régulation des CSH, de l'érythropoïèse et du tissu osseux.

a) Ontogénie des macrophages

La colonisation des organes en développement par les macrophages s'effectue au cours de la vie embryonnaire en trois phases qui se chevauchent dans le temps et qui correspondent aux trois phases de mise en place du système hématopoïétique (voir partie « ontogenèse du système hématopoïétique ») (**Figure 12**).

Colonisation de l'embryon par les macrophages.

La première vague de colonisation commence à E7 dans le sac vitellin lors de l'émergence des progéniteurs érythromyéloïdes (EMP) au niveau des îlots sanguins. Les premiers progéniteurs des macrophages, désignés comme des analogues des EMP ou EMP précoces, vont pouvoir se différencier directement en pré-macrophages, sans passer par une phase monocytique (Hoeffel et al., 2015). Le développement des vaisseaux primitifs à partir de E8,5 (Garcia and Larina, 2014) va permettre à ces pré-macrophages de commencer leur migration vers les tissus embryonnaires, de s'y implanter et de s'y différencier en macrophages primitifs. Ils vont notamment coloniser le cerveau en développement et constituer ce qui sera la microglie à l'âge adulte (Ginhoux et al., 2010; Kierdorf et al., 2013) ainsi que d'autres macrophages du système nerveux central (SNC) tel que les macrophages des méninges, des espaces péri-vasculaires et du plexus choroïde (Goldmann et al., 2016). Ces EMP précoces sont caractérisés par l'absence d'expression du facteur de transcription c-myb qui a été montré comme ayant un rôle majeur dans la régulation de certains processus hématopoïétiques (Schulz et al., 2012; Wang et al., 2018b).

La seconde vague de colonisation a lieu à partir de E8,25, toujours dans le sac vitellin, avec l'émergence des EMP parfois qualifiés d'EMP tardifs en opposition aux EMP précoces. Ces EMP tardifs migrent à travers l'embryon pour coloniser le foie fœtal où ils vont s'expandre jusqu'à E11,5 (Gomez Perdiguero et al., 2015). Contrairement aux EMP précoces, ces EMP tardifs expriment c-myb (Hoeffel et al., 2015) et vont se différencier en intermédiaires monocytiques, dits monocytes fœtaux, ou en pré-macrophages (Mass et al., 2016) qui vont pouvoir migrer du foie fœtal vers tous les tissus embryonnaires dès E13,5. Les macrophages résidents retrouvés dans les tissus à l'âge adulte semblent venir en grande majorité de ces monocytes fœtaux provenant du foie (Hoeffel et al., 2015). En effet, lors de leur établissement dans les tissus, ils vont progressivement remplacer les macrophages provenant du sac vitellin, bien qu'on puisse en observer encore une petite population à l'âge adulte. Une exception est la microglie ainsi que le SNC qui seront uniquement constitués de macrophages provenant de la première vague, du fait de la mise en place de la barrière hémato-encéphalique dès E13,5 (Ginhoux et al., 2013; Goldmann et al., 2016).

Toutefois les monocytes fœtaux ne proviennent pas tous des EMP tardifs. En effet, une partie d'entre eux provient de la différenciation des CSH également présentes dans le foie fœtal.

La troisième vague a donc pour origine les CSH ayant colonisé le foie fœtal vers E11 après leur émergence de l'endothélium hémogénique (voir paragraphe « ontogenèse du système hématopoïétique »). Ces CSH vont se différencier en monocytes qui vont aller coloniser les tissus fœtaux où ils effectueront leur maturation en macrophages résidents (Sheng et al., 2015).

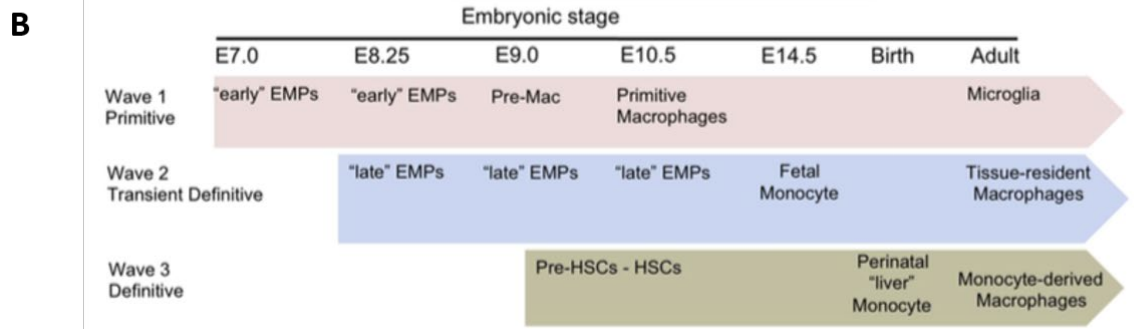
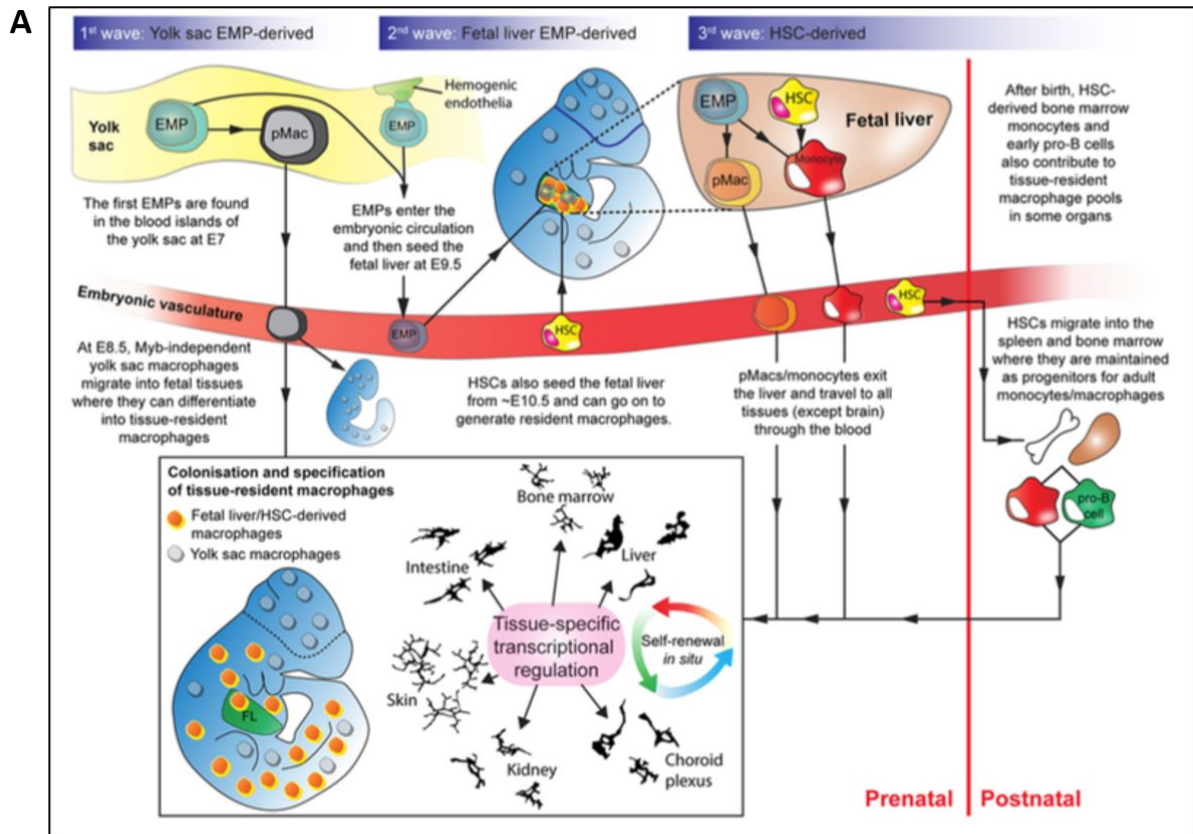


Figure 12 : Les trois vagues de colonisation des tissus par les macrophages.

(A) Représentation schématique de la migration des macrophages lors de l'embryogenèse

La première vague commence dès E7 lors de l'émergence d'EMP précoces au niveau des îlots sanguins du sac vitellin. Ces EMP précoces pourront ensuite maturer en pré-macrophages puis en macrophages primitifs une fois leur colonisation des tissus effectuée. Ils constitueront à l'âge adulte la microglie. La deuxième vague commence à E8,25 avec l'apparition des EMP tardifs qui vont ensuite migrer dans le foie fœtal, se différencier en monocytes fœtaux ou en pré-macrophages, puis coloniser tous les organes. Enfin la troisième vague est représentée par l'apparition des CSH à partir de l'endothélium hémogénique dans la région de l'AGM. Après avoir migré dans le foie fœtal, ces CSH pourront donner des monocytes fœtaux qui pourront se différencier en macrophages circulants ou en macrophages résidents dans une faible mesure. A l'âge adulte les macrophages résidents des différents tissus s'auto-renouvellent et peuvent parfois bénéficier de l'apport des monocytes circulants.

(Munro and Hughes, 2017)

(B) Représentation chronologique de la participation des différentes vagues à la population de macrophages adultes

Modifié de (Hoeffel and Ginhoux, 2018)

Bien qu'il soit reconnu que les monocytes dérivés des EMP tardifs et des CSH constituent la population cellulaire donnant naissance à la majorité des macrophages résidents à l'âge adulte, il semblerait que les monocytes provenant des EMP tardifs en soient les plus grands contributeurs (Hoeffel et al., 2015).

Ces macrophages résidents, une fois établis dans leurs tissus respectifs, y resteront durant toute la vie de l'individu (Hoeffel et al., 2015). Il est démontré que ces macrophages résidents peuvent s'auto-renouveler et que chez l'adulte les monocytes circulants ne contribuent que très peu au renouvellement de cette population de macrophages résidents (Hashimoto et al., 2013).

Les macrophages résidents dans les tissus adultes

Bien que la contribution des monocytes circulants provenant des CSH adultes soit considérée comme mineure dans le renouvellement des populations de macrophages résidents dans des tissus non endommagés, quelques tissus font exception, dont voici quelques exemples.

Alors que durant les premières semaines de vie l'intestin est constitué de macrophages résidents dérivés des monocytes fœtaux, il semble qu'il soit constitué uniquement de macrophages provenant de monocytes circulants chez l'adulte (Bain et al., 2014).

Bien que les macrophages résidents du plexus choroïde aient une origine embryonnaire, cette population cellulaire semblent provenir en partie des cellules sanguines (Goldmann et al., 2016). De même, les macrophages cardiaques semblent être progressivement remplacés par des macrophages issus de monocytes au cours de la vie des individus (Molawi et al., 2014).

Au niveau du testicule, les macrophages interstitiels ont également une origine embryonnaire mais sont ensuite remplacés par des macrophages provenant de monocytes. De façon intéressante, les macrophages pérیتubulaires ne s'établissent dans leur niche que lors de la formation testiculaire, c'est-à-dire deux semaines après la naissance. En effet cette population macrophagique provient uniquement de monocytes de la moelle osseuse, mais se comporte comme des macrophages résidents (Mossadegh-Keller et al., 2017).

Une autre étude a montré que les macrophages artériels d'origine embryonnaire sont remplacés dans les premières semaines de vie par des monocytes provenant de la moelle osseuse. Ces monocytes se différencient ensuite en macrophages artériels chez l'adulte. De façon intéressante, une fois implantés, ces macrophages, pourtant issus des monocytes circulants, vont être capables de s'auto-renouveler et ne profiteront que très peu de l'apport des monocytes sanguins chez l'adulte (Ensan et al., 2016).

La participation des monocytes à la formation de la population de macrophages résidents dans certains organes a également été montrée grâce à des modèles de déplétion de macrophages ou dans des

modèles d'inflammation. C'est le cas pour les macrophages cardiaques (Epelman et al., 2014) ou les cellules de Kupffer dans le foie (Scott et al., 2016).

Pour ajouter à cette complexité, une étude récente a mis en évidence une population de cellules pro-B issue de la moelle osseuse et capable de se différencier en macrophages résidents ou en macrophages inflammatoires en fonction des signaux de l'environnement (Audzevich et al., 2017).

En ce qui concerne les macrophages résidents de la moelle osseuse, leur origine embryonnaire n'a pas encore été clairement établie. Certaines études ont toutefois donné des pistes quant au renouvellement de cette population de macrophages médullaires. En effet, s'ils sont déplétés, ces macrophages sont capables de s'auto-renouveler et donc de restaurer leur pool sans aucune contribution monocyttaire (Hashimoto et al., 2013). D'un autre côté, les monocytes sont capables de se différencier en macrophages des îlots érythroblastiques de la moelle osseuse lorsqu'ils sont exposés à de l'hème (Haldar et al., 2014). D'autres études seront donc nécessaires pour conclure quant à la réelle contribution de l'auto-renouvellement et des monocytes dans le maintien à l'équilibre de la population des macrophages résidents de la moelle.

L'ensemble de ces résultats montre bien les différences d'origine et de répartition entre les macrophages résidents et les macrophages inflammatoires. Toutefois certaines études viennent illustrer la plasticité de ces cellules qui peuvent, dans certaines situations et en fonction du type d'organe, passer du statut de macrophages circulants à macrophages résidents. En effet il est à noter que ces cellules ont de nombreuses fonctions communes.

b) Fonctions des macrophages

Les macrophages, qu'ils soient circulants ou résidents, partagent de nombreuses fonctions. Une des principales fonctions qui a permis de les caractériser dans un premier temps est la phagocytose.

La phagocytose

La phagocytose est un processus de première importance pour l'immunité puisqu'il permet d'ingérer et d'éliminer les pathogènes. Ce mécanisme est également essentiel pour maintenir l'homéostasie des tissus grâce à son rôle dans l'élimination des cellules apoptotiques (Rosales and Uribe-Querol, 2017), mais aussi lors de phénomènes traumatiques ou inflammatoires entraînant une nécrose des tissus (Westman et al., 2020). Les cellules phagocytaires dites « professionnelles » de l'organisme regroupent les macrophages, les monocytes, les ostéoclastes, les neutrophiles, les cellules dendritiques et les

éosinophiles. De plus, les fibroblastes, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales sont considérés comme des cellules phagocytaires dites « non professionnelles » car seulement capables de phagocyter de petits éléments tels que les corps apoptotiques (Rosales and Uribe-Querol, 2017).

La phagocytose se décompose en 4 étapes principales :

- La reconnaissance de la particule cible par des récepteurs dédiés.
- Le déclenchement de la signalisation associée à ces récepteurs afin d'activer la machinerie d'internalisation.
- La formation du phagosome.
- La maturation du phagolysosome.

Les phagocytes, grâce à de très nombreux récepteurs différents à leurs surfaces, sont capables de reconnaître un très grand nombre de cibles, comme les bactéries, les champignons, les lipopolysaccharides (LPS) et les cellules apoptotiques ou nécrotiques (Hirayama et al., 2017).

Dans le cas des cellules apoptotiques ou nécrotiques, les phagocytes sont capables de reconnaître différentes molécules caractéristiques de ces états de mort cellulaire. La première étape de cette reconnaissance est la détection de signaux « *find me* » (trouvez-moi) émis par ces cellules. Ces signaux correspondent à des motifs moléculaires dits DAMP pour « *Damage Associated Molecular Pattern* ». Les molécules sont nombreuses et ne sont pas les mêmes en fonction de l'état apoptotique ou nécrotique de la cellule. Les principales molécules sont représentées dans la **figure 13** et vont agir comme des chimio-attractants pour les phagocytes.

Une fois à proximité des cellules apoptotiques ou nécrotiques, certains récepteurs à la surface des cellules phagocytaires vont pouvoir se lier spécifiquement à des molécules ligands se trouvant à la surface des cellules endommagées. Dans certains cas, les récepteurs peuvent également reconnaître des molécules de liaisons déjà fixées à la surface des cellules cibles. On parle de signaux « *eat me* » (mangez-moi). Dans le cas des cellules apoptotiques, c'est la Phosphatidyl-Sérine (PS) qui est la plus reconnue (Segawa and Nagata, 2015). En effet, ce phospholipide de la membrane plasmique est normalement retrouvé du côté intracellulaire, mais dans le cas d'une cellule apoptotique sa localisation augmente de 300% au niveau de la membrane extracellulaire. Ces signaux « *eat-me* » ne suffisent toutefois pas à signaler au phagocyte que la cellule est apoptotique. Des signaux « *don't eat me* » (ne me mangez pas), présents sur les cellules viables, doivent également être inhibés (CD46, CD47, CD31 ...). Dans le cas de la cellule nécrotique, les signaux « *eat me* » sont plus variables du fait de la façon plus « désordonnée » dont la cellule meurt et la diminution des signaux « *don't eat me* » n'a pas la même importance. Les principaux récepteurs et leurs ligands sont représentés dans la **figure 14**.

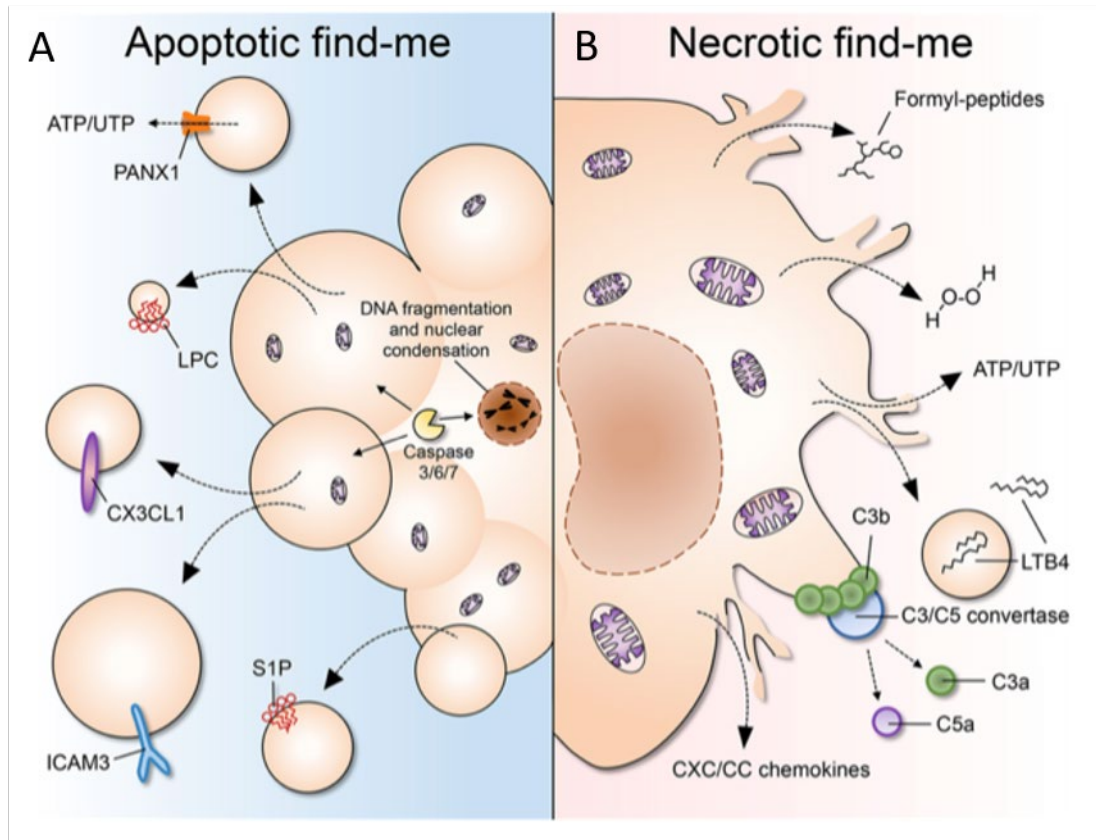


Figure 13 : Représentation des principaux signaux « trouvez-moi » des cellules apoptotiques et nécrotiques.

(A) Représentation des principaux signaux émis par les cellules apoptotiques. Ces signaux sont exposés à la surface de corps apoptotiques, d'exosomes ou sécrétés comme médiateurs solubles. Parmi ces signaux on trouve des molécules normalement contenues à l'intérieur des cellules telles que des molécules d'ATP, ici expulsées par les canaux PANX1 ou la sphingosine-1-phosphate (S1P). Certains lipides comme la lysophosphatidylcholine (LPC), des chimiokines comme le « C-X3-C Motif Chemokine Ligand 1 » (CX3CL1) et des molécules d'adhésion comme l'ICAM3 peuvent également jouer le rôle de signal d'attraction des phagocytes.

(B) Représentation des principaux signaux émis par les cellules nécrotiques. Du fait de la désorganisation de la membrane plasmique inhérent à ce système de mort cellulaire, les principaux signaux sont des éléments solubles provenant du cytoplasme de la cellule. On trouve notamment des peptides formylés provenant des mitochondries, des molécules d' H_2O_2 , d'ATP, du leucotriène B4 (LTB4) et de nombreuses chimiokines. De plus, le système du complément, en se fixant sur les cellules nécrotiques, va également pouvoir agir comme signal chimioattractant des phagocytes.

(Westman et al., 2020)

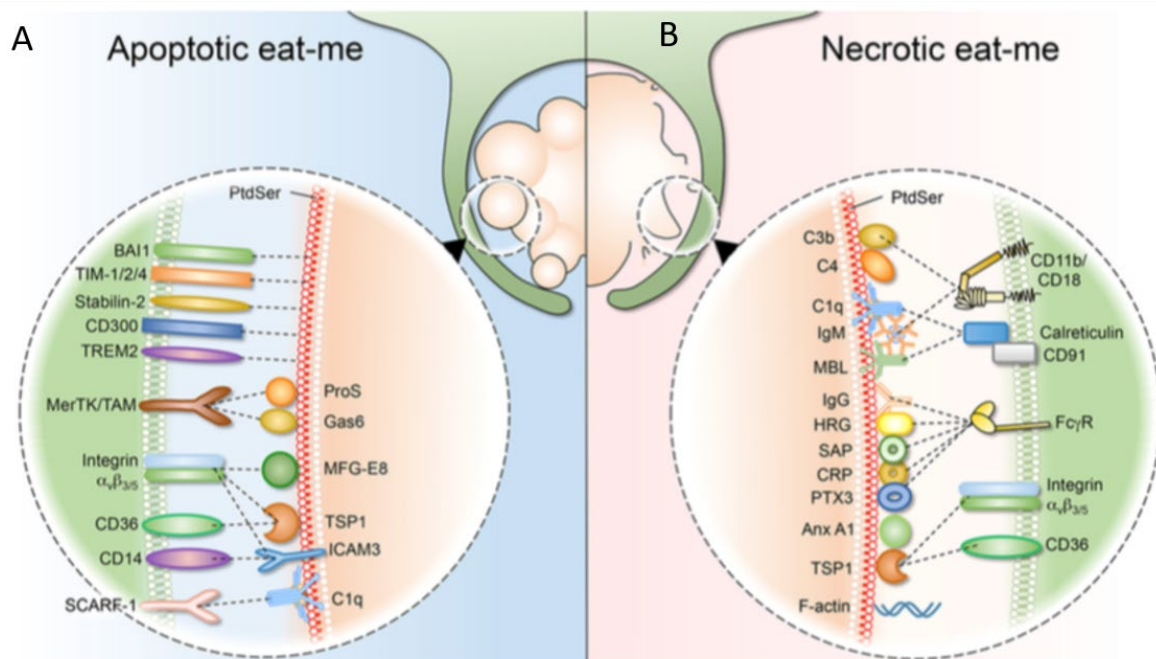


Figure 14 : Représentation des principaux signaux « mangez-moi » des cellules apoptotiques et nécrotiques ainsi que des récepteurs associés sur les cellules phagocytaires.

(A) Représentation des principales liaisons s'établissant entre un phagocyte et une cellule apoptotique.

De nombreux récepteurs reconnaissent la Phosphatidyl-Sérine (PS) dont la présence extracellulaire est une des caractéristiques des cellules apoptotiques. On trouve des récepteurs de la famille des TIM, BAI-1 (Brain Specific Angiogenesis Inhibitor 1), la stabilin-2, le CD300 et TREM2 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2). Des molécules ligands se liant à la PS peuvent aussi être reconnues par certains récepteurs. Ces molécules regroupent la protéine S (ProS), Gas6 (Growth arrest specific 6), MFG-E8 (Milk Fat Globule Epidermal growth factor) ou encore la fraction C1q du complément. Elles sont fixées par des récepteurs de la famille des intégrines, TAM, MerTK (Myeloid-epithelial-reproductive protein tyrosine kinase) et SCARF-1 (Scavenger Receptor Class F member 1). Pour finir, certaines protéines de la membrane telles que la thrombospondine 1 (TSP1) et ICAM3 peuvent être fixées par des récepteurs de la famille des intégrines ainsi que par le CD36 et le CD14 respectivement.

(B) Représentation des principales liaisons s'établissant entre un phagocyte et une cellule nécrotique.

Certains mécanismes de reconnaissance sont les mêmes que dans le cas des cellules apoptotiques tels que la liaison entre les intégrines ou le CD36 des cellules phagocytaires et la protéine TSP1. Le système du complément est largement plus impliqué dans la reconnaissance des cellules nécrotiques. Ainsi des IgG, des IgM ainsi que les fractions C3b et C1q peuvent être reconnues *via* les récepteurs Fcγ et les complexes CD11b/CD18 et CD91/Calreticuline des cellules phagocytaires. Les complexes CD91/Calreticuline et les récepteurs Fcγ reconnaissent également (i) des molécules impliquées dans l'initiation et l'activation du complément, le MBL (Mannose-Binding Lectin) et la pentaxrine 3 (PTX3) respectivement (ii) des molécules se comportant comme des opsonines, la SAP et la protéine C-réactive (CRP) ou (iii) des protéines se liant à des ligands cytoplasmiques de cellules nécrotiques tel que la glycoprotéine riche en histidine (HRG).

(Westman et al., 2020)

Une fois le récepteur lié à son ligand, une dépression de la membrane appelée coupe phagocytaire se forme au point de contact. Pour se faire, la membrane effectue un remodelage de ses lipides et du cytosquelette d'actine se trouvant sous la membrane. Ce remodelage entraîne la formation de pseudopodes qui vont alors entourer la particule à phagocyter. En attirant la cible et en coopérant entre eux, les récepteurs vont participer à l'enveloppement de la particule.

Une fois que la membrane entoure complètement la particule, il se forme une vésicule que l'on appelle phagosome précoce. Une fois formé, le phagosome précoce fusionne avec des endosomes de tri et de recyclage, aussi appelés endosomes précoces, qui sont de petites vésicules provenant de l'endocytose. Le phagosome précoce va également s'acidifier grâce à l'accumulation membranaire d'une hydrolase, l'ATPase de type vacuolaire (V-ATPase) (Marshansky and Futai, 2008) qui permet la translocation de protons H^+ à l'intérieur de la vésicule. Il présente alors un pH légèrement acide (pH 6,1-6,5) mais peu destructif. Ce phagosome précoce va ensuite passer par plusieurs stades de maturation afin d'acquérir la capacité de détruire la particule ingérée.

Le phagosome précoce va ensuite fusionner avec des vésicules provenant du réticulum endoplasmique (Campbell-Valois et al., 2012; Nunes et al., 2012), de l'appareil de Golgi (Wahe et al., 2010; Vashi et al., 2017) ainsi qu'avec des endosomes tardifs (Rink et al., 2005) qui sont des corps multi-vésiculaires contenant des hydrolases. Le phagosome va aussi présenter de plus en plus de V-ATPases à sa membrane acidifiant encore son milieu interne (pH 5,5-6) : C'est le phagosome tardif.

Enfin, le phagosome tardif fusionne avec le lysosome pour former un phagolysosome présentant un milieu interne acide (pH jusqu'à 4,5) due à une présence très importante de V-ATPases à sa membrane. Il contient également de nombreuses enzymes hydrolytiques, principalement apportées par le lysosome, tels que des cathepsines et autres protéases, des lysozymes et des lipases. Il contient également des NADPH oxydases (NOX) qui, *via* la génération de superoxydes (O_2^-), entraîne la formation d'espèces réactive de l'oxygène (ROS) (Babior, 2004). Au final le phagolysosome présente un environnement acide, oxydatif et destructif lui permettant de dégrader la particule phagocytée. Une fois la dégradation effectuée, le phagolysosome est certainement détruit ou recyclé, mais à ce jour, aucune étude n'a vraiment statué sur son devenir (**Figure 15**).

Cette description de la phagocytose est une description générale et certaines variations peuvent exister entre les différents types de phagocytes par exemple au niveau des types de récepteurs présents à leurs surfaces ou encore aux types de particules phagocytées. La multiplicité des modèles utilisés et le nombre d'études à ce jour ne permettent pas actuellement de conclure sur ces différences.

La phagocytose, en plus de son rôle central dans la dégradation des éléments à éliminer de l'organisme, est également importante dans un autre mécanisme trouvé chez les macrophages, la présentation d'antigènes.

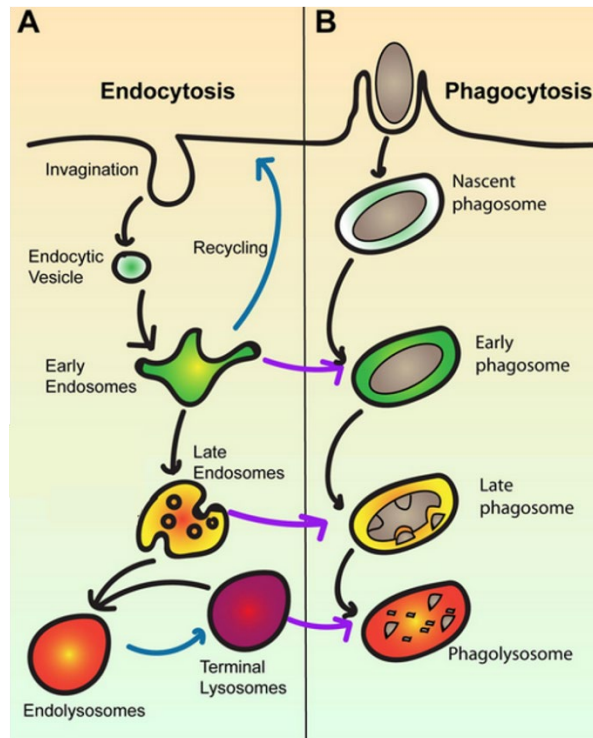


Figure 15 : Représentation schématique des mécanismes de l'endocytose et de la phagocytose.

(A) Représentation du mécanisme de l'endocytose.

L'endocytose commence par une invagination de la membrane qui forme alors une vésicule d'endocytose. Cette vésicule fusionne ensuite avec les endosomes précoces. Ces endosomes précoces envoient le contenu de la vésicule vers l'endosome pour dégradation ou vers la membrane pour y être recyclé. Les endosomes précoces vont ensuite mûrir en endosomes tardifs, puis fusionner avec les lysosomes provenant de l'appareil de Golgi pour former l'endolysosome. C'est dans cet endolysosome que les particules endocytées pourront être dégradées. Les endolysosomes pourront eux-mêmes être recyclés en lysosomes.

(B) Représentation du mécanisme de la phagocytose.

Après reconnaissance de la particule à phagocyter, la membrane s'invagine jusqu'à se refermer complètement et former un phagosome précoce. Le phagosome précoce fusionne ensuite avec des endosomes précoces et mûrit en phagosome tardif. Ce phagosome tardif fusionne alors avec des endosomes tardifs. Pour finir la fusion du phagosome tardif avec le lysosome aboutit à la formation du phagolysosome où les particules phagocytées sont dégradées.

Le mécanisme de la phagocytose est ainsi extrêmement lié à la voie endosomale et au lysosome.

(Les flèches bleues représentent les mécanismes de recyclage et les flèches violettes les mécanismes liant la voie de l'endocytose, le lysosome et la voie de la phagocytose)

Modifié de (Inpanathan and Botelho, 2019)

La présentation antigénique

Les lymphocytes T auxiliaires aussi appelés lymphocytes T CD4⁺ (LT CD4) ont un rôle clé dans l'immunité adaptative. Ils participent à l'élimination des pathogènes en activant certains mécanismes dans d'autres cellules du système immunitaire tels que les lymphocytes B ou les lymphocytes T cytotoxiques (Luckheeram et al., 2012) (**Figure 16**).

Afin de pouvoir accomplir ces actions, les LT-CD4 naïfs doivent tout d'abord être activés. Cette activation fait intervenir un autre type cellulaire, les cellules présentatrices d'antigènes ou « Antigen Presenting Cells » (APC) majoritairement constituées par les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B (Kambayashi and Laufer, 2014).

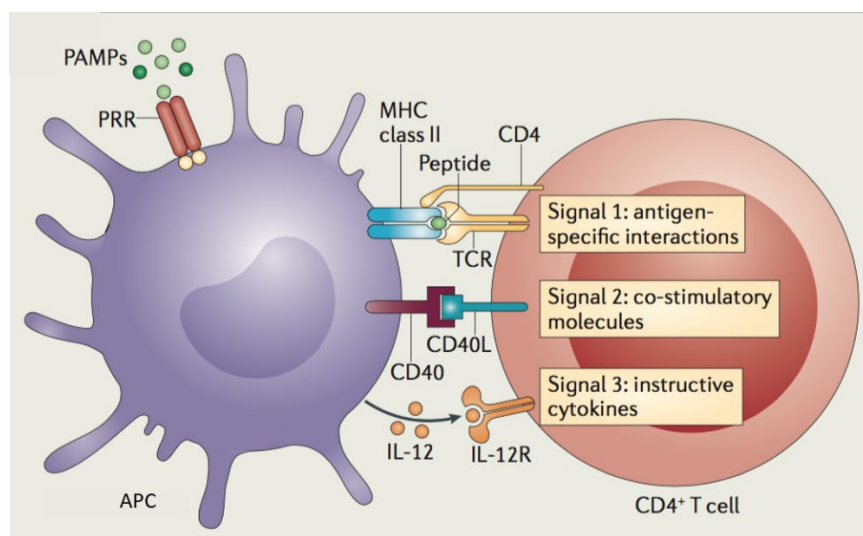


Figure 16 : Représentation schématique de l'activation des lymphocytes T CD4⁺ (LT CD4) par une cellule présentatrice d'antigènes (APC).

La cellule présentatrice d'antigènes (APC) reçoit des signaux moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) *via* des récepteurs spécialisés (PPR). Suite à cette détection elle se charge de la phagocytose ou de l'endocytose des organismes pathogènes. Elle est ensuite capable de présenter à sa surface des fragments antigéniques provenant des particules ingérées. Ces fragments antigéniques, présents à la membrane, sont couplés à des molécules de MHCII qui permettent la reconnaissance de l'antigène par le LT CD4.

Le lymphocyte T CD4⁺ est activé par l'APC *via* trois différents types de signaux :

- Le premier signal fait suite à l'interaction spécifique entre le récepteur TCR du lymphocyte et l'antigène présenté par le MHCII de l'APC. Des co-récepteurs tel que le CD4 permettent d'améliorer l'initiation de la voie de signalisation du TCR.
- Le deuxième signal est obtenu *via* l'interaction entre des molécules co-stimulatrices comme l'interaction du CD40L du lymphocyte avec le CD40 de l'APC.
- Pour finir, le troisième signal consiste en la sécrétion de cytokines instructives par l'APC.

L'ensemble de ces signaux permet l'activation du LT CD4 qui pourra alors participer à l'élimination des pathogènes notamment *via* l'activation d'autres cellules de l'immunité adaptative.

Modifié de (Kambayashi and Laufer, 2014)

Les macrophages et les cellules dendritiques possèdent à leur surface des récepteurs de reconnaissance appelés PRR pour « Pattern Recognition Receptor » dont fait partie la sous-catégorie des « Toll Like Receptor » (TLR). Ces récepteurs vont leur permettre de détecter des motifs moléculaires associés aux pathogènes appelés PAMP pour « Pathogen Associated Molecular Patterns » (Butcher et al., 2018). La détection de ces molécules pathogéniques par les APC va alors déclencher des mécanismes telles que la sécrétion de cytokines inflammatoires ou la phagocytose/endocytose de ces particules (Blum et al., 2013; Doyle et al., 2004).

Ces phénomènes de phagocytose et d'endocytose permettent d'internaliser les éléments pathogènes afin de les dégrader (voir partie sur la phagocytose). La digestion de ces particules va entraîner la formation de fragments antigéniques qui vont alors rencontrer des molécules du « Major Histocompatibility Complex II » (MHCII) et se fixer à elles. Ces complexes MHCII-Fragment antigénique vont alors pouvoir être adressés à la membrane afin d'instruire et d'activer les LT-CD4 (Rock et al., 2016).

L'activation des LT CD4 passe donc tout d'abord par la reconnaissance entre le complexe MHCII-fragment antigénique sur l'APC et le récepteur des cellules T (TCR). A ce complexe s'ajoute le co-récepteur CD4, qui améliore l'initiation de la voie de signalisation du TCR (Artyomov et al., 2010). L'activation des LT CD4 nécessite également la fixation de molécules co-stimulatrices présentes à la surface des lymphocytes tel que le ligand CD40 (CD40-L) qui se fixera au CD40 des APC. De même, le CD28 des LT CD4 se fixera au CD80 ou au CD86 des APC. Pour finir, la sécrétion de certaines cytokines inflammatoires comme l'IL-12 permettra de finaliser l'activation des LT CD4 (Luckheeram et al., 2012).

Ces rôles de phagocytose et de présentation d'antigène par les macrophages s'inscrivent dans une fonction plus large de ces cellules à savoir la mise en place et la résolution de l'inflammation.

L'inflammation

Depuis leur découverte dans les années 1900, les macrophages sont considérés comme faisant partie de la première ligne de défense de l'organisme, notamment par leur capacité à éliminer les pathogènes *via* la phagocytose ou par leur rôle dans l'immunité adaptative *via* l'activation des lymphocytes T. Toutefois leur rôle ne s'arrête pas à ces deux fonctions. Les macrophages sont également des cellules présentant une grande plasticité et sont capables d'adopter un spectre phénotypique extrêmement vaste. En réponse à des facteurs extrinsèques, les macrophages peuvent activer différents programmes transcriptionnels et remplir à la fois des fonctions pro-inflammatoires, supportant l'élimination des pathogènes, ou anti-inflammatoires permettant la réparation des tissus et le retour à l'homéostasie (Thapa and Lee, 2019).

De façon simplifiée, on trouve les macrophages naïfs M0, les macrophages M1 pro-inflammatoires et les macrophages M2 anti-inflammatoires (**Figure 17**).

Les macrophages M0 sont des macrophages naïfs, au repos, et sont obtenus *in vitro* par l'ajout de « Macrophage Colony-Stimulating Factor » (M-CSF) à des monocytes en culture (Zhao et al., 2017). Ils serviront ensuite à obtenir des macrophages M1 ou M2.

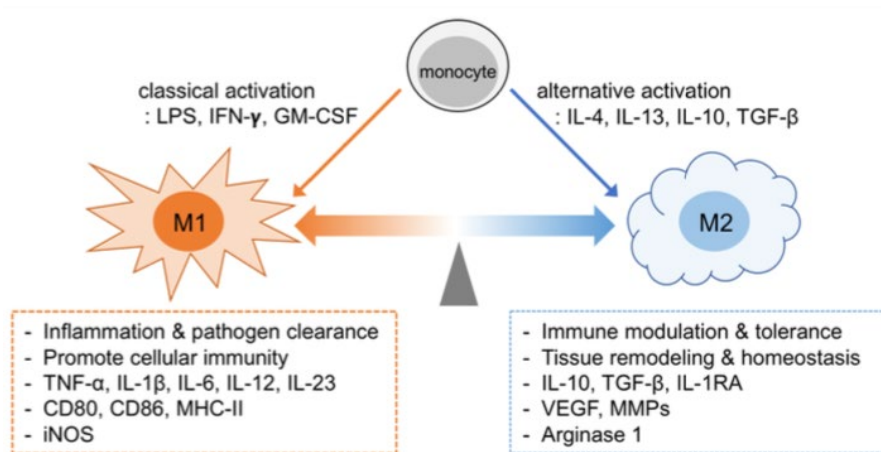


Figure 17 : Illustration des caractéristiques des macrophages classiquement activés (M1) ou alternativement activés (M2).

La stimulation des monocytes par différents signaux mène *in vitro* à une différenciation en macrophages M1 ou M2. Pour obtenir des macrophages M1, les monocytes sont stimulés par l'ajout de LPS, d'IFN- γ ou de GM-CSF. Dans le cas des M2 c'est de l'IL-4, de l'IL-13, de l'IL-10 ou du TGF- β qu'il faudra ajouter aux monocytes. Ces états M1 et M2 représentent les extrêmes phénotypiques que les macrophages peuvent adopter. *In vivo*, la multiplicité des signaux fait que les macrophages adoptent généralement des états intermédiaires à ces phénotypes M1 et M2.

Les macrophages M1 présentent un phénotype pro-inflammatoire et possèdent donc un rôle dans l'inflammation, l'élimination des pathogènes et l'immunité cellulaire. Ils expriment de nombreuses cytokines pro-inflammatoires ainsi que des récepteurs impliqués dans l'activation des LT CD4 (CD80, CD86 et MHCII).

Les macrophages M2 présentent un phénotype anti-inflammatoire et possèdent donc un rôle dans la modulation et la tolérance immunitaire, l'homéostasie et le remodelage des tissus. Ils sécrètent des molécules anti-inflammatoires, des facteurs trophiques ainsi que des protéines impliquées dans le remaniement de la matrice extra-cellulaire (MMP9).

Pour finir, ces différents états d'activation sont également caractérisés par des différences métaboliques telle que la métabolisation de l'arginine effectuée par iNOS dans les M1 et par l'arginase dans les M2.

Modifié de (Thapa and Lee, 2019)

Les macrophages M1, aussi appelés « macrophages classiquement activés », correspondent à des macrophages obtenus *in vitro* par l'ajout de LPS, d'interféron-gamma (IFN- γ) ou du facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) à des macrophages M0. Ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme le « Tumor Necrosis Factor-alpha » (TNF α) et les interleukines IL6, IL-1 β , IL12 et IL18. Ces cytokines agissent comme support de la réponse immunitaire dans la lutte contre les pathogènes (Mosser and Edwards, 2008). Les macrophages M1 peuvent également augmenter la réponse inflammatoire *via* une surproduction de ROS et la génération d'oxydes nitriques (NO). Ce sont également ceux qui expriment les différents récepteurs nécessaires à l'activation des LT CD4 (Thapa and Lee, 2019). Ces macrophages M1 sont donc considérés comme participant à la lutte contre les pathogènes, à l'immunité et à l'inflammation.

Les macrophages M2, aussi appelés « macrophages alternativement activés », sont obtenus après la stimulation de macrophages M0 par l'IL-4, l'IL-13, l'IL-10 ou le TGF β . Ils produisent des substances anti-inflammatoires comme l'IL-10, le TGF β , l'IL-1 Receptor Antagonist (IL1-RA) et des glucocorticoïdes. Ils produisent également du « Vascular Endothelial Growth Factor » (VEGF), de l'« Endothelial Growth Factor » (EGF) et du « Platelet Derived Growth Factor » (PDGF) qui contribuent aux fonctions trophiques dans les tissus endommagés. Pour finir, ils sont également capables de sécréter des molécules impliquées dans le remodelage des tissus telle que la MMP9 (Thapa and Lee, 2019). Ces macrophages sont donc considérés comme étant ceux ayant un rôle dans la modulation du système immunitaire et donc dans les mécanismes de tolérance, d'homéostasie et de remodelage des tissus.

Les macrophages M1 et M2 présentent également des différences dans leurs métabolismes, en particulier dans le métabolisme de l'arginine. Dans les macrophages M1, l'induction de la « Nitric Oxide Synthase-2 » (NOS2) aussi appelé « inducible Nitric oxide Syntase » (iNOS) entraîne la métabolisation de l'arginine pour produire de l'oxyde nitrique (NO). Dans les M2, en revanche, la sur-régulation de l'activité de l'arginase métabolise l'arginine en ornithine (Rath et al., 2014). Les macrophages M1 sont également caractérisés par une glycolyse augmentée, une production de lactate, une diminution de la voie OXPHOS et pour finir la capacité d'induire la voie du pentose phosphate. Cette voie est nécessaire pour la génération de « Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate » (NADPH), une molécule permettant aux macrophages de produire des ROS en grande quantité. A l'inverse, les macrophages M2 présentent une augmentation de la consommation d'oxygène, de la respiration mitochondriale et de l'oxydation des acides gras ainsi qu'une glycolyse diminuée (Tur et al., 2017).

Cette classification M1/M2 doit toutefois être considérée comme une simplification du spectre phénotypique des macrophages. A ce jour plusieurs sous-populations ont été décrites, notamment au sein de la population des M2 (Zhao et al., 2018; O'Rourke et al., 2019) :

- Les macrophages M2a, induits par l'IL-4 et l'IL-13, sécrètent de hauts niveaux d'IL-10 et d'IL-1RA et ont un phénotype majoritairement anti-inflammatoire.
- Les macrophages M2b, induits après une exposition aux complexes immuns ou au LPS, sécrètent de l'IL-1 β , du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-10 et présentent des réponses à la fois pro et anti-inflammatoires.
- Les macrophages M2c, induits par l'IL-10, produisent de hauts niveaux de TGF β 1 et de glucocorticoïdes et jouent un rôle majeur dans la réparation des tissus et la réduction de la réponse inflammatoire.
- Les macrophages M2d, activés par la stimulation des TLR, produisent de hauts niveaux de VEGF et d'IL-10.
- Les macrophages M2f, induits par la phagocytose de cellules apoptotiques, sécrètent de hauts niveaux de TGF β 1, de PGE2 et de « Platelet Activating Factor » (PAF).

Chez les macrophages M1, on distingue les M1a qui sont des macrophages polarisés par l'IFN- γ et les M1b qui sont des macrophages polarisés par le LPS (O'Rourke et al., 2019).

Cette diversité dans la classification des phénotypes démontre bien l'hétérogénéité de la population des macrophages. Il faut en plus considérer que ces classifications sont obtenues suite à des expériences *in vitro*. *In vivo* par contre, la multiplicité des signaux reçus par les monocytes entraîne généralement des phénotypes mixtes et extrêmement variables selon les situations.

c) Les macrophages résidents de la moelle osseuse

Les macrophages résidents de la moelle osseuse font partie des types cellulaires qui forment la niche hématopoïétique. Ces macrophages résidents semblent constituer une population mixte, que ce soit au niveau de l'expression de leurs marqueurs, de leurs fonctions ou de leur localisation.

Concernant l'expression des marqueurs de surface les caractérisant, la majorité des études s'accordent à dire qu'ils sont F4/80⁺ et CD169⁺ (Kaur et al., 2017). A ces deux marqueurs, peuvent s'ajouter selon les études le phénotype CD115^{med/low}, Gr1^{med/low}, MHCII^{int}, CD11c^{int}, CD68^{int}, DARC⁺, α -sma⁺ ou CD163⁺ (Chow et al., 2011; Ludin et al., 2012; Hur et al., 2016; Fischer-Riepe et al., 2020). Pour finir, les macrophages résidents semblent avoir des niveaux variables de CD11b et de Ly6G selon les études (Winkler et al., 2010; Chow et al., 2011; Tay et al., 2020).

Il est important de noter que la sialoadhésine CD169 est considérée comme le marqueur permettant de distinguer les macrophages résidents des autres cellules myéloïdes, en particulier des monocytes,

bien qu'il ne permette pas de distinguer les différentes populations de macrophages résidents entre eux. Le CD169, aussi connu sous le nom de « Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin 1 » ou Siglec-1, est capable de se fixer à des molécules appelées acides sialiques qui sont exprimées à la surface de toutes les cellules. Il a été montré comme jouant un rôle dans certains mécanismes tel que l'endocytose, la phagocytose mais également dans la régulation de certains mécanismes du système immunitaire (Klaas and Crocker, 2012; Saunderson et al., 2014).

La distinction entre les différents macrophages résidents de la moelle osseuse n'est possible qu'en précisant d'une part leur localisation dans la moelle osseuse et d'autre part les cellules qui leurs sont associées. Ainsi on distingue trois grands types de macrophages résidents de la moelle osseuse (**Figure 18**) :

- **Les ostéomacs**, macrophages impliqués dans l'homéostasie du tissu osseux et en étroite relation avec les ostéoblastes. Ils sont retrouvés dans la région de l'endosteum.
- **Les macrophages des îlots érythroblastiques (EIM)**, retrouvés dans toute la moelle osseuse avec la particularité de se trouver au centre de structures bien définies qui sont les îlots érythroblastiques.
- **Les macrophages résidents de la niche hématopoïétique**, considérés comme des macrophages de la moelle osseuse n'étant ni des ostéomacs, ni des EIM. Ils ont un rôle dans la régulation des CSH de façon directe mais également indirecte *via* la régulation de certaines cellules stromales de la niche hématopoïétique. Ils ont été montrés comme pouvant avoir une localisation artériolaire (Hur et al., 2016) et périvasculaire (Kaur et al., 2018).

Il est à noter qu'il n'existe aucun modèle permettant de dépléter ces différentes populations spécifiquement, car ils sont tous CD169⁺. Ainsi les rôles attribués à chacune de ses populations sont à considérer avec précaution.

Les ostéomacs

Les ostéomacs sont des macrophages résidents caractérisés par leur localisation à la surface des os, au niveau de la région endostéale. Ces macrophages sont intercalés entre les cellules présentes dans cette région tels que les ostéoblastes (Chang et al., 2008). La déplétion des macrophages grâce à des modèles génétiques de souris, comme les lignées MAFIA et CD169-DTR, ou par des modèles chimiques comme le clodronate-liposomes, entraîne également une perte des ostéoblastes. Cela a mis en évidence un rôle vital des macrophages dans le support des ostéoblastes et donc dans l'équilibre du tissu osseux (Winkler et al., 2010; Batoon et al., 2019). Les différents rôles des ostéomacs dans le maintien de l'homéostasie des ostéoblastes sont les suivants :

- Ils sont responsables de la phagocytose des ostéoblastes apoptotiques (McCauley et al., 2014).

- Ils participent à la formation et la réparation de l'os (Batoon et al., 2019) en favorisant notamment la minéralisation des ostéoblastes (Chang et al., 2008).
- Ils régulent les ostéoblastes majoritairement *via* la sécrétion de deux cytokines, le BMP2 (Champagne et al., 2002; Mandal et al., 2016) et l'Oncostatine M (Guihard et al., 2015).

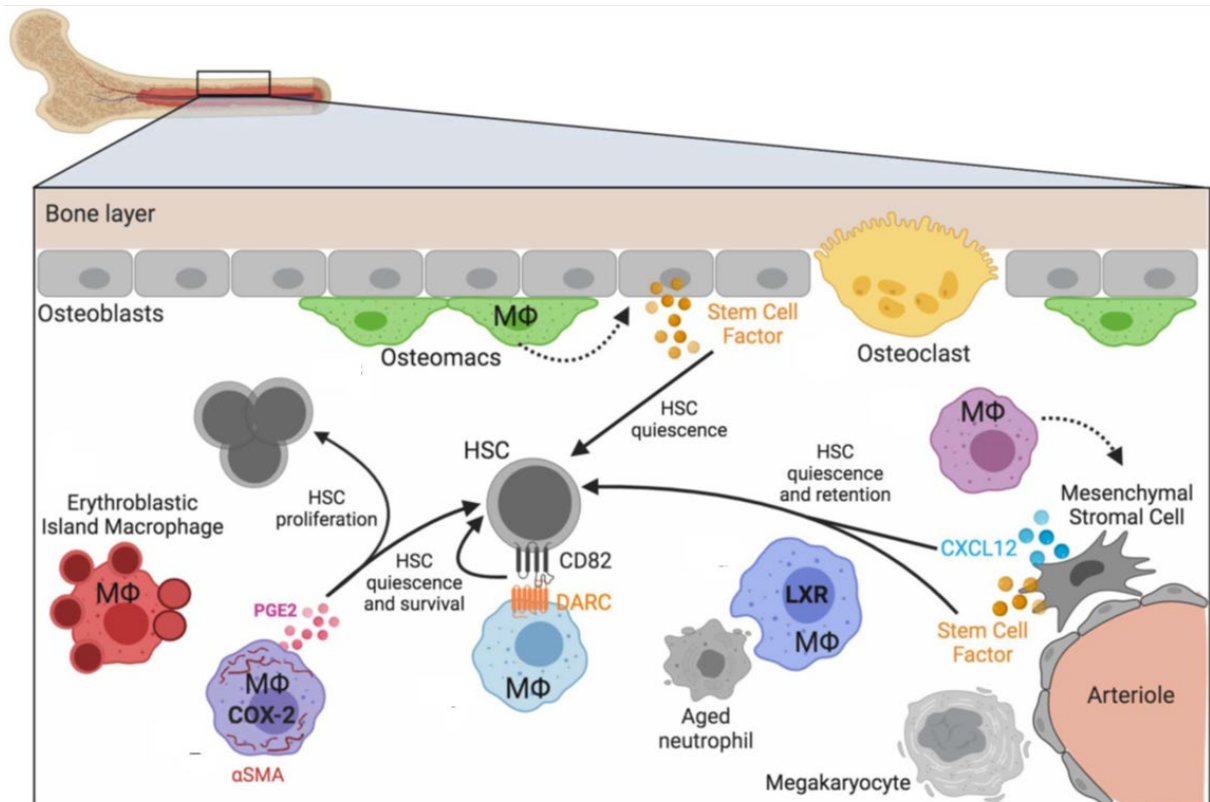


Figure 18 : Représentation schématiques des macrophages résidents de la moelle osseuse.

Les macrophages des îlots érythroblastiques (EIM) sont dispersés dans toute la moelle osseuse et sont au centre des phénomènes régulant la maturation des érythrocytes.

Les ostéomacs sont retrouvés à la surface de l'os où ils participent activement à l'homéostasie du tissu osseux en régulant notamment les ostéoblastes avec lesquels ils sont en contact étroit. Les ostéoblastes sont également régulés par un autre type de macrophages osseux, les ostéoclastes.

Les macrophages résidents de la niche régulent la quiescence, la prolifération, la rétention et la survie des HSC (i) de façon indirecte en régulant plusieurs types de cellules de la niche hématopoïétique tels que les cellules stromales et les neutrophiles, (ii) de façon directe via la production de PGE2 ou via l'interaction entre leur récepteur DARC et le récepteur CD82 des HSC.

Modifié de (Seyfried et al., 2020)

Les macrophages des îlots érythroblastiques

Les macrophages résidents de la moelle osseuse sont également connus pour leur rôle dans la régulation de l'érythropoïèse (**Figure 19**).

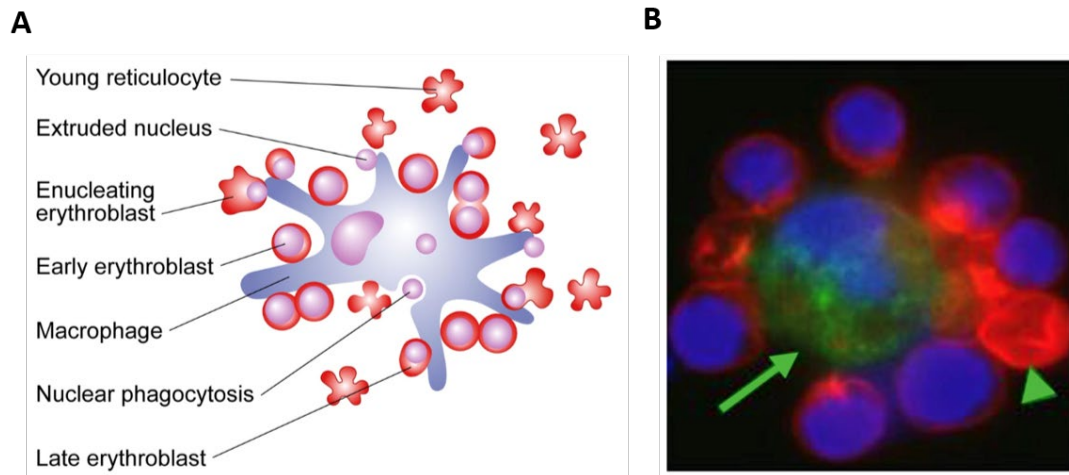


Figure 19 : Les macrophages au centre des îlots érythroblastiques.

(A) Représentation schématique d'un îlot érythroblastique.

Au centre de l'îlot, le macrophage régule la maturation des érythrocytes en phagocytant les noyaux extrudés des érythroblastes tardifs, mais également en sécrétant des cytokines trophiques et en apportant du fer aux progéniteurs érythroïdes. Associés à ce macrophage central, on trouve des érythroblastes précoces, tardifs, en cours d'énucléation et de jeunes réticulocytes qui pourront ensuite maturer en érythrocytes, c'est à dire en globules rouges matures.

(Chasis and Mohandas, 2008)

(B) Image confocale d'un îlot érythroblastique reconstitué *in vitro* grâce à une suspension de cellules uniques de moelle osseuse de souris, co-incubés en culture. Les cellules ont ensuite été marquées avec un marqueur érythroïde : TER119 (rouge), un marqueur des macrophages : M-CSF (vert) et une sonde ADN : HO33342 (Bleu). Le macrophage central est désigné par une flèche et la tête de flèche indique un réticulocyte énucléé.

(Lee et al., 2006)

Ces macrophages font partie intégrante des îlots érythroblastiques, structures formées d'un macrophage central entouré par des précurseurs érythroïdes à différents stades de développement (de Kruijf et al., 2020). Ces EIM ont un phénotype $F4/80^+$ $CD169^+$ $VCAM-1^+$ $CD11b^{neg}$ $Ly6G^{neg}$ et sont disséminés de façon inégale dans la moelle osseuse (de Back et al., 2014; Tay et al., 2020). Les macrophages et les progéniteurs érythroïdes sont en contact direct *via* plusieurs protéines comme l'« Erythroblast Macrophage Protein » (Javan et al., 2018) et respectivement le VCAM-1 et l' αV -intégrin des macrophages et le « Very Late Antigen-4 » (VLA-4) et l'« Intercellular Adhesion Molecule 4 » (ICAM-4) des érythroblastes (Lee et al., 2006; de Back et al., 2014).

La déplétion de ces macrophages par le G-CSF ou le Flt3L, ou encore dans les modèles clodronate-liposomes ou CD169-DTR, entraîne un blocage de l'érythropoïèse (Jacobsen et al., 2014, 2016; Tay et al., 2020) et une diminution du nombre d'érythroblastes dans la moelle osseuse et dans la rate (Chow et al., 2013).

Les EIM sont donc essentiels pour la survie des érythroblastes mais également pour leur maturation à laquelle ils contribuent à travers diverses fonctions décrites ci-dessous :

- La sécrétion de cytokines trophiques :

Les macrophages de la moelle peuvent sécréter de l'érythropoïétine (EPO), un des principaux facteurs de croissance régulant l'érythropoïèse (Kaur et al., 2017). Il est à noter que les macrophages eux-mêmes possèdent des récepteurs à l'EPO, suggérant des boucles de régulations complexes associées à ce facteur (Lifshitz et al., 2010).

Certains facteurs connus pour favoriser l'érythropoïèse tels que l'« Insulin-like Growth Factor-1 » (IGF-1) (Kadri et al., 2015) et le BMP4 (Vignjević et al., 2014) ont également été montrés comme pouvant être sécrétés par les macrophages (Liu et al., 2015; Tonkin et al., 2015). De façon intéressante, ces deux facteurs ont également été montrés comme ayant un rôle dans la régulation des CSH, notamment au travers de la régulation de la lignée ostéoblastique (Goldman et al., 2009; Caselli et al., 2013).

- Le transport du fer :

Les macrophages de la rate, en plus de leur rôle dans la maturation des érythroblastes, phagocytent les érythrocytes sénescents. Durant cette phagocytose, ils recyclent le fer contenu dans les molécules d'hémoglobine des érythrocytes. Ce fer va pouvoir retourner dans la moelle osseuse et être endocyté par les EIM. Il sera ensuite exocyté sous forme de ferritine afin d'être endocyté cette fois par les précurseurs érythroïdes. Ces précurseurs pourront alors utiliser le fer pour synthétiser de l'hème (de Back et al., 2014).

- La phagocytose et la dégradation des noyaux extrudés :

Le dernier stade de différenciation des érythrocytes est leur énucléation. Ce sont les macrophages qui sont responsables de la phagocytose et de la dégradation de ces noyaux appelés pyrenocytes (Toda et al., 2014).

Les macrophages résidents ont également un rôle dans l'érythropoïèse de stress puisqu'il a été montré que leur déplétion retarde la récupération érythrocytaire après des phénomènes d'anémie, de perte importante de sang ou de myéloablation (Chow et al., 2013; Ramos et al., 2013). Dans le cas de la rate, l'hématopoïèse de stress passe notamment par l'expression du « C-C motif Chemokine Ligand 2 » (CCL2) et d'autres ligands par les macrophages résidents, ceci permettant de recruter des monocytes pouvant eux-mêmes former de nouveaux îlots érythroblastiques (Liao et al., 2018).

Les macrophages résidents de la niche hématopoïétique

Les macrophages résidents de la moelle osseuse font partie de la niche hématopoïétique. Leurs rôles dans la niche passent par des interactions avec les cellules stromales Nestin⁺, les cellules CAR, les neutrophiles, mais aussi le SNS. Ils sont également des acteurs cellulaires de la réponse au G-CSF. De plus, deux études ont démontré un rôle direct des macrophages résidents dans la régulation des CSH.

Le rôle direct des macrophages

Une première étude a montré qu'une population mixte de macrophages et de monocytes exprimant l'« alpha smooth muscle actin » (α -sma) se situent à proximité des CSH dans la moelle osseuse (Ludin et al., 2012). Dans des situations de stress, ici une irradiation sublétales de 6 Gy, ces macrophages surexpriment la cyclooxygénase 2 (COX-2) qui entraîne la production de PGE2. Cette prostaglandine empêche alors l'épuisement du réservoir de CSH en limitant la formation de ROS *via* l'inhibition de la kinase Akt, en augmentant la production de CXCL12 par les cellules stromales Nestin⁺ et en augmentant l'expression de son récepteur, le CXCR4, sur les CSH. La seule injection de PGE2 dans les souris irradiées confirme qu'elle permet de réduire la prolifération, le nombre de cassure double-brin de l'ADN, l'apoptose, l'atteinte mitochondriale, le stress oxydatif et la sénescence des CSH et aussi d'augmenter l'activité de repopulation des CSH (Porter et al., 2013; Patterson et al., 2020).

Une deuxième étude a montré une interaction directe entre le « Duffy Antigen/Chemokine Receptor » (DARC) exprimé par les macrophages et le récepteur CD82 exprimé par les CSH (**Figure 20**) (Hur et al., 2016). L'interaction entre ces deux récepteurs régule la quiescence des CSH *via* la voie de signalisation TGF β -SMAD. La déplétion des macrophages avec le modèle clodronate-liposomes entraîne une diminution de la présence de CD82 à la surface des CSH. L'absence d'expression du CD82 dans des souris CD82^{-/-} entraîne une prolifération et une différenciation plus importante des CSH ainsi qu'un défaut de nichage et de prise de greffe lors d'expériences de transplantation médullaire (Saito-Reis et al., 2018). Le lien direct entre absence de macrophages et sortie de quiescence est toutefois à considérer avec précaution. En effet, le CD82 est également exprimé par les cellules stromales LEPR⁺ très impliquées dans la régulation des CSH. Cette étude souligne également le fait que les macrophages DARC⁺ expriment de hauts niveaux de α -sma et de COX-2, marqueurs décrits dans la première étude citée précédemment (Ludin et al., 2012).

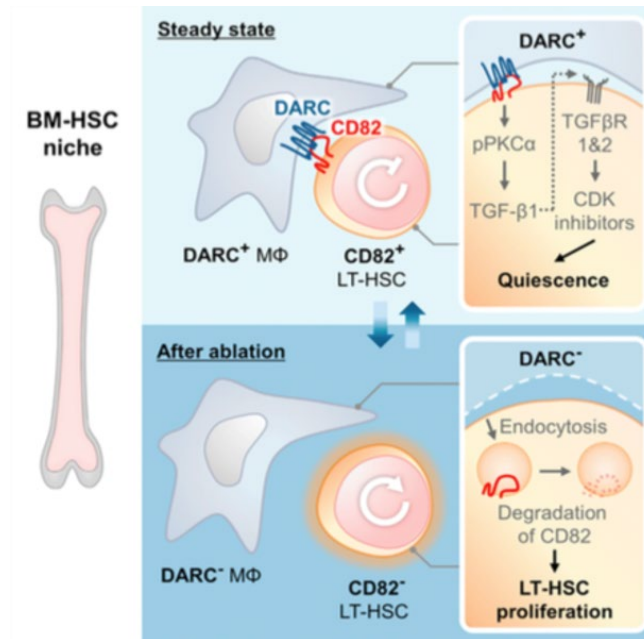


Figure 20 : L'interaction du récepteur DARC des macrophages et du récepteur CD82 des CSH permet le maintien de la quiescence des CSH.

L'interaction entre le récepteur DARC des macrophages et le CD82 à la surface des CSH permet le maintien du CD82 à la surface des cellules. La signalisation induite par le CD82 va réprimer le cycle cellulaire et ainsi maintenir la quiescence des CSH. Cela est effectué *via* l'activation de la signalisation du TGFβ1 par le PKCα, ce qui mène à l'induction d'inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines (CDK) et l'arrêt du cycle cellulaire.

Lors de la déplétion de macrophages, l'interaction DARC/CD82 est perdue menant à l'endocytose puis à la dégradation du CD82 par les CSH. Cela empêche donc l'établissement de la signalisation préalablement décrite et entraîne ainsi la prolifération des CSH.

(Hur et al., 2016)

Régulation des cellules stromales Nestin⁺

Les macrophages semblent avoir un rôle de régulation des cellules stromales Nestin⁺. En effet, la déplétion des macrophages par le clodronate-liposomes a montré une réduction significative de l'expression de gènes de rétention, tels que le CXCL12, le SCF, l'angiopoïétine et le VCAM-1, dans les cellules stromales Nestin⁺ (Chow et al., 2011). La déplétion de macrophages est accompagnée d'une diminution de certaines cytokines impliquées dans le maintien des CSH dans leur niche tels que le CXCL12 et le SCF, ce qui entraîne une mobilisation des CSH (Winkler et al., 2010). De même, la déplétion spécifique des macrophages CD169⁺ grâce au modèle transgénique de souris CD169-DTR (Miyake et al., 2007) a montré une mobilisation des CSH et des progéniteurs de la niche hématopoïétique. Ainsi, ces macrophages semblent agir sur les cellules stromales Nestin⁺ *via* la sécrétion des facteurs CXCL12 et SCF, favorisant ainsi la rétention des CSH dans la niche hématopoïétique (Chow et al., 2011).

Bien qu'il n'y ait pas de données *in vivo*, l'oncostatin M a été identifiée comme un régulateur potentiel des cellules stromales Nestin⁺ par les macrophages (Albiero et al., 2015).

La régulation de l'expression du CXCL12 dans la niche hématopoïétique par les macrophages semble également possible par une voie n'impliquant pas les cellules stromales, mais le facteur TNF α . En effet, l'activation des macrophages par la « Leukocyte Cell-derived Chemotaxin-2 » (LECT2), une cytokine sécrétée au niveau du foie, entraîne la baisse de production de TNF α par les macrophages. Cette baisse de TNF α induit le clivage du CXCL12 par la peptidase CD26 et une baisse de l'expression de CXCR4 à la surface des CSH augmentant leur mobilisation (Lu et al., 2016).

Rôle dans la greffe

Les macrophages semblent également jouer un rôle important dans les mécanismes de prise de greffe des CSH. En effet, la déplétion des macrophages CD169⁺, connus pour être radio-résistants, dans des souris conditionnées et greffées compromet la prise de greffe et altère la reconstitution hématopoïétique (Kaur et al., 2018). Dans cette étude, les macrophages impliqués seraient localisés au niveau de la région périvasculaire mais également endostéale, ce qui pourrait potentiellement démontrer un rôle des ostéomacs dans ce mécanisme.

La réponse au G-CSF

De façon intéressante, l'administration de G-CSF aux souris entraîne une diminution des macrophages localisés au niveau de l'endosteum, suivi des mêmes événements observés suite à une déplétion directe des macrophages, à savoir une diminution du nombre d'ostéoblastes et une mobilisation des CSH (Winkler et al., 2010). De même, la déplétion de ces macrophages semble augmenter la mobilisation des CSH suite à l'administration de G-CSF (Chow et al., 2011).

L'utilisation de souris dans lesquels le récepteur au G-CSF est restreint à la lignée monocytaire a confirmé que la signalisation du G-CSF dans les monocytes suffit à reproduire les observations précédentes (Christopher et al., 2011).

Il est toutefois à noter que la mobilisation des CSH induite par le G-CSF est trois fois plus importante qu'avec la seule déplétion de macrophages, suggérant l'implication d'autres mécanismes. Plus récemment, une étude a pu mettre en évidence l'implication du système nerveux sympathique dans la mobilisation des CSH par le G-CSF (Voir partie sur le SNS dans la niche hématopoïétique et (Asada et al., 2013).

Le SNS

Les macrophages ont également un rôle dans la régénération hématopoïétique médiée par le NPY, un neuropeptide libéré dans la niche hématopoïétique par le SNS. En effet, des souris dont l'expression

du récepteur à ce neuropeptide a été supprimé dans les cellules de la lignée myéloïde à savoir les monocytes, les macrophages et les granulocytes (modèle Lyz2-Cre) sont incapables de palier à un dysfonctionnement de la moelle osseuse et d'assurer la protection des CSH, normalement médiée par le NPY (Voir partie SNS de la niche hématopoïétique et (Park et al., 2015; Shi et al., 2018).

Les neutrophiles

Pour finir, les macrophages ont également un rôle dans la régulation de la niche hématopoïétique en phagocytant les neutrophiles âgés de la circulation sanguine. Cette phagocytose se fait quotidiennement et entraîne l'activation des récepteurs X à la surface de ces macrophages. Cette activation conduit à une réduction de l'activité des cellules stromales CAR de la niche hématopoïétique (surtout *via* la diminution de l'expression de CXCL12) et de leur nombre et donc une mobilisation circadienne des CSH. (Voir partie sur les neutrophiles dans la niche hématopoïétique et (Casanova-Acebes et al., 2013). Toutefois, le mécanisme précis de régulation des cellules CAR par ces macrophages n'est pas encore connu.

Il est intéressant de noter que cette régulation des CSH par ces macrophages résidents de la niche n'est pas limitée à la moelle osseuse. En effet, dans la rate il a été montré que les macrophages résidents de la pulpe rouge sont capables de retenir les CSH dans la niche splénique. Cette interaction se fait grâce à l'interaction de VCAM1 à la surface des macrophages et de VLA-4 à la surface des CSH. Le maintien des CSH dans la niche splénique permet l'établissement d'une hématopoïèse extra-médullaire, nécessaire lors de phénomènes de stress ou d'inflammation (Dutta et al., 2015). L'expression de VCAM-1 a également été montrée chez les EIM de la moelle osseuse (Kaur et al., 2018).

Toutes ces études semblent montrer un rôle des macrophages résidents dans la régulation de la quiescence des CSH, leur maintien dans leur niche et la protection face au stress oxydatif.

Toutefois, il a été montré que la déplétion de ces macrophages par le clodronate-liposomes permet d'éviter la perte du nombre et de la fonctionnalité des CSH dans un contexte infectieux. Cette étude montre que l'IFN- γ , sécrété par les LT CD4 en réponse à l'infection, augmente le nombre de macrophages, ce qui réduit le réservoir de CSH dans la moelle osseuse et impacte leur capacité à greffer (McCabe et al., 2015).

Dans cette situation inflammatoire ces macrophages semblent donc avoir un rôle négatif sur les CSH. Cette influence négative des macrophages *via* une régulation à l'IFN- γ a également été montrée sur la prolifération des CSH dans un contexte d'exposition au mercure (Li et al., 2018c).

d) Les modèles de déplétion des macrophages résidents de la moelle osseuse

Il existe trois grands modèles (1 chimique et 2 génétiques) permettant de dépléter les macrophages résidents de la moelle osseuse :

- L'injection de clodronate-liposomes (modèle chimique) (Van Rooijen, 1989) ;
- Le modèle de souris transgéniques CD169-DTR (Miyake et al., 2007) ;
- Le modèle de souris transgéniques MAFIA (Burnett et al., 2004).

Il est à noter qu'aucun de ces modèles ne permet une déplétion totalement spécifique des macrophages résidents de la moelle osseuse.

Clodronate-liposomes

Ce modèle repose sur l'utilisation d'une molécule toxique, le clodronate (ou dichlorométhylène-biphosphonate), contenu dans des structures sphéroïdes pouvant être ingérées par les cellules phagocytaires : les liposomes (**Figure 21**).

Les liposomes sont des sphères délimitées par des bicouches lipidiques. Pour les créer, on plonge les phospholipides dans une solution aqueuse, ce qui les force à se réorganiser sous forme de sphères : c'est le principe de la micelle. Le clodronate étant une molécule hydrophile, il suffit de la dissoudre dans la solution aqueuse servant à former les liposomes pour qu'elle s'y trouve encapsulée.

Le clodronate, lorsqu'il est injecté directement *in vivo*, est rapidement éliminé de la circulation et ne peut pas traverser les membranes cellulaires. Le fait de l'encapsuler dans des liposomes permet à la fois d'empêcher son élimination, mais également de cibler spécifiquement les cellules phagocytaires de l'organisme.

En effet, une fois injectés les liposomes sont reconnus comme des éléments étrangers et ingérés par les cellules phagocytaires. Une fois le phagosome formé, celui-ci va fusionner avec le lysosome pour former le phagolysosome, responsable de la destruction des particules phagocytées (voir partie sur la phagocytose). L'environnement destructif du phagolysosome va alors entraîner la destruction de la membrane des liposomes, libérant le clodronate qui se répand alors dans le cytoplasme (Wang et al., 2009). De par sa structure, il est alors identifié par erreur comme étant du triphosphate et est utilisé par les aminoacyl-tRNA synthétase pour former un analogue hydrolysable de l'Adénosine Triphosphate (ATP), l'adénosine 5' (β -dichlorométhylène) triphosphate (AppCCI2p). Cet AppCCI2p va alors traverser la membrane externe de la mitochondrie et se lier de façon irréversible à la translocase ADP/ATP. En bloquant la chaîne respiratoire, il entraîne une perte d'intégrité de la membrane interne de la mitochondrie ainsi que sa dépolarisation et le relâchement de signaux moléculaires, déclenchant alors l'apoptose de la cellule (Lehenkari et al., 2002; Moreno, 2018).

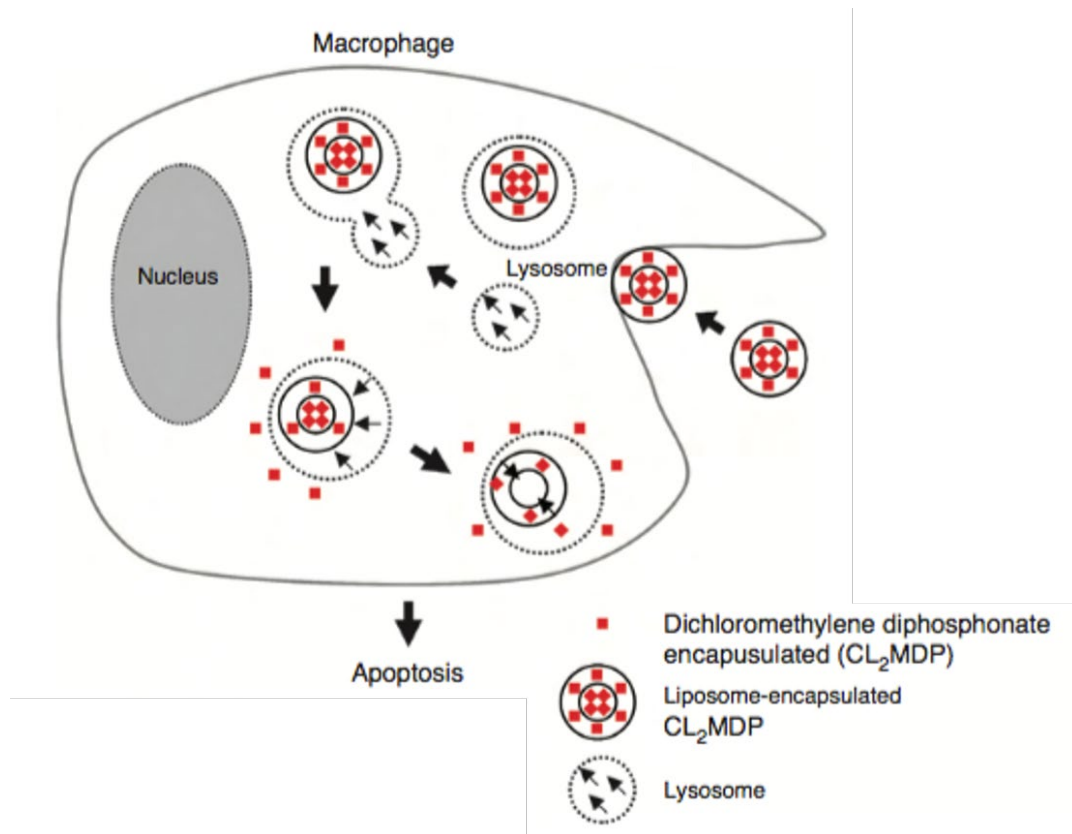


Figure 21 : Phagocytose des clodronate-liposomes par une cellule phagocytaire.

Les liposomes contenant les molécules toxiques de clodronate sont reconnus par les cellules phagocytaires qui les ingèrent par phagocytose. Le phagosome ainsi formé et contenant les particules de clodronate-liposomes fusionne ensuite avec le lysosome. Le phagolysosome va alors dégrader la membrane liposomale libérant le clodronate. Une fois libéré dans le cytoplasme, le clodronate va être métabolisé en analogue de l'ATP dans la mitochondrie, bloquant la chaîne respiratoire et conduisant à l'apoptose de la cellule phagocytaire.

Modifié de (Wang et al., 2009)

Cette méthode de déplétion a l'avantage d'être extrêmement facile d'utilisation et permet d'obtenir une déplétion efficace des macrophages. Toutefois, son manque de spécificité peut parfois rendre les données difficiles à interpréter (Grabowska et al., 2018).

En effet, bien que la route d'administration et la dose employée ait un grand rôle quant à l'efficacité de déplétion dans certains organes, on considère généralement que les injections les plus classiques, intra-péritonéale et intraveineuse, entraîne la déplétion des macrophages dans de nombreux organes tels que la moelle osseuse, la rate, les nœuds lymphatiques ou encore le foie (Wang et al., 2009).

Dans le cas de la moelle osseuse, le clodronate va dépléter les macrophages résidents mais également les monocytes, les macrophages inflammatoires (Ferenbach et al., 2012) et potentiellement les ostéoclastes (Lin and O'Connor, 2017).

Souris CD169-DTR

Les souris CD169-DTR sont un modèle de déplétion génétique *Knock-In* dans lequel l'ADNc humain codant pour le Récepteur à la Toxine Diphtérique (DTR) a été recombinaisonné avec le gène CD169 de la souris. Ainsi, l'expression de la DTR est régulée par le promoteur endogène CD169. Une injection de toxine diphtérique suffit alors à déclencher l'apoptose des cellules exprimant le DTR donc les cellules CD169⁺.

Le marqueur CD169 est principalement exprimé à la surface des macrophages de la moelle osseuse, des nœuds lymphatiques, du foie et de la rate (Chávez-Galán et al., 2015), mais peut également être retrouvé sur des macrophages d'autres organes tel que le colon (Hiemstra et al., 2014), le rein ou le poumon (Gupta et al., 2016).

Ainsi le modèle de souris CD169-DTR va permettre de déléter spécifiquement les macrophages résidents des tissus, avec une absence de spécificité par rapport à un organe donné.

Souris MAFIA

Les souris MAFIA pour « Macrophage Fas Induced Apoptosis » sont un modèle de déplétion génétique basé sur l'utilisation du gène *Fas* codant pour le FasR, une protéine-récepteur pouvant déclencher la mort cellulaire. Dans le cas des souris MAFIA, le gène *Fas* est régulé par le promoteur *c-fms* qui code pour le « Colony-Stimulating Factor 1 Receptor » (CSF1R) aussi appelé Macrophage-CSFR (M-CSFR) ou CD115. Ce modèle est inductible et l'apoptose est déclenchée par l'injection d'une drogue, l'AP20187, qui va provoquer l'expression de Fas dans les cellules exprimant le CSF1R.

Ce transgène est exprimé par les macrophages résidents de différents organes mais également par les monocytes, les macrophages inflammatoires, les ostéoclastes, les granulocytes et les cellules dendritiques (Sasmono et al., 2003; Burnett et al., 2004).

D'autres modèles de déplétion de macrophages sont parfois utilisés comme le modèle CD11b-DTR qui permet la déplétion d'une population mixte de monocytes/macrophages (Duffield et al., 2005), ou le modèle CD206-DTR qui permet la déplétion des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules endothéliales (Kambara et al., 2015).

Les CSH sont des cellules extrêmement régulées, notamment par leur microenvironnement cellulaire, ce qui leur permet de maintenir l'homéostasie du tissu hématopoïétique tout au long de la vie d'un individu. Face à certaines situations myéloablatives tel que l'exposition à des radiations ionisantes, les CSH doivent à la fois se protéger elles-mêmes des dégâts occasionnés, mais aussi participer au renouvellement du tissu hématopoïétique endommagé. Si la CSH échoue, cela peut mener à des pathologies tels que certaines hémopathies ou des cancers, voire conduire à la mort. Mieux comprendre les effets cellulaires des radiations ionisantes en général, mais aussi plus précisément sur les CSH et leur niche s'avère vital pour pallier à ces pathologies radio-induites.

II. Les radiations ionisantes

Tous les organismes vivants sont exposés quotidiennement aux radiations ionisantes présentes dans notre environnement et provenant de différentes sources telles que : les radiations cosmiques, les déchets radioactifs, la désintégration du radon, les tests et les accidents nucléaires. Les radiations ionisantes sont par ailleurs utilisées dans des applications médicales notamment les rayons X et gamma utilisés dans l'imagerie ou pour la radiothérapie. Ces applications médicales sont l'une des sources majeures de notre exposition (Desouky et al., 2015).

L'interaction des radiations avec la matière va pouvoir engendrer, soit des effets directs sur des macromolécules telles que l'ADN, les protéines ou les lipides, soit des effets indirects *via* la formation d'espèces réactives. Ces effets moléculaires entraîneront des répercussions au niveau cellulaire et plus largement au niveau de l'organisme dans son ensemble.

A. Définitions et effets biologiques

Les radiations ionisantes sont un type d'énergie produit par des atomes qui voyagent, soit sous forme d'ondes électromagnétiques en ce qui concerne les rayonnements gamma et X, soit sous forme de particules pour ce qui est des rayonnements alpha, beta et des neutrons. Ces radiations ont suffisamment d'énergie pour détacher des électrons de leurs atomes aboutissant alors à la formation d'un ion, d'où leur nom de radiations ionisantes (Zakariya and Kahn, 2014). Les paragraphes suivants se focaliseront uniquement sur les rayonnements utilisés lors de mes expériences, à savoir les rayonnements gamma.

1) Physique des radiations ionisantes

a) Les rayonnements gamma

Les rayons gamma (γ) sont produits par la désintégration intranucléaire de certains atomes sous la forme de photons, c'est-à-dire de pure énergie. Lorsqu'un rayon γ traverse un milieu, des interactions se produisent entre les photons et la matière, et l'énergie est transférée au milieu. Les photons peuvent alors subir une atténuation, être absorbés ou bien être déviés de leur trajectoire de base. Selon leur devenir, on distingue alors trois formes majeures d'interactions entre les rayonnements et la matière (Mehta et al., 2010; Desouky et al., 2015) (**Figure 22**) :

- L'effet photoélectrique : les photons disparaissent après avoir transféré toute leur énergie aux électrons. Une partie de l'énergie est alors utilisée pour éjecter les électrons de leurs orbites.
- L'effet Compton : les photons interagissent avec les électrons et leur cèdent une part de leur énergie. Les photons sont alors déviés et repartent dans une direction différente, avec une énergie réduite. Dans certains cas, l'énergie cédée par les photons sera suffisante pour éjecter l'électron de son orbite.
- La création de paires : le photon interagit avec le nucleus et son énergie est convertie en matière, ce qui produit une paire de particules, à savoir un électron et un positron. Cette réaction ne se produit qu'avec des photons de très haute énergie.

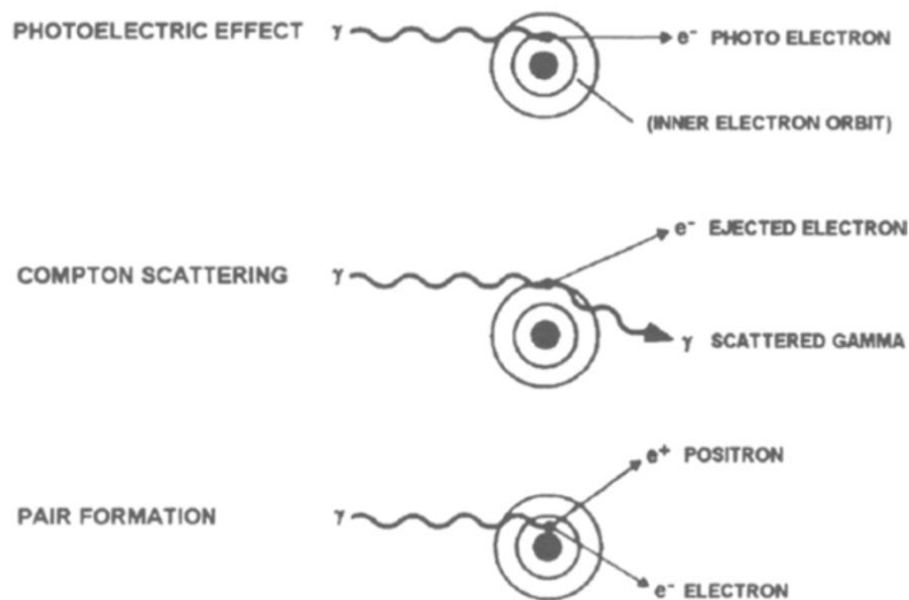


Figure 22 : Les trois formes majeures d'interactions entre les rayonnements gamma et la matière.

L'effet photoélectrique : le photon disparaît et son énergie est utilisée pour éjecter l'électron de son orbite.

L'effet Compton : le photon est dévié de sa trajectoire et une partie de son énergie peut être utilisée pour éjecter un électron.

La production de paires : le photon interagit avec le nucleus et l'énergie déposée produit une paire de particules, à savoir un électron et un positron.

(Choppin et al., 2002)

b) Les unités de mesure

Il existe plusieurs types d'unités de mesure afin d'étudier les effets biologiques d'une irradiation. Elles permettent ainsi de mesurer la dose, la dose équivalente et le débit de dose (Menzel, 2018) délivrés lors d'une irradiation.

La dose, aussi appelée dose absorbée, correspond à la quantité d'énergie exprimée en joule (J) transmise à la matière par une particule ionisante, par unité de matière irradiée exprimée en kilos (Kg). L'unité du système international (SI) correspondant à cette mesure en $J.Kg^{-1}$ est le Gray (Gy).

Toutefois, les effets des radiations ionisantes ne dépendent pas uniquement de la dose absorbée mais également du type de radiation ionisante considéré. Afin d'adresser cette différence, la notion de dose équivalente a été développée. Elle est définie comme le produit de la dose absorbée et d'un facteur empirique nommé WR. Ce facteur est propre à chaque type d'irradiation et a été caractérisé par des expériences radiobiologiques à doses équivalentes d'irradiation. La dose équivalente est exprimée en Sievert (Sv). Dans le cas des radiations gamma, $WR = 1$ et donc $1 Gy = 1 Sv$.

Le débit de dose est défini comme la dose de radiation délivrée par unité de temps. Il est généralement exprimé en $Gy.min^{-1}$ et permet de calculer la dose totale reçue par le tissu lors d'une irradiation.

Il est important de noter que l'effet des radiations ionisantes sur les tissus dépend de la dose totale reçue mais aussi du débit de dose. En effet, il a été montré qu'une forte dose reçue pendant un temps court induit plus de dommages que la même dose délivrée sur une longue période de temps (Bolus, 2017).

2) Effets moléculaires

L'ionisation des atomes formant la matière organique par les photons va entraîner des effets directs ou indirects sur les différentes molécules constituant les cellules (**Figure 23**).

L'interaction directe se produit lorsqu'une macromolécule de la cellule (ADN, protéine ou lipide) est directement touchée par un rayonnement ionisant, ce qui entraîne la déstabilisation de la structure moléculaire. Cela peut entraîner des dommages cellulaires et des mutations de l'ADN pouvant conduire à la mort cellulaire. Si elles ne meurent pas, les cellules endommagées pourront, à long-terme, favoriser une carcinogenèse ou d'autres dérégulations physiologiques (Desouky et al., 2015; Bolus, 2017).

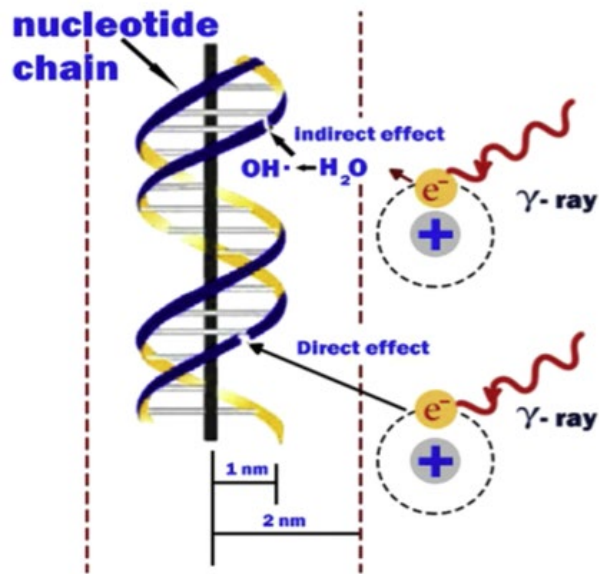


Figure 23 : Effets directs et indirects des radiations ionisantes.

Les radiations ionisantes peuvent entraîner des effets directs en ciblant directement les molécules constituant l'ADN, ou d'autres macromolécules cellulaires tels que les protéines ou les lipides.

Les effets indirects des radiations ionisantes découlent principalement de la radiolyse de l'eau. Les espèces réactives produites lors de ce processus vont alors réagir avec les molécules de la cellule et les endommager.

(Desouky et al., 2015)

Les interactions indirectes se produisent lorsque l'énergie de l'irradiation déposée dans la cellule interagit avec une molécule d'eau et provoque sa décomposition. C'est la radiolyse de l'eau (**Figure 24**). L'hydrolyse de la molécule d'eau aboutit à la formation de plusieurs espèces chimiques telles que des ions, des radicaux libres ou des molécules. Parmi les ions formés, on retrouve en majorité l'anion hydroxyde OH^- et l'ion hydronium H_3O^+ , mais aussi d'autres espèces plus négligeables comme le radical hydroperoxyl HO_2^\bullet rencontré dans certains cas précis (ici dans le cas de radiation de faible énergie). Parmi les radicaux libres on trouvera notamment des électrons hydratés, des H^\bullet et des radicaux hydroxyles OH^\bullet . La recombinaison de ces différentes espèces instables va donner naissance à des molécules inoffensives pour la cellule comme l'hydrogène (H_2), ou à d'autres plus délétères comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En effet, cette dernière molécule, très instable dans les cellules, va réagir avec d'autres molécules organiques, comme par exemple des oxydes nitriques, pour former des peroxy-nitrites, molécules extrêmement toxiques pour les cellules (Le Caër, 2011). La plupart des espèces réactives de l'oxygène (ROS) tel que le OH^\bullet ont une demi-vie très courte et entraînent des dommages localement. En revanche, les peroxy-nitrites sont assez stables et ont une durée de vie plus longue (Desouky et al., 2015).

Le nombre de radicaux libres produits par une irradiation ionisante dépend de la dose totale. Il a été montré que la majorité des dommages induits par les radiations est due aux interactions indirectes du fait que les cellules sont constituées à 70% d'eau (Desouky et al., 2015).

Les effets directs et indirects peuvent au final aboutir au développement d'altérations biologiques et physiologiques qui peuvent se manifester dans les secondes, les jours ou les années suivant l'exposition (Desouky et al., 2015).

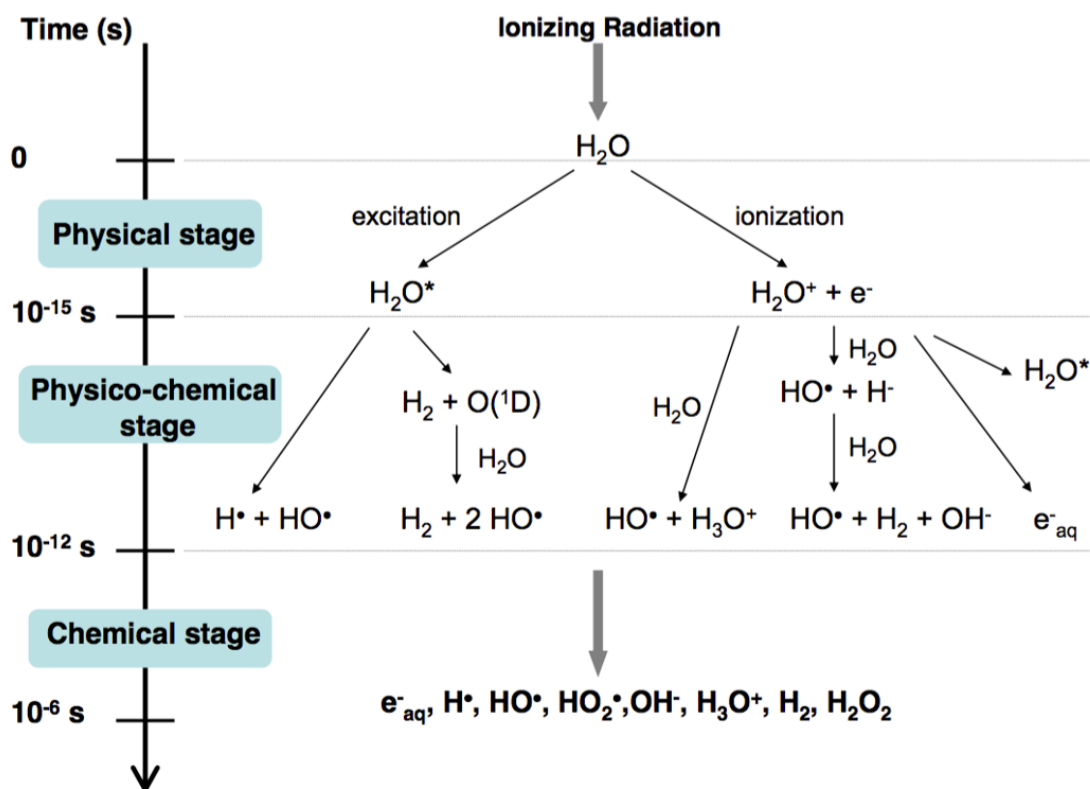


Figure 24 : Principales réactions physiques et chimiques se produisant lors de la radiolyse de l'eau.

Les événements radiolytiques se produisent en trois étapes.

La première étape est le stade physique, qui se situe dans la femtoseconde (10^{-15} seconde) suivant la rencontre entre la matière et la radiation ionisante. Cette étape aboutit à la formation de molécules d'eau excitées (H_2O^*) ou de molécules d'eau ionisées et d'électrons sub-excités ($H_2O^+ + e^-$).

La deuxième étape est le stade physico-chimique (entre 10^{-15} et 10^{-12} seconde après la rencontre). De nombreux processus et réactions prennent place durant cette étape et donnent naissance aux ions, molécules et radicaux libres retrouvés dans l'étape suivante.

La troisième et dernière étape est le stade chimique (entre 10^{-12} et 10^{-6} seconde après la rencontre). Les nombreuses espèces formées lors du stade précédents diffusent et réagissent entre elles ou bien avec d'autres molécules de leur environnement.

(Le Caër, 2011)

3) Effets cellulaires

L'altération des molécules peut avoir des conséquences délétères pour la cellule, comme des mutations de son ADN, une évolution carcinogénique, ou encore la mort. Ces différents effets sont étroitement liés à la dose de radiation à laquelle les cellules sont exposées. Ainsi, plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer la relation entre la dose et la réponse cellulaire (**Figure 25**).

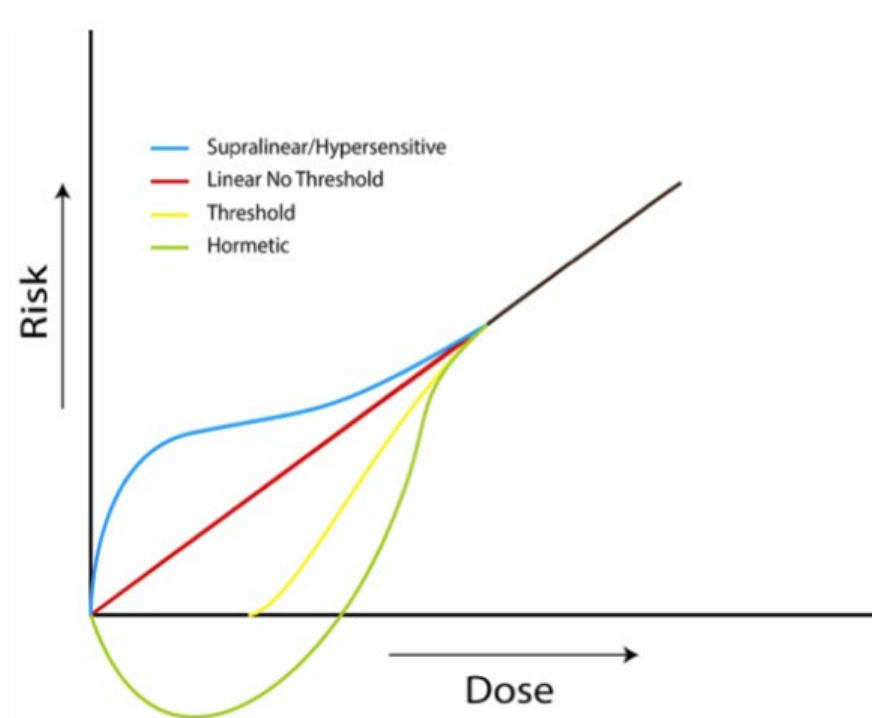


Figure 25 : Diagramme schématisant différents modèles dose-réponse des radiations ionisantes.

Le modèle « Linear No Threshold » (LNT), en rouge, extrapole les effets observés à de fortes doses d'irradiation aux faibles doses d'irradiation. Dans ce modèle toute irradiation entraîne un effet biologique.

Le modèle « Threshold », en jaune, considère qu'il existe un seuil de dose en dessous duquel aucune conséquence biologique ne sera observée.

Le modèle supralinéaire ou hyper-radiosensible, en bleu, prend en compte l'effet Bystander et l'hyper-radiosensibilité qui entraînent tous deux plus de dommages cellulaires que ce qui devrait être observé avec le modèle LNT.

Le modèle hormétique, en vert, se base sur les études ayant démontré les effets bénéfiques des faibles doses d'irradiation.

(Robertson et al., 2013)

a) Les modèles « dose-réponse »

De nombreux modèles théoriques d'effet dose-réponse ont été décrits afin d'expliquer les conséquences de l'exposition aux radiations sur les organismes. On considère généralement que les risques augmentent avec la dose. Toutefois, cela n'a pas été réellement observé pour les faibles doses d'irradiation, c'est à dire pour une dose inférieure ou égale à 0,1 Gy. Ainsi les différents modèles de dose-réponse proposent une extrapolation des effets connus des fortes doses d'irradiation, aux effets des faibles doses d'irradiation. Les deux modèles les plus répandus sont le modèle linéaire sans seuil ou « Linear No Threshold » (LNT) et le modèle à seuil ou « Threshold » (Bolus, 2017).

Le modèle LNT établit que la probabilité d'observer des effets néfastes à de faibles doses d'irradiation est estimée en extrapolant les données obtenues à de fortes doses d'irradiation (Desouky et al., 2015). Bien que cela reste une possibilité, on n'observe généralement aucun effet clinique sous le seuil des 0,5 Gy. Les plus fortes doses sont en revanche connues pour être carcinogènes du fait de leur effet mutagène sur les cellules. Toutefois, il reste difficile de dire qu'un cancer n'est dû qu'à l'exposition aux radiations, le cancer étant généralement causé par une combinaison de facteurs (Bolus, 2017). Ce modèle a été très largement utilisé pour établir les règles nationales et les standards de la radioprotection au vu de son respect du principe de précaution. Un des points faibles de ce modèle est qu'il ne prend pas en compte les mécanismes de défenses biologiques qui peuvent en partie compenser les effets d'une irradiation (Desouky et al., 2015).

Le modèle « Threshold » établit un seuil sous lequel aucun effet de l'irradiation n'est observé. Au niveau du seuil, des effets commencent à être observés et augmentent linéairement à mesure que la dose augmente. En 1996, la « Health Physics Society » a publié un communiqué sur les faibles doses d'irradiation, estimant que sous la dose de 0,05 Sv/an, les risques pour la santé sont, soit trop faibles pour être observés, soit inexistantes. Ainsi, bien que les règles de la radioprotection soient basées sur l'hypothèse que n'importe quelle dose d'irradiation peut avoir des effets biologiques, un seuil minimal a été officiellement établi en dessous duquel aucun effet clinique n'a encore été observé.

b) La théorie de la cible

L'effet des radiations a été expliqué en utilisant la théorie de la cible. Selon cette théorie, les effets délétères de l'irradiation sont attribués aux dommages au niveau d'une cible cellulaire, généralement l'ADN, *via* une absorption directe de l'énergie des radiations. Cette vue classique des effets de

l'irradiation a toutefois été remise en cause notamment dans le cadre de l'étude des conséquences de faibles doses d'irradiation sur les cellules.

En effet certaines réponses cellulaires sont particulièrement marquées suite à une exposition à de faibles doses d'irradiation, telles que :

- **La réponse radio-adaptative** (Guéguen et al., 2019), phénomène protégeant la cellule mais aussi l'organisme contre les dommages dus à l'irradiation. Cette protection s'effectue au travers de trois mécanismes : (1) la protection contre les agents toxiques, notamment les ROS, grâce à des molécules anti-oxydantes (comme le glutathion) ou des enzymes de détoxification (comme la catalase ou la SOD) ; (2) la réparation de l'ADN et (3) l'élimination de certains types cellulaires, soit par apoptose ou nécrose, soit par différenciation prématurée ou encore par réponse immunitaire (Feinendegen et al., 2004).
- **Le phénomène de l'hormesis**, dans lequel une exposition à de faibles doses d'irradiation serait bénéfique pour la cellule ou l'organisme. Parmi les effets bénéfiques recensés, on peut citer une diminution de la prévalence des cancers ou encore une augmentation de la réponse immunitaire (Tang and Loke, 2015).
- **L'effet bystander**, qui se définit comme la survenue d'effets biologiques dans des cellules non irradiées, résultant de l'exposition à l'irradiation d'autres cellules. Bien que cet effet bystander soit très dépendant du type cellulaire, on distingue deux voies majeures de transmission : soit le contact direct de cellule à cellule *via* des jonctions Gap, soit la sécrétion dans le milieu de facteurs solubles tels que le TGF β ou l'interleukine-8 (Havaki et al., 2015). Les ROS produits directement par les cellules irradiées ou indirectement *via* des processus inflammatoires peuvent également être transférés dans les cellules voisines par diffusion passive, *via* des jonctions Gap, ou encore par transport actif (Desouky et al., 2015).
- **Une hyper-radiosensibilité**, qui se définit par une sensibilité exacerbée des cellules à de faibles doses d'irradiations, alors qu'elles restent plus résistantes à de fortes doses (Joiner et al., 2001).
- **Une instabilité génomique**, considérée comme l'un des moteurs de la carcinogenèse radio-induite (Smith et al., 2003).

Ces différentes observations ont soulevé la possibilité d'autres modèles « dose-réponse », qui viennent s'ajouter aux modèles LNT et « Threshold » précédemment décrits (**Figure 25**).

La propagation d'effets néfastes depuis les cellules irradiées vers les cellules non irradiées, c'est à dire l'effet bystander, ainsi que l'hyper-radiosensibilité cellulaire, entraînent plus d'effets délétères que l'irradiation directe de certaines cellules. On parle alors de modèle de réponse supra-linéaire (Desouky et al., 2015).

A l'opposé, le phénomène de l'hormesis suggérerait un effet bénéfique des faibles doses d'irradiation dessinant un modèle plutôt infra-linéaire ou modèle hormétique.

Ces observations spécifiques aux faibles doses d'irradiation remettent donc en question le modèle LNT.

Il est à noter qu'il n'existe pas de dommages cellulaires spécifiquement associés à l'irradiation. Après l'irradiation, il existe une période de latence avant d'observer une réponse physiologique dans les cellules. Cette période peut aller de quelques minutes à quelques heures pour les moyennes et fortes doses d'irradiation et jusqu'à des années pour de faibles doses d'irradiation (Bolus, 2017).

4) Effets cliniques

Les effets cliniques observés après irradiation sont étroitement liés à la dose reçue. Ainsi, les effets observés à de faibles doses d'irradiation seront la plupart du temps considérés comme stochastiques, c'est-à-dire aléatoires, alors que les effets observés à de forte doses sont définis comme déterministiques, c'est à dire prédictibles. Le fait d'être exposé de façon aiguë ou chronique va également déterminer les effets cliniques associés.

a) Effets stochastiques versus déterministiques

Les effets stochastiques ou aléatoires regroupent à la fois la survenue de cancers, due à des mutations somatiques et les effets héréditaires, dus à des mutations de la lignée germinale. Toutefois, il est extrêmement difficile de dire qu'un cancer est dû à une exposition en particulier, car la plupart des cancers mettent généralement plusieurs années avant de se développer. Les doses chroniques de faibles doses d'irradiation, telles que celles reçues lors d'un diagnostic par imagerie, sont considérées comme étant stochastiques (Hamada and Fujimichi, 2014; Bolus, 2017).

Les radiations ionisantes à forte dose entraînent en revanche certains effets spécifiques. Ces effets déterministiques sont basés sur la mort cellulaire et sont caractérisés par une dose seuil au-dessus de laquelle la sévérité des dommages augmente avec la dose. Ces effets prédictibles dépendent de la dose, du débit de dose, du type de radiation, de l'âge ou encore de la capacité immunitaire de l'individu (Desouky et al., 2015; Bolus, 2017).

b) Effets aigus versus chroniques

On considère généralement que les effets aigus dus à la radioactivité naturelle ou à des doses utilisées dans les méthodes diagnostiques sont non stochastiques et inoffensifs. En revanche, au-dessus d'une dose de 0,5 Gy, les effets aigus deviennent prévisibles et suivent un chemin linéaire (Bolus, 2017).

Les effets aigus les plus représentatifs sont généralement considérés comme étant dépendants de la dose totale reçue. Les trois effets cliniques les plus observés sont le syndrome hématologique (pour des doses allant de 1 à 10 Gy), le syndrome gastro-intestinal (pour des doses allant de 2 à 50 Gy) et l'atteinte du système nerveux central (pour des doses supérieures à 50 Gy). Les effets aigus peuvent également engendrer des effets tardifs comme la fibrose qui découle d'une inflammation aigüe et rapide des tissus suite à une irradiation. Un des organes les plus représentatifs de la fibrose radio-induite est le poumon (Bolus, 2017).

Les effets chroniques des radiations ionisantes sont principalement stochastiques avec, comme préoccupation centrale, l'apparition de cancers radio-induits. La leucémie a notamment été associée à une exposition chronique aux radiations. En effet, pour des doses situées entre 1 et 5 Gy, il existe une corrélation linéaire entre la dose délivrée et la survenue d'une leucémie. De plus fortes doses d'irradiation ont également été associées à des cancers de la thyroïde, de l'os ou encore du poumon. Cependant des effets non tumorigènes peuvent être observés, comme par exemple l'apparition d'une cataracte au niveau de l'œil (Bolus, 2017).

B. Réponse cellulaire aux radiations ionisantes

Que ce soit dû aux effets directs ou indirects *via* la formation de ROS, les cellules exposées aux radiations vont subir plusieurs types de dommages, notamment au niveau de l'ADN.

Afin de limiter ces dégâts les cellules possèdent plusieurs mécanismes de défense. Dans un premier temps, des enzymes ou voies de signalisations dédiées à la détoxification vont tenter de diminuer la quantité de ROS afin de limiter les effets délétères sur les cellules. De plus, les voies de réparation de l'ADN vont être activées. Toutefois, si les cellules se trouvent dans l'incapacité de réparer les dommages, les mécanismes de mort cellulaire comme l'apoptose ou la sénescence vont permettre d'éliminer ces cellules.

1) La réponse anti-oxydante

Suite à l'irradiation, les dommages directs engendrés aux cellules et les ROS produits par la radiolyse de l'eau activent plusieurs voies de signalisation pro-inflammatoires. Dans les cellules irradiées, l'activation de ces voies entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires ainsi que de facteurs de croissance qui stimulent les enzymes produisant des ROS et des NO telles que les NADPH oxydases, iNOS et COX-2. Les ROS et les NO produits par ces enzymes amplifient les dommages à l'ADN et la mort cellulaire (Najafi et al., 2018). De plus, l'irradiation augmente la production d'anions superoxydes par la chaîne de transfert des électrons de la mitochondrie, ce qui amplifie le stress oxydatif intracellulaire et *in fine* les dommages cellulaires (Zorov et al., 2006).

La majorité des ROS radio-induits sont issus des mitochondries dont le métabolisme est affecté par l'irradiation. Suite à une irradiation, l'augmentation du niveau de ROS dans la mitochondrie résulte (i) d'un dysfonctionnement du complexe II de la chaîne mitochondriale (Dayal et al., 2009), (ii) d'une augmentation de l'activité de la chaîne de transport des électrons (Yamamori et al., 2012) et (iii) d'une augmentation de la fission mitochondriale (Kobashigawa et al., 2011). Ce dysfonctionnement mitochondrial et l'augmentation du stress oxydant qui en résulte peut alors entraîner une instabilité génétique à l'origine de mutations (Dayal et al., 2009), voire la mort des cellules par apoptose (Ogura et al., 2009).

a) Antioxydants cellulaires

Afin de limiter la présence de ROS, les cellules possèdent un grand panel de défense antioxydante. Cela inclut des enzymes détoxifiantes telles que les superoxydes dismutases (SOD), la catalase, la glutathion peroxydase et les peroxyrédoxines, mais également des molécules antioxydantes tels que les vitamines C et E, le glutathion (GSH), l'acide lipoïque, les caroténoïdes et les chélateurs de fer (Halliwell, 2011).

Une fois formés par la mitochondrie en réponse à l'irradiation, les ions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) vont être rapidement pris en charge par une classe d'enzymes, les superoxydes dismutases (SOD). Trois types de SOD sont retrouvés dans la cellule : CuZnSOD (SOD1), MnSOD (SOD2) et EcSOD (SOD3) (Holley et al., 2014). Ces enzymes ont été montrées comme conférant une protection face aux radiations ionisantes puisqu'une surexpression de EcSOD permet de limiter l'atteinte pulmonaire aigüe radio-induite (Rabbani et al., 2005) et que la surexpression de MnSOD permet de protéger les cellules hématopoïétiques des effets des radiations ionisantes (Southgate et al., 2006). Les SOD exercent leur rôle protecteur en induisant la dismutation des ions superoxydes en molécules d' O_2 et d' H_2O_2 (**Figure 26**). H_2O_2 est ensuite pris en charge par la catalase ou la glutathion peroxydase permettant de donner

des molécules d' H_2O et d' O_2 *via* la catalase, ou seulement de l' H_2O *via* la glutathion peroxydase (West and Marnett, 2006). Toutefois, si certaines molécules d' H_2O_2 ne sont pas détoxifiées assez rapidement, elles peuvent alors former des radicaux hydroxyles OH^\bullet *via* la réaction de Fenton (Kehrer and Klotz, 2015). De même, les ions superoxydes, s'ils ne sont pas détoxifiés, peuvent réagir avec un autre type d'espèces réactives, les NO^\bullet et former des peroxy-nitrites (ONOO^\bullet) (Pacher et al., 2007). Les peroxy-nitrites et les radicaux hydroxyles sont des espèces très réactives qui une fois formées vont entraîner de nombreux dommages aux protéines, aux lipides et à l'ADN des cellules. Ces dommages, s'ils sont trop nombreux, peuvent alors déclencher l'apoptose des cellules.

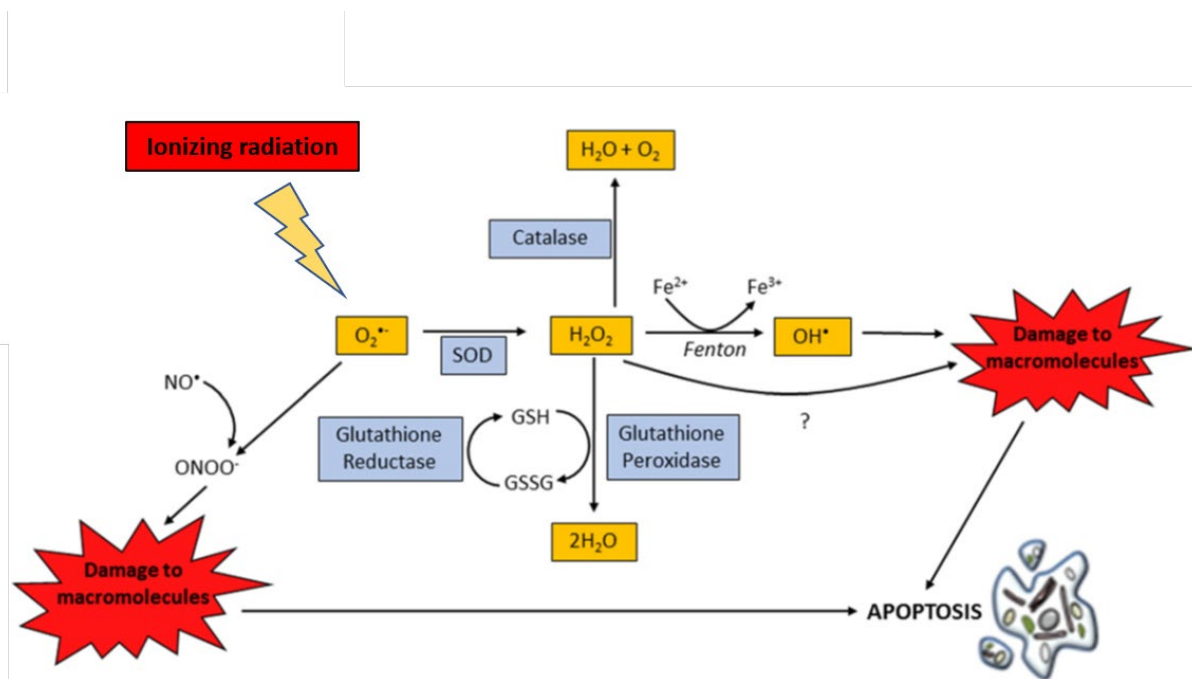


Figure 26 : Représentation schématique de la chaîne de détoxification des ROS.

Les ions superoxydes produits en réponse à l'irradiation réagissent avec les NO^\bullet pour former des peroxy-nitrites ONOO^\bullet ou sont détoxifiés par la SOD pour former de l' H_2O_2 . L' H_2O_2 est soit détoxifié en molécules d' H_2O et d' O_2 par la catalase et le glutathion peroxydase, soit transformé en ion OH^\bullet via la réaction de Fenton. Les peroxy-nitrites et les OH^\bullet entraînent des dommages aux macromolécules de la cellule ce qui peut entraîner l'apoptose si les dégâts sont trop importants.

Modifié de (Redza-Dutordoir and Averill-Bates, 2016)

b) Voies de détoxification

L'expression de nombreux facteurs anti-oxydants ou impliqués dans la survie cellulaire sont régulés par différentes voies cellulaires activées suite à une irradiation. On citera de façon non exhaustive la voie Nrf2/Keap1 (McDonald et al., 2010), la voie du « Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells » ou NF κ B (Ahmed and Li, 2008), ou encore la voie PI3K/Akt (Suman et al., 2012).

Parmi celles-ci, la voie Nrf2/Keap1 a été montrée comme étant très impliquée dans la réponse cellulaire à l'irradiation (**Figure 27**).

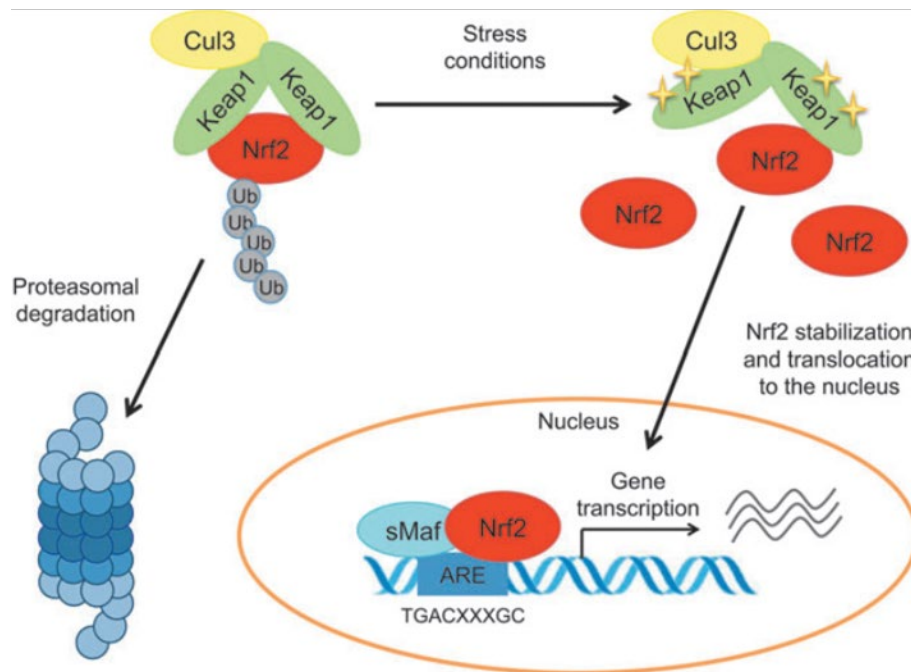


Figure 27 : La régulation du facteur de transcription Nrf2.

A l'équilibre, la protéine Nrf2 est liée à Keap1 et est continuellement ubiquitinylée par Cul3, ce qui induit sa dégradation par le protéasome. Des phénomènes de stress telle que l'irradiation induisent une déstabilisation du complexe Nrf2-Keap1. Nrf2 se transloque alors dans le noyau où elle se lie à des petites protéines Maf et se fixe aux éléments de réponses antioxydante (AREs) de l'ADN, ce qui induit la transcription de ses gènes cibles. (Tonelli et al., 2018)

Nrf2 est un facteur de transcription qui coordonne l'activation d'un grand nombre de gènes cytoprotecteurs, codant pour des composants impliqués dans la détoxification des ROS tels que la catalase, des composants du système antioxydant du glutathion et de la thiorédoxine, des enzymes impliquées dans la régénération du NADPH (Tonelli et al., 2018), etc...

En montrant son activation après irradiation, de nombreuses études ont mis en évidence un rôle de Nrf2 dans la réponse de la majorité des cellules aux rayonnements ionisants (McDonald et al., 2010). De plus, des cellules déficientes pour Nrf2 présentent une radiosensibilité (McDonald et al., 2010), alors que les cellules le surexprimant sont radio-résistantes (Kim et al., 2014).

Nrf2 est extrêmement régulé (i) transcriptionnellement *via* de nombreuses autres voies de signalisation tel que PI3K/Akt ou NFκB, (ii) post-transcriptionnellement *via* des phénomènes de splicing ou des microARN et (iii) au niveau de la stabilité de la protéine, majoritairement *via* sa liaison avec la

protéine Keap1 (Tonelli et al., 2018). De façon homéostatique, la protéine Nrf2 est liée à la protéine Keap1, qui va servir d'une part à séquestrer Nrf2 dans le cytoplasme et d'autre part à lier Nrf2 à l'ubiquitine ligase E3-Cullin 3 (Cul3). Cul3 va continuellement ubiquitinyler Nrf2 permettant sa dégradation par le protéasome (Kobayashi et al., 2004). Le stress oxydatif va entraîner la modification de certains résidus cystéines de Keap1 entraînant une modification de sa conformation, permettant ainsi de libérer Nrf2, qui va alors se transloquer dans le noyau des cellules (Dinkova-Kostova et al., 2017) où il s'hétéro-dimérise avec des petites protéines Maf. Cet hétérodimère se fixe ensuite aux éléments de réponse antioxydante (AREs) permettant l'expression des gènes cibles de Nrf2, comme par exemple *Nqo1* (Hirotsu et al., 2012) et *HMOX1* (Reichard et al., 2007). En plus du stress oxydatif, certaines protéines telles que p21^{Cip1/Waf1} ou p62, augmentées lors d'une irradiation, peuvent se lier de façon compétitive à Keap1 et empêcher sa fixation à Nrf2 (Tonelli et al., 2018) favorisant ainsi son entrée dans le noyau.

Il est à noter que Nrf2, en plus d'induire l'expression de protéines anti-inflammatoires, fonctionne également comme un suppresseur de l'expression de certains gènes pro-inflammatoires (Suzuki and Yamamoto, 2017).

2) La réponse aux dommages à l'ADN

L'irradiation induit plusieurs types de dommages à l'ADN telles que des modifications de bases nucléiques, des cassures simple brin (SSB : Single Strand Breaks) ou des cassures double brins (DSB : Double Strand Break). Parmi ces dommages, les DSB sont les plus dommageables pour les cellules car elles peuvent induire des cassures ou des translocations chromosomiques pouvant mener, si elles ne sont pas ou mal réparées, à des cancers (Shao et al., 2014a).

Les DSB peuvent déclencher la réponse de dommages à l'ADN (DDR) qui permet d'assurer une détection et une réparation rapide des cassures ou de déclencher la voie de l'apoptose afin d'éliminer les cellules trop endommagées (Shao et al., 2014a).

a) Réparation des DSB : NHEJ et HR

Les principaux mécanismes de réparation de l'ADN sont la jonction d'extrémités non homologues (Non Homologous End Joining ou NHEJ) et la recombinaison homologue (HR). Elles sont toutes deux les voies de réparation principales pour les DSB induits par les radiations ionisantes (Shibata and Jeggo, 2020) (**Figure 28**).

Il est démontré que 70 à 80% des DSB sont rapidement réparés par la NHEJ, que les cellules soient en phase G1 ou G2. Les DSB restantes sont ensuite réparées par la HR dans les cellules en phase S et G2 (Shibata and Jeggo, 2020).

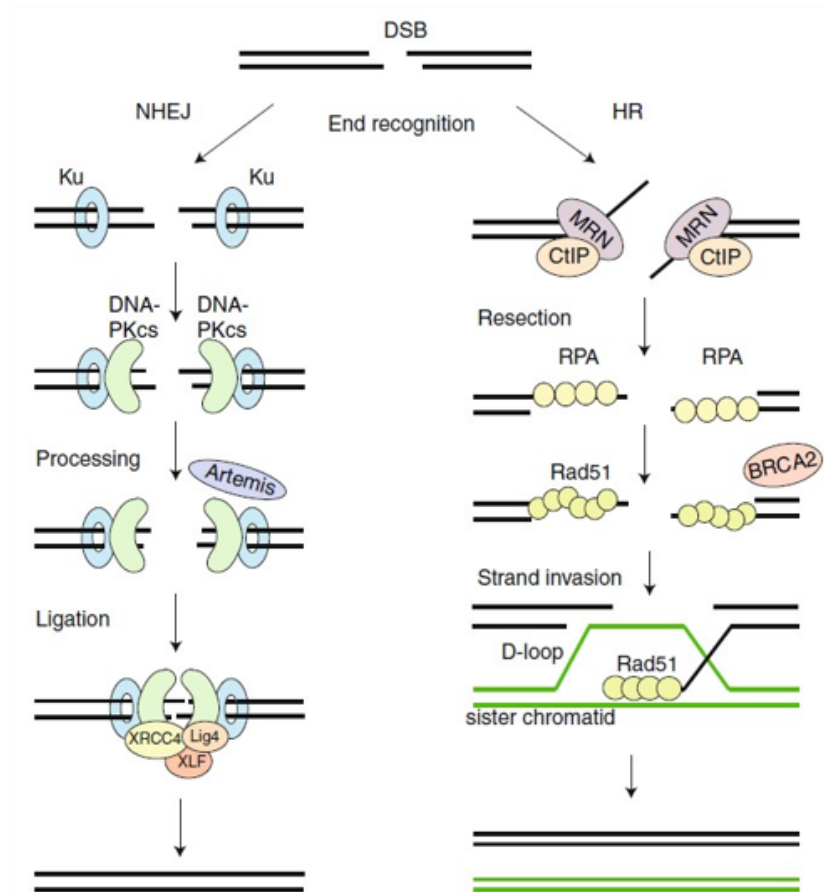


Figure 28 : Les voies du NHEJ et de la HR.

La NHEJ commence par la reconnaissance des extrémités de l'ADN par les protéines Ku qui recrutent ensuite les complexes DNA-PKcs. Certaines protéines telle que la nucléase peuvent ensuite être recrutées pour préparer l'ADN à l'étape de ligation effectuée par le complexe de ligation XRCC4-ADN ligase IV-XLF.

La HR commence par la reconnaissance des extrémités de l'ADN par le complexe MRN-CtIP qui va effectuer une résection des brins et donc induire la formation de portions d'ADN simple brins. Ceux-ci vont être recouverts et stabilisés par les protéines RPA qui seront ensuite remplacées par des protéines Rad51 grâce à l'action de BRCA2. Rad51 permet la reconnaissance de la séquence homologue, l'invasion de brins et au final à la réparation de l'ADN via l'intervention d'autres protéines. (Brandsma and Gent, 2012)

Le mécanisme du NHEJ classique (c-NHEJ) commence par la fixation de l'hétérodimère Ku, composé de Ku70 et Ku80 aux extrémités de la DSB auxquelles vient ensuite se fixer la sous-unité catalytique de la protéine kinase dépendante de l'ADN (PKc). L'ensemble de ces éléments constitue alors le complexe de la protéine Kinase dépendante de l'ADN (DNA-PKc) qui va permettre de stabiliser les extrémités de l'ADN, mais aussi de recruter et de phosphoryler d'autres protéines impliquées dans la réparation telle que Artemis, une nucléase qui permet la maturation des extrémités de l'ADN. Enfin, le recrutement du complexe de ligation composé de l'ADN ligase IV, de la protéine XRCC4 et du facteur XRCC4-like (XLF) va permettre de résoudre la DSB (Chang et al., 2017). Le c-NHEJ peut entraîner des erreurs dans le cas où les extrémités de l'ADN subissent des délétions ou des additions de nucléotides pour permettre la ligation, ce qui peut entraîner des pertes de l'information génétique. De plus, des erreurs à l'étape de la ligation peuvent entraîner des translocations, des réarrangements ou la formation de chromosomes dicentriques ou acentriques (Lieber, 2010) favorisant la survenue de pathologies.

Contrairement au c-NHEJ, le mécanisme de HR nécessite un modèle intact de la séquence d'ADN à réparer afin de fonctionner et se sert donc de la chromatide sœur. Cette voie de réparation débute par la résection des extrémités endommagées de l'ADN par le complexe MRN constitué des protéines MRE11, RAD50 et NSB1, ainsi que par la protéine CtIP et d'autres exonucléases. Cela aboutit à la formation de portions d'ADN simple brins, qui vont être recouverts par des protéines de réplication A (RPA) qui stabilisent et empêchent la formation de structures secondaires de l'ADN. La « Breast Cancer type 2 Susceptibility protein » (BRCA2) va ensuite remplacer RPA par Rad51, afin de déclencher la recherche de séquences homologues sur la chromatide sœur. Après l'invasion de brin, de nombreuses enzymes se chargent de polymériser puis de résoudre les jonctions. Comparé au c-NHEJ, la HR est considérée comme faisant extrêmement peu d'erreurs de réparation (Brandsma and Gent, 2012).

Plusieurs mécanismes vont permettre à la cellule de choisir entre la voie du NHEJ et de la HR pour réparer ses DSB. Les suppresseurs de tumeurs « p53 Binding Protein 1 » (53BP1) et BRCA1 sont deux facteurs enrichis aux sites DSB et sont des régulateurs critiques du NHEJ et du HR respectivement. BRCA1 antagonise 53BP1 pendant les phases S et G2, bloquant la NHEJ et facilitant la HR. L'expression et la régulation de CtIP sont dépendants du cycle cellulaire, avec une expression diminuée, ainsi qu'une dégradation protéasomale pendant la phase G1 et une expression augmentée pendant la phase G2 (Chapman et al., 2012).

La voie du NHEJ alternatif (a-NHEJ) ou la réparation par hybridation simple brin (Single Strand Annealing : SSA) sont des méthodes additionnelles de réparation de l'ADN qui vont intervenir quand le c-NHEJ ou la HR n'ont pas suffi à résoudre la DSB (Chang et al., 2017).

b) Rôle d'ATM et de p53 dans la DDR

ATM est un régulateur central de la DDR et est recruté par le complexe MRN et d'autres facteurs localisés au niveau des cassures de l'ADN (Paull, 2015). Une fois recruté, ATM va activer de nombreux effecteurs de la DDR, notamment p53 qui est le plus important (**Figure 29**).

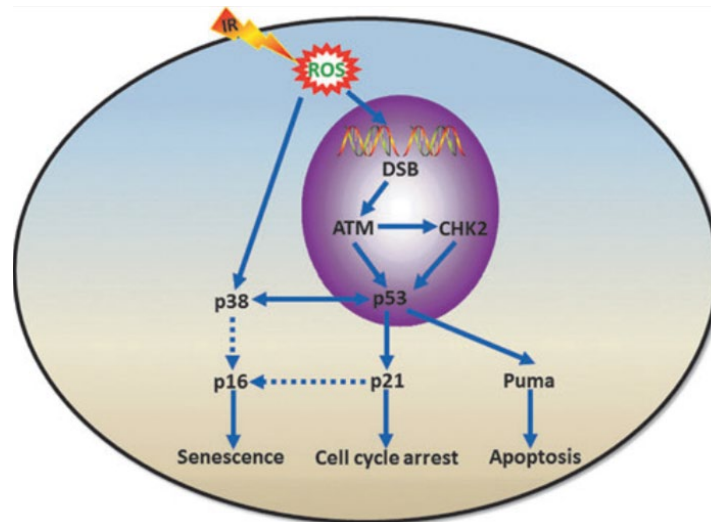


Figure 29 : ATM et p53, des effecteurs centraux de la DDR.

Suite à la survenue de cassures doubles brins (DSB) radio-induites, la protéine ATM est recrutée et active des effecteurs de la réponse aux dommages à l'ADN (DDR) tels que p53 et CHK2. p53 peut alors induire l'arrêt du cycle cellulaire *via* p21, l'apoptose *via* l'expression de protéines pro-apoptotiques telle que Puma ou la sénescence *via* certains facteurs tels que p38 et p16. Les ROS radio-induits peuvent également déclencher la sénescence au travers de l'activation de p38 de façon p53-indépendante.

(Shao et al., 2014a)

P53 est une protéine centrale de la DDR. Dans des conditions normales, p53 est exprimée de façon constitutive et est liée à la ligase « Mouse Double Minute 2 homolog » (MDM2) qui provoque sa dégradation protéasomale. Suite à son activation en réponse à des dommages à l'ADN, ATM va phosphoryler p53, la libérer de sa liaison à MDM2 et permettre sa translocation dans le noyau (Mirzayans et al., 2012). Le degré de dommage à l'ADN et le nombre de modifications que subit p53 (phosphorylations, acétylations, méthylation ...) vont déterminer son degré et sa durée d'activation. En fonction de ces paramètres, p53 va favoriser soit la survie cellulaire en entraînant un blocage du cycle cellulaire pour permettre la réparation, soit la mort cellulaire en déclenchant l'apoptose (Maier et al., 2016). Généralement, les dommages à l'ADN réparables disparaissent dans les 24h suivant les lésions, mais dans certains cas des dommages sévères ou irréparables peuvent persister, menant à l'arrêt irrémédiable du cycle cellulaire et donc à la sénescence (Rodier et al., 2011).

ATM est également responsable de la phosphorylation des variants de l'histone H2A, appelé H2AX. Cette phosphorylation entraîne encore plus de modifications d'histones et le recrutement de plusieurs protéines de la réponse aux dommages de l'ADN. La visualisation de ces foyers de H2AX phosphorylé, appelé γ H2AX, est une méthode extrêmement utilisée pour dénombrer les cassures à l'ADN dans des cellules suite à l'irradiation (Shibata and Jeggo, 2020).

3) Mort cellulaire radio-induite

La sénescence, l'apoptose et la nécrose sont différents types de mort cellulaire engendrés par l'irradiation (Najafi et al., 2018).

a) La sénescence

La sénescence est un mécanisme caractérisé par l'arrêt de la division cellulaire, soit à cause du raccourcissement des télomères dans des cellules vieillissantes, soit du fait de l'endommagement des cellules par des facteurs de stress variés.

Il est établi depuis longtemps que l'irradiation de nombreuses variétés cellulaires entraîne un délai mitotique et que l'arrêt de la progression du cycle cellulaire est observé dans tous les types cellulaires, que ce soit après des faibles ou des fortes doses d'irradiation (Maity et al., 1994). Cet arrêt du cycle cellulaire a pour vocation première de permettre à la cellule d'effectuer les réparations suite aux dommages à l'ADN. Toutefois, si ces dégâts sont trop importants, la cellule arrêtera son cycle cellulaire définitivement et entrera alors dans l'état de sénescence.

D'un point de vue mécanistique, le déclenchement de la DDR entraîne l'activation de la voie de signalisation des dommages ATM/ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad-3 related protein) qui va mener à un arrêt des cellules en phase G1 ou G2 (**Figure 30**). Plus précisément, ATM et ATR vont activer CHK1/2, des kinases « checkpoint » qui vont permettre la séquestration des phosphatases cdc25 empêchant d'activer les complexes Cycline B1-CDK1 et Cycline E-CDK2, responsables de la progression dans le cycle cellulaire. ATM va également activer la voie p53/p21 qui entraîne l'inhibition des complexes Cycline B1-CDK1 et Cycline D-CDK4-6 et va aussi dégrader la cycline B1 ainsi que d'autres régulateurs mitotiques. P21^{Cip1/Waf1} va quant à lui activer pRb qui va inhiber l'expression des gènes qui contrôlent la progression G2/M. Cette activation de pRb est également effectuée par p16^{Ink4a}, un inhibiteur des cyclines kinases dépendantes CDK4 et CDK6 (Krenning et al., 2014; Maier et al., 2016).

Certaines cellules arrêtées en G2 pourront aller jusqu'à effectuer un contournement de la mitose et donc subir un arrêt du cycle cellulaire permanent dans un état tétraploïde en G1 (Gire and Dulić, 2015).

Les cellules, irrémédiablement bloquées dans leur progression du cycle cellulaire, sont considérées comme des cellules sénescentes. Elles présentent alors plusieurs caractéristiques à savoir (i) une augmentation persistante de certaines protéines inhibitrices des cyclines kinases dépendantes telles que p16^{Ink4a}, p19 ou p21^{Cip1/Waf1}, (ii) une expression du biomarqueur « Senescence-associated beta-galactosidase » (SA-β-gal) due à une activité lysosomale augmentée et enfin (iii) une activation de certaines voies déclenchées par le stress oxydatif comme la voie p38 MAPK (Iwasa et al., 2003; Capparelli et al., 2012; Johmura et al., 2014).

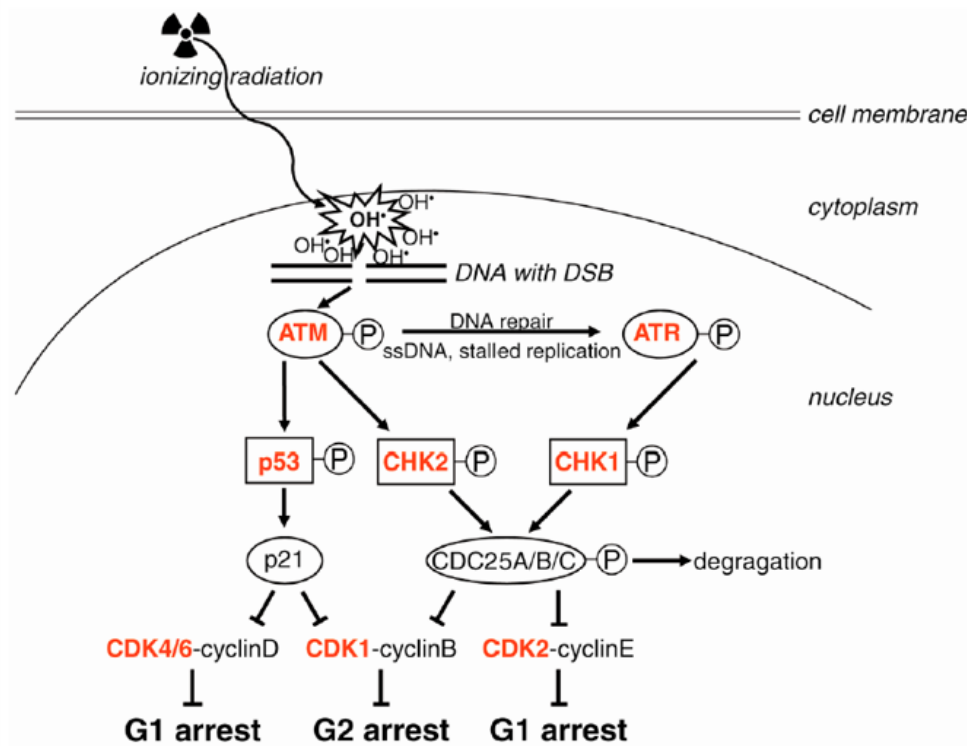


Figure 30 : Mécanisme de l'arrêt du cycle cellulaire suite à l'irradiation.

Suite à son recrutement aux DSB, ATM active de nombreux effecteurs tels que p53, CHK2 ou ATR. ATR va activer CHK1, qui en combinant son action avec CHK2 va entraîner la dégradation des phosphatases cdc25. L'absence des cdc25 et l'activation de la voie p53/p21 par ATM vont inhiber les complexes Cycline D-CDK4/6, Cycline B-CDK1 et Cycline E-CDK2 entrainant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou G2.

(Maier et al., 2016)

Les cellules sénescents vont elles-mêmes pouvoir déclencher la sénescence dans les cellules adjacentes *via* l'expression et la production de facteurs sécrétés associés à la sénescence (SASP).

Le recrutement d'ATM aux DSB active la voie NFkB, ce qui induit l'expression de gènes pro-inflammatoires tels que les IL-1 α / β , IL-6 et IL-8 qui appartiennent tous aux facteurs SASP (Habraken and Piette, 2006; Ferrand et al., 2015). Par leurs actions autocrine et paracrine, les facteurs SASP peuvent induire à la fois l'inflammation ou la fibrose, attirer les cellules immunitaires tels que les macrophages ou encore altérer le microenvironnement tissulaire et ainsi mener à la sénescence (Li et al., 2018b).

b) L'apoptose

L'apoptose est le mécanisme principal conduisant à la mort cellulaire à court terme après l'irradiation (**Figure 31**).

L'apoptose peut être intrinsèque ou extrinsèque. Les radiations induisent principalement la voie intrinsèque de l'apoptose qui se traduit par la libération du cytochrome-c mitochondrial dans le cytoplasme entraînant la formation de l'apoptosome. Cependant, en fonction du type cellulaire et de la dose reçue, la cellule peut également déclencher la voie extrinsèque de l'apoptose dans laquelle l'activation est médiée par les récepteurs de mort (Maier et al., 2016).

La voie intrinsèque de l'apoptose ou « apoptose mitochondriale » est dépendante de l'activation et de la régulation des membres de la famille des protéines « B-cell lymphoma 2 » (Bcl2). Ces protéines régulent la perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie et peuvent être anti ou pro-apoptotiques (Cory and Adams, 2002). L'accumulation nucléaire de p53 suite à l'irradiation active l'expression de gènes pro-apoptotiques de la famille Bcl2 codant pour les « protéines à BH3-seulement », telles que « p53 upregulated modulator of apoptosis » (Puma) et Noxa (Oda et al., 2000; Kuribayashi et al., 2011). Ces protéines pro-apoptotiques vont pouvoir se fixer et inhiber les protéines anti-apoptotiques telle que la « B-Cell Lymphoma-extra Large » (BCL-XL), Bcl2 ou la « Myeloid leukemia cell differentiation protein » (Mcl-1), libérant alors les effecteurs de mort cellulaire : la protéine « Bcl-2-Associated X » (BAX) et la protéine « Bcl-2 homologous Antagonist Killer » (BAK) (Aubrey et al., 2018). BAX et BAK vont alors déclencher la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie en créant des pores, entraînant le relargage du cytochrome-c dans le cytoplasme (Dejean et al., 2006). De plus, les radiations ionisantes vont augmenter la production de superoxydes par la mitochondrie, déclenchant également le relargage de cytochrome-c (Ogura et al., 2009). Une fois dans le cytosol, le cytochrome-c va se fixer à l'« Apoptotic Peptidase Activating Factor 1 » (APAF1) et à la caspase 9,

formant alors le complexe de l'apoptosome (Cain et al., 2000). La caspase 9 est l'initiatrice de la cascade des caspases et va activer les caspases effectrices 3 et 7, qui elles-mêmes déclencheront la cascade des caspases 2, 6, 8 et 10 et donc l'apoptose (Cain et al., 1999).

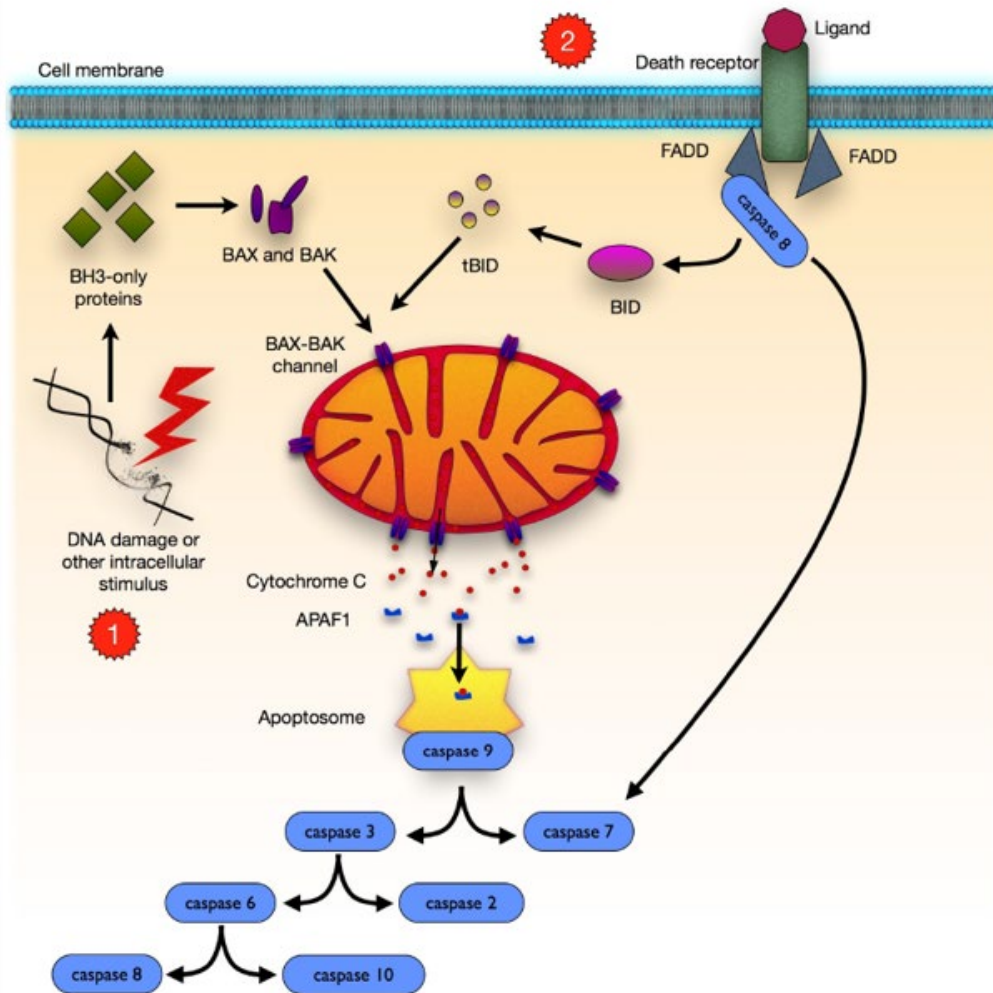


Figure 31 : Voies de signalisation extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose.

1- Voie de signalisation intrinsèque : les dommages à l'ADN ou d'autres facteurs de stress intracellulaires activent les protéines à BH3-seulement qui elles-mêmes activent les protéines BAX et BAK. Ces protéines forment des pores dans la membrane mitochondriale externe entraînant la libération de facteurs pro-apoptotiques, notamment le cytochrome-c. Dans le cytosol, le cytochrome-c, APAF-1 et la caspase 9 forment alors le complexe de l'apoptosome qui va cliver et activer les différentes caspases effectrices 3, 7, 6, 2, 8 et 10 et déclencher l'apoptose.

2- Voie de signalisation extrinsèque : la fixation de leurs ligands aux récepteurs de mort entraîne le recrutement de molécules adaptatrices tels que le FADD et la caspase 8. La caspase 8 peut directement activer les caspases 3 et 7, déclenchant la même cascade de caspases que dans la voie de signalisation intrinsèque. La caspase 8 peut aussi activer la protéine Bid qui favorise l'assemblage des canaux BAX et Bak et donc la perméabilisation de la membrane mitochondriale.

(Glowacki et al., 2013)

La voie extrinsèque de l'apoptose démarre par l'activation des récepteurs de mort appartenant à la famille des récepteurs aux TNF. L'activation de p53 par l'irradiation sur-régule l'expression des récepteurs Fas et TRAIL (Tumor necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand) appartenant à cette famille de récepteurs. La fixation du ligand Fas sur son récepteur entraîne la « clusterisation » de son domaine de mort intracellulaire qui recrute ensuite la protéine « Fas-Associated protein with Death Domain » (FADD). FADD va alors interagir avec la caspase 8, formant le complexe de signalisation inducteur de mort (DISC) qui, en activant les caspases 3 et 7, déclenche la même cascade de caspases observée dans l'apoptose intrinsèque. La caspase 8 peut également activer la protéine BID, qui appartient également à la famille des protéines à BH3-seulement. La protéine BID activée (tBID) participe à la perméabilisation de la membrane mitochondriale en favorisant l'assemblage des pores BAX/BAK, faisant ainsi le lien entre les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose (Harms et al., 2004).

c) La nécrose

Enfin, la nécrose est un mécanisme généralement observé après une exposition à de fortes doses d'irradiation. Contrairement à l'apoptose qui est un mécanisme extrêmement organisé, la nécrose est une forme accidentelle et incontrôlée de mort cellulaire, généralement dû à des stress physico-chimiques excessifs. Elle se traduit par une rupture des membranes cellulaires entraînant la libération du contenu cellulaire dans le milieu externe et la destruction de la cellule (Lauber et al., 2012).

III. Réponse des populations hématopoïétiques aux radiations ionisantes

Le système hématopoïétique est considéré comme l'un des plus radiosensibles de l'organisme.

Chez la souris, il existe un syndrome hématopoïétique observé après irradiation à des doses supérieures à 1 Gy. La gravité de ce syndrome est dose-dépendante. Il se caractérise par une déplétion des cellules de la moelle osseuse et une diminution drastique des cellules du sang. Des lésions résiduelles de la moelle osseuse peuvent également s'observer à plus long-terme et sont dues à une diminution du réservoir de CSH et à l'altération de leur capacité d'auto-renouvellement. Même si ces dommages à long-terme n'affectent généralement pas le taux de cellules sanguines, ils peuvent mener, en cas de stress hématopoïétiques supplémentaires, à des pathologies telles que l'anémie hypoplasique ou le syndrome myélodysplasique (Shao et al., 2014a).

Mieux comprendre la réponse des CSH, mais aussi la réponse de leur microenvironnement à l'irradiation présente donc un intérêt clinique majeur qui devrait permettre, à terme, de limiter les effets des lésions radio-induites du tissu hématopoïétique.

A. Réponse des cellules souches hématopoïétiques

L'irradiation induit des dommages aux CSH *via* plusieurs mécanismes tels que l'augmentation du stress oxydatif, l'induction de dommages à l'ADN et la mort cellulaire par apoptose ou sénescence. L'induction de l'apoptose dans les cellules immatures de la moelle est considérée comme étant à l'origine des lésions aiguës de la moelle osseuse après l'irradiation. En revanche, la déplétion des cellules de la moelle osseuse à long-terme après irradiation serait plutôt une conséquence de la sénescence des CSH. Quant au stress oxydatif, il a probablement des répercussions à la fois à court et long-termes après l'irradiation.

1) Stress oxydatif radio-induit

Un des effets centraux et majeurs des radiations ionisantes est la formation de ROS. Ainsi, de trop hauts niveaux de ces espèces réactives sont connus pour endommager l'ADN, augmenter la prolifération cellulaire, déclencher l'apoptose et donc mener à l'épuisement des CSH (Hu and Wang, 2019).

L'exposition corps entier de souris à une dose de 6,5 Gy a montré une augmentation persistante des ROS dans les CSH, observée jusqu'à 8 semaines après l'irradiation. L'induction de ce stress oxydatif chronique dans les CSH est associée à une augmentation soutenue des dommages oxydatifs à l'ADN, en particulier les DSB, d'une inhibition de leur capacité clonogénique ainsi que d'une induction de leur sénescence. Le traitement des souris au NAC, un « scavenger » des ROS, après une irradiation corporelle totale (TBI : Total Body Irradiation) permet d'atténuer de façon significative l'altération de la capacité clonogénique des CSH, ainsi que de leur potentiel de greffe (Wang et al., 2010).

De la même façon, l'utilisation d'un autre anti-oxydant, le resvératrol, dans des souris irradiées en TBI à 6 Gy permet de diminuer la sénescence radio-induite des CSH et d'améliorer leurs fonctions clonogéniques et leur potentiel de greffe (Zhang et al., 2013).

La hausse des ROS dans les CSH après TBI est notamment attribuée à l'augmentation de l'expression de la NADPH oxydase NOX4 après l'irradiation. Son inhibition, par le Diphenyleneonium (DPI), permet de diminuer la production de ROS, de limiter les dommages oxydatifs à l'ADN, notamment les DSB, mais également de rétablir partiellement les capacités clonogéniques des CSH (Wang et al., 2010). Ce traitement favorise aussi la diminution du nombre de cellules présentant des aberrations chromosomiques dans la progéniture des CSH irradiées (Pazhanisamy et al., 2011). Toutefois, ces conclusions sont à considérer avec précaution, puisque le DPI est un inhibiteur de toutes les enzymes de la famille NOX et pas uniquement de NOX4.

L'importance de la voie Nrf2/Keap1 dans la détoxification des ROS radio-induits a également été mise en évidence dans les CSH. Une TBI de 4 Gy sur des souris greffées avec de la moelle provenant de souris Nrf2^{+/+} ou Nrf2^{-/-} a montré que les CSH Nrf2^{-/-} présentent un défaut de reconstitution du tissu hématopoïétique (Merchant et al., 2011). De plus, l'activation de Nrf2, par un traitement pharmacologique, le 2-trifluorométhyl-2'-méthoxychalone (TMC), ou *via* la délétion de *Keap1*, dans des souris irradiées en TBI à des doses situées entre 6,9 et 7,3 Gy, a permis de mettre en évidence le rôle de Nrf2 dans la régulation des capacités de repopulation des CSH, par activation de la voie de signalisation Notch *via* l'expression des gènes *Notch1* et *Jag1* (Kim et al., 2014).

De façon intéressante, la voie ATM/Bid, considérée comme étant impliquée dans l'apoptose, a été caractérisée en tant que régulatrice du stress oxydatif dans les CSH de souris irradiées en TBI à la dose de 5 Gy. En effet, la perte de la phosphorylation de Bid ou le KO d'ATM entraîne un stress oxydatif mitochondrial, ce qui diminue alors la quiescence, le potentiel de repopulation et la survie des CSH. (Maryanovich et al., 2012).

L'ensemble de ces études pointe le stress oxydatif comme une des conséquences de l'irradiation, responsable de nombreux effets délétères sur les CSH tels que les dommages à l'ADN, la mort cellulaire ou l'altération des capacités de prolifération/différentiation.

2) Réparation des dommages à l'ADN

Que ce soit dû aux effets directs de l'irradiation ou à l'augmentation du stress oxydatif, les CSH présentent de nombreux dommages à l'ADN après une exposition aux radiations ionisantes. Lorsqu'elles sont soumises à des doses allant de 2 à 10 Gy, les CSH quiescentes sont forcées d'utiliser le mécanisme de NHEJ pour la réparation des dommages à l'ADN radio-induits, or ce mécanisme, sujet aux erreurs, peut entraîner une instabilité génomique et mener à des pertes de fonction des CSH. En revanche, des CSH forcées à proliférer vont préférentiellement utiliser le mécanisme de HR qui limite les risques de mutations (Mohrin et al., 2010). Ces résultats ont été confirmés par une étude montrant que la perte de l'exonucléase 1 (Exo1), un composant de la HR, n'altère pas la sensibilité des CSH quiescentes à l'irradiation, mais altère celle des CSH mises en prolifération par un traitement au 5-FU (Desai et al., 2014).

Ces mécanismes de réparation à l'ADN sont régulés par de nombreux facteurs tels que certains microARN. Dans les CSH murines, l'expression du micro-ARN miR-34a est sur-régulé après une TBI allant de 2 à 8 Gy. Après TBI, les CSH de souris déficientes pour ce miR-34a présentent une augmentation de l'apoptose, une perte de fonctionnalité et un défaut de réparation de l'ADN dû à une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la voie de réparation NHEJ et HR. Un traitement de ces souris avec un « agomir » du miR-34a, c'est-à-dire un mi-ARN synthétique mimant l'action du mi-ARN mature endogène, permet de modérer ces dommages en améliorant la réparation de l'ADN (Zeng et al., 2019).

Bien que la HR et le NHEJ soient les deux mécanismes de réparation de l'ADN les plus utilisés par les cellules après une irradiation, d'autres mécanismes tels que la réparation par excision de nucléotides (NER), la SSA et l'a-NHEJ peuvent être utilisés.

Xpg (Xeroderma pigmentosum group G complementing factor), un composant du NER, a été montré comme étant induit transcriptionnellement dans les CSH après une TBI de 4 Gy. Son inactivation limite l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Ces deux actions entraînent une augmentation de la capacité des CSH à former des colonies mais aussi une augmentation des taux de transformation des cellules (Avila et al., 2016).

La délétion de la poly [ADP-ribose] polymérase 2 (PARP2), une enzyme impliquée dans la HR, mais aussi dans la SSA ou l'a-NHEJ, entraîne une augmentation des dommages à l'ADN et de l'apoptose, ainsi qu'une diminution de la capacité de repopulation des CSH après une TBI de 5 Gy. La délétion de *p53* ou de *Puma* permet de restaurer la survie des souris PARP2 KO irradiées démontrant ainsi que PARP2 régule également l'apoptose radio-induite d'une façon *p53/Puma* dépendante (Farrés et al., 2013).

Bien que les dommages à l'ADN soient généralement réparés assez rapidement après l'irradiation, des TBI de souris à la dose de 7 Gy ont montré une augmentation de foci dans les CSH, persistants au moins un an après l'irradiation, ce qui indique que l'irradiation peut provoquer une accumulation à très long-terme des dommages résiduels à l'ADN (Vávrová et al., 2012).

3) Mort cellulaire radio-induite

a) La sénescence

La sénescence des CSH est considérée comme l'une des causes majeures des dégâts à long-terme observés dans la moelle osseuse de souris irradiées.

L'exposition de souris à une TBI de 6,5 ou 4 Gy entraîne une diminution de la quantité et de l'activité clonogénique des CSH et s'accompagne d'une surrégulation de certains marqueurs de sénescence tels que le biomarqueur SA- β -gal, ou encore $p16^{\text{Ink4a}}$, $p21^{\text{Cip1/Waf1}}$, $p19^{\text{Arf}}$ et $p53$. L'activation de $p53$ et la surrégulation de $p21^{\text{Cip1/Waf1}}$ sont des réponses radio-induites précoces et diminuent ensuite graduellement dans les semaines qui suivent l'irradiation. Cette augmentation précoce de $p21^{\text{Cip1/Waf1}}$ est impliquée dans une boucle de régulation entraînant l'inhibition de l'activité basale de $p53$ et permettant de diminuer l'apoptose, d'augmenter l'auto-renouvellement, mais aussi d'activer la réparation de l'ADN (Insinga et al., 2013). L'expression de $p16^{\text{Ink4a}}$ et de $p19^{\text{Arf}}$ augmentent en revanche dans un second temps dans les CSH, qui deviennent alors positives au biomarqueur SA- β -gal (Meng et al., 2003a; Wang et al., 2006).

Cette voie $p16^{\text{Ink4a}}/p19^{\text{Arf}}$ ne semble être impliquée que dans la sénescence tardive puisque dans le cadre de TBI à 6 Gy, le *knockout* de l'une ou l'autre de ces protéines n'entraîne aucun changement dans la réponse des CSH à l'irradiation. Cela démontre ainsi que l'induction de la sénescence prématurée des CSH est indépendante de la voie $p16^{\text{Ink4a}}/p19^{\text{Arf}}$ (Shao et al., 2014b).

Une autre voie impliquée dans la sénescence radio-induite des CSH est la voie p38. P38 est activée dans les cellules hématopoïétiques en général, mais de façon très marquée dans les CSH après une TBI de 6,5 Gy. Cette activation peut persister jusqu'à 5 semaines après l'irradiation dans le cadre de culture de cellules de moelle osseuse irradiées à 4 Gy. L'inhibition de p38 grâce à un inhibiteur spécifique, le SB203580, permet d'atténuer la mort radio-induite des cellules hématopoïétiques de la moelle et d'améliorer la capacité clonogénique des CSH. Ces effets de l'inhibiteur sont associés à une diminution de l'expression des marqueurs de sénescence p16^{Ink4a} et SA-β-gal (Li et al., 2011; Wang et al., 2011).

b) L'apoptose

Une autre conséquence majeure des radiations ionisantes sur les CSH est l'induction de l'apoptose, considérée comme étant responsable des lésions aiguës de la moelle osseuse à court terme après l'exposition.

En effet, des TBI de 3 à 6 Gy ont montré que l'irradiation induit une augmentation de l'apoptose associée à une augmentation des dommages à l'ADN et à une capacité de reconstitution altérée chez les CSH (Simonnet et al., 2009).

La surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans le tissu hématopoïétique permet de protéger la moelle osseuse des effets de l'irradiation. De plus, après une irradiation *in vitro*, des CSH purifiées ont montré une plus grande résistance à l'apoptose lorsque Bcl-2 est surexprimée (Domen et al., 1998). A l'inverse une déficience en Bcl-2 diminue la survie des CSH après une irradiation *in vitro* (Hoyes et al., 2000).

De la même façon, le traitement de cellules immatures de la moelle avec un inhibiteur de l'activité des enzymes de la famille des caspases, le Z-VAD, avant une irradiation à 4 Gy permet de limiter la mort radio-induite des CSH (Meng et al., 2003b). Pour finir, l'inhibition de la protéine phosphatase 2 (PP2A), un activateur de la voie pro-apoptotique impliquant la déphosphorylation d'Akt, permet de diminuer la mort radio-induite des CSH (Fabrizi et al., 2018).

La voie p53 a rapidement été identifiée comme une des voies principales de l'apoptose radio-induite dans les cellules hématopoïétiques puisque son absence permet de les en protéger (Lotem and Sachs, 1993). Certains co-facteurs de p53 tels que Aspp et certains effecteurs de l'apoptose p53-dépendante dont Puma et Mcl-1, semblent particulièrement importants dans la régulation de l'apoptose radio-induite des CSH.

P53 possède plusieurs co-facteurs qui font partie de la famille des « protéines stimulant l'apoptose de p53 » (Aspp). Les CSH de souris KO pour Aspp1 présentent moins d'apoptose et une plus faible

expression des gènes pro-apoptotiques, tels que *Bax*, *Noxa* et *Puma* après des TBI de 2 ou 4 Gy. Cependant, un double KO *Assp1/p53* a montré que la participation d'*Assp1* à l'apoptose radio-induite se fait à la fois de façon dépendante et indépendante de p53 (Yamashita et al., 2015).

Des irradiations *ex vivo* ou *in vivo* de CSH de souris *Puma*^{-/-} ont montré un rôle central de cette protéine pro-apoptotique dans la mort radio-induite des CSH (Shao et al., 2010; Yu et al., 2010). De même, la diminution de l'expression de *Puma*, *via* le KO de la kinase du facteur d'élongation eucaryote 2 (eEF2K), dans des CSH irradiées *ex vivo* à des doses de 1 à 5 Gy a montré une résistance des cellules à l'irradiation (Liao et al., 2016).

Il a également été montré que l'expression du miR-30 est déclenchée par les facteurs pro-inflammatoires IL1 β et NF κ B, dont l'expression est induite par des TBI de 5, 8 ou 9 Gy. Ce miR-30 inhibe le facteur anti-apoptotique Mcl-1 et contribue ainsi à l'induction de l'apoptose radio-induite dans les CSH (Li et al., 2016).

4) Prolifération et différenciation après l'irradiation

En conditions homéostatiques, les CSH sont majoritairement quiescentes. Cet état a été montré comme étant l'une des causes de leur radorésistance.

En effet, une diminution de la quiescence, *via* le KO du « Steroid Receptor Coactivator-3 » (SRC-3), régulateur important de l'homéostasie des CSH, entraîne une augmentation de leur radiosensibilité après une TBI de 6 Gy (Hu et al., 2018).

A l'inverse, une augmentation de la quiescence, *via* l'inhibition de CDK4/6, ou *via* la stabilisation de HIF1a, favorise la survie des CSH après une TBI (Forristal et al., 2013; Johnson et al., 2010).

La mort cellulaire radio-induite est à l'origine d'une diminution du nombre des différentes populations hématopoïétiques, mais également du réservoir de CSH, ce qui conduit ces dernières à proliférer et à se différencier suite à une irradiation. Il a été montré qu'en réponse à une irradiation de 3 Gy ou à des doses variant de 7,76 à 7,97 Gy, les CSH vont cycler de façon importante sur une durée de plusieurs mois (Ban and Kai, 2009; Chua et al., 2012).

Une irradiation de 4 Gy en TBI a également montré une différenciation augmentée et une baisse de l'auto-renouvellement des CSH. Cette entrée des CSH en différenciation est dépendante du checkpoint de différenciation G-CSF/Stat-3 (Signal transducer and activator of transcription 3)/BatF (Basic leucine zipper ATF-like Transcription Factor). La délétion de ces différents gènes permet d'améliorer l'auto-renouvellement des CSH en réponse à l'irradiation. Toutefois, il est à noter que l'inhibition de cette voie de signalisation entraîne une augmentation de l'accumulation des dommages à l'ADN (Wang et al., 2012).

Bien que ces mécanismes de prolifération et de différenciation soient nécessaires au rétablissement d'un tissu hématopoïétique normal, il peut à terme mener à l'épuisement du réservoir de CSH.

5) Impact des faibles doses de radiations ionisantes sur les CSH

Les effets des faibles doses d'irradiation, c'est-à-dire inférieures à 0,1 Gy, sont en règle générale bien moins étudiés que les effets des moyennes et fortes doses. Cependant, les quelques études publiées sur le sujet semblent mettre en évidence une hyper-radiosensibilité des CSH à ces faibles doses.

En effet, une étude du laboratoire a montré que, chez des souris transplantées avec des KLS irradiées *ex vivo* à faible dose (20 mGy), le nombre de CSH est très diminué 6 mois après la greffe. L'étude de ces CSH a mis en évidence un stress oxydatif persistant, ainsi qu'un défaut de « homing », un défaut d'auto-renouvellement et un biais myéloïde. Un traitement des CSH au NAC avant l'irradiation permet d'éviter ces anomalies (Rodrigues-Moreira et al., 2017).

L'hyper-radiosensibilité aux faibles doses d'irradiation est donc en lien avec l'augmentation des ROS radio-induits. Un des mécanismes décrits implique les ROS dans la phosphorylation de p62 de façon dépendante de l'AMPK, induisant la translocation de Nrf2 dans le noyau afin d'induire l'expression de gènes antioxydants et promouvoir la survie des CSH. L'utilisation de souris Nrf2^{-/-} a permis de montrer que l'inhibition de la voie Keap1/Nrf2 augmente l'hyper-radiosensibilité des CSH, alors que l'activation endogène de Nrf2 dans les cellules hématopoïétiques grâce à des souris Mx-Cre Keap1^{flox/flox} réduit cette hyper-radiosensibilité des CSH. Néanmoins, la phosphorylation de p62 va également déclencher des phénomènes d'autophagie et de mitophagie et donc mener à des dysfonctions mitochondriales. (Rodrigues-Moreira et al., 2017).

Il est à noter que, contrairement à ce que l'on peut observer avec de plus fortes doses, l'hyper-radiosensibilité des CSH aux faibles doses n'entraîne pas d'accumulation de cassures double brin résiduelles, n'implique pas la DDR, n'engendre pas d'anomalies cytogénétiques, ni de modification du cycle cellulaire ni d'apoptose radio-induite (Rodrigues-Moreira et al., 2017).

D'autres études ont montré que l'irradiation de souris en TBI avec des doses allant de 25 à 100 mGy entraîne la prolifération et la mobilisation des CSPH (Li et al., 2004), mais aussi que l'exposition quotidienne à des doses de 2 à 50 mGy pendant 1 mois diminue la capacité des CSH à former des colonies (Guo et al., 2015).

L'ensemble de ces études démontre que les CSH, bien que considérées comme étant radiorésistantes du fait de leur quiescence, peuvent être fortement impactées à court ou à long terme par les radiations ionisantes. Afin de mieux comprendre la façon dont les radiations impactent les CSH, de nombreuses

études se penchent désormais sur la façon dont leur microenvironnement cellulaire (ou niche hématopoïétique) réagit à l'irradiation pour les impacter en retour. Par exemple, il a été montré que la production d'angiopoïétine par les cellules LEPR⁺ (Zhou et al., 2015), d'adiponectine par les adipocytes (Masamoto et al., 2017) ou de PTN par les cellules endothéliales (Himburg et al., 2018) participent à la protection des CSH vis-à-vis d'une irradiation. Parmi les cellules de la niche, les macrophages ont notamment été montrés comme limitant l'épuisement du réservoir de CSH après une irradiation sublétales de 6 Gy grâce à la production de PGE2 (Ludin et al., 2012).

B. Réponse des macrophages

La réponse des tissus à l'irradiation est caractérisée par une phase aiguë qui implique le recrutement des cellules inflammatoires sur le site irradié. Après une période de latence, une phase tardive peut survenir, caractérisée par une inflammation chronique ou par des lésions chroniques du tissu telle que la fibrose. Le recrutement des cellules inflammatoires lors de la phase aiguë a été montré comme ayant un rôle dans les dommages chroniques observés dans les tissus irradiés (Meziani et al., 2018a).

Parmi ces cellules inflammatoires infiltrantes, on trouve les macrophages, considérés depuis plusieurs années comme une source importante de signaux à effet bystander, observés après irradiation (Mukherjee et al., 2014)

1) Etudes *in vitro/ex vivo*

La plupart des études *in vitro* s'accordent à dire que les macrophages, cellules considérées comme étant extrêmement radiorésistantes, ne répondent jamais à une irradiation isolée et doivent obligatoirement être stimulés pré ou post-irradiation afin de pouvoir réagir à l'irradiation.

Cette stimulation se fait généralement avec des traitements à l'IFN et au LPS (Wu et al., 2017). La lignée cellulaire de macrophages murins RAW 264.7, pré ou post-traitées à l'IFN γ et/ou au LPS, est une des plus utilisées dans les études sur la réponse *in vitro* des macrophages à l'irradiation. L'ensemble de ces études a permis de mettre en évidence que la dose d'irradiation délivrée a un impact sur l'orientation pro- ou anti-inflammatoire des macrophages.

A des doses inférieures à 2 Gy, on peut observer une diminution du « burst » oxydatif (Schaue et al., 2002), de l'expression de la protéine iNOS et de la production de NO (Hildebrandt et al., 1998, 2003; Conrad et al., 2009). Ces effets sont accompagnés d'une activation des « Extracellular-signal-Regulated Kinase » ERK1/2 qui va, d'une part activer la voie de signalisation anti-oxydante Keap1/Nrf2 (Tsukimoto et al., 2010), et d'autre part inactiver la voie p38/MAPK, impliquée dans l'apoptose et la production de

la cytokine pro-inflammatoire TNF α (Narang et al., 2009; Tsukimoto et al., 2009). Ainsi, une irradiation à une dose inférieure à 2 Gy oriente les macrophages activés vers un phénotype M2, anti-inflammatoire.

A des doses supérieures à 2 Gy, l'irradiation entraîne une augmentation de la production de NO (Hildebrandt et al., 1998) et de MMP9 (Zhou et al., 2010). Cette augmentation de NO est due en partie aux dommages à l'ADN qui, en activant PARP-1, entraînent l'activation de la voie NF κ B qui elle-même stimule iNOS (Ibuki et al., 2003). L'augmentation de la protéine HO-1 et l'induction du TNF α ont également été montrées comme ayant un rôle dans l'augmentation de NO (McKinney et al., 2000; Lee et al., 2014). Des doses supérieures à 2 Gy entraînent donc une orientation vers un phénotype M1, pro-inflammatoire.

L'utilisation d'une autre lignée murine de macrophages issus de poumons, les MH-S, a confirmé qu'une irradiation de 4 Gy active la voie p38, ce qui réprime le tristétraprolin (TTP), régulateur négatif de l'ARNm du TNF α , et donc augmente la sécrétion de TNF α par les macrophages (Ray et al., 2013).

Les mêmes expériences effectuées sur des macrophages péritonéaux murins irradiés *ex vivo* ont confirmé les résultats obtenus sur les lignées précédemment citées.

Des doses inférieures à 2 Gy entraînent une diminution de la sécrétion de NO (Hildebrandt et al., 1998), mais aussi une diminution de la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL1 β et une augmentation de la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire TGF β et ce *via* une inhibition de la voie NF κ B (Wunderlich et al., 2015).

Des doses supérieures ou égales à 2 Gy entraînent en revanche une augmentation de l'expression d'iNOS et de la production de NO, dépendantes de la voie des kinases c-Jun N-Terminals (JNK) (Ibuki and Goto, 1997; Narang and Krishna, 2005), une augmentation de l'expression précoce des molécules pro-inflammatoires IL1 β et IL6 (Hosoi et al., 2001) et une activation des 3 voies MAPK (ERK1/2, JNK et p38) (Narang and Krishna, 2008).

2) Etudes *in vivo*

Plusieurs études *in vivo* ont confirmé que l'activation des macrophages dans les souris irradiées n'est pas due à un effet direct des radiations, mais plutôt à la présence de signaux dans l'environnement ainsi qu'à la phagocytose des débris cellulaires ou des cellules apoptotiques (Mukherjee et al., 2014). Il a été montré que les macrophages alvéolaires du poumon, recrutés après une irradiation thoracique, sont activés. Cela suggère que ces macrophages, non exposés directement à l'irradiation, sont activés par des signaux dans l'environnement irradié. De plus, la déplétion de ces macrophages *via* l'utilisation

d'un anticorps monoclonal anti-CSF1R permet de bloquer le développement d'une fibrose radio-induite (Meziani et al., 2018b).

a) Rôle du génotype dans la réponse des macrophages à l'irradiation

Un point que les études *in vivo* ont permis de mettre en évidence est l'impact du génotype du modèle utilisé dans la réponse des macrophages à l'irradiation.

En effet, la comparaison de souches de souris radiosensibles (CBA/Ca) ou radiorésistantes (C57BL/6) a démontré que la réponse des macrophages à l'irradiation est liée au génotype des souris utilisées. En effet, les phagocytes de la moelle osseuse et de la rate de souris CBA/Ca produisent une plus grande quantité de superoxydes que ceux des souris C57BL/6, que ce soit après une TBI de 4 Gy ou sans irradiation (Lorimore et al., 2001). De plus, seuls les macrophages provenant de souris CBA/Ca irradiées sont capables d'induire une instabilité chromosomique dans des cellules exposées à leurs sécrétions, contrairement aux souris C57BL/6 (Lorimore et al., 2008). Ces observations sont en accord avec le fait que les macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM) de souris C57BL/6 ont un profil M2, anti-inflammatoire, contrairement aux BMDM de souris CBA/Ca qui présentent un profil M1, pro-inflammatoire. Une TBI à ces souris entraîne dans les BMDM des C57BL/6 une diminution de iNOS et une augmentation de l'activité de l'arginase, amplifiant le phénotype M2 alors que les BMDM de souris CBA/Ca maintiennent leur phénotype M1 (Coates et al., 2008). Certaines protéines impliquées dans la phagocytose, l'apoptose ou la signalisation cellulaire ont des niveaux d'expression basale différents dans les macrophages de ces souris, ce qui pourrait expliquer cette réponse différentielle à l'irradiation. Toutefois, aucun mécanisme clair n'a encore été établi (Chen et al., 2005).

Confirmant ces observations, l'irradiation *ex vivo* à des doses de 0,5 ou 0,7 Gy entraîne une diminution de la sécrétion d'IL1 β par des macrophages péritonéaux activés provenant de souris radiosensibles Balb/Ca, ce qui n'est pas le cas pour les macrophages issus de souris C57BL/6 (Frischholz et al., 2013).

b) Balance entre rôles pro- et anti-inflammatoires

Une des fonctions majeures des macrophages au sein des tissus est la résolution de l'inflammation. Leur réponse face à un stress inflammatoire comprend généralement une première phase d'induction de l'inflammation (M1), puis une phase de résolution de l'inflammation (M2). Ce mécanisme semble se confirmer dans le cadre d'une irradiation à des fortes doses. En revanche, pour les doses inférieures à 2 Gy les résultats sont plus disparates.

Doses inférieures à 2 Gy

Quelques heures après une TBI de 40 mGy les macrophages péritonéaux résidents présentent une signature plutôt M2, *via* l'expression d'IL1 β (Ibuki and Goto, 1999). En revanche, après une TBI à des doses de 75 mGy ou 2 Gy, une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires IL12 et IL18 a été observée dans les macrophages péritonéaux. Cette augmentation a été corrélée à une sur-régulation de CD14 et TLR4-MD (Myeloid Differentiation factor) à la surface des macrophages, ainsi qu'à une augmentation de l'expression de MyD88 dans le cytoplasme des macrophages. Cela indique une activation de la voie de signalisation TLR-MyD88 dans les macrophages irradiés, qui est l'une des voies impliquées dans la réponse immune des macrophages (Shan et al., 2007).

Doses supérieures à 2 Gy

A temps court après l'irradiation, ici 24h après une TBI de 4 Gy, la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques entraîne une activation des macrophages de la moelle osseuse et de la rate, ainsi qu'une augmentation de l'activité des enzymes lysosomales, de iNOS et du « burst » oxydatif (Lorimore et al., 2001). Une TBI de 2 Gy a aussi montré une augmentation de la Caspase-1 dans les macrophages de la rate, correspondant à une activation de l'inflammasome (Stoecklein et al., 2015). Ces deux études démontrent ainsi une orientation M1 des macrophages irradiés à court terme après l'irradiation.

Dans des souris C57BL/6 exposées à une irradiation thoracique de 12 Gy, l'expression de l'ARNm de iNOS augmente dans les premières 24h dans les macrophages alvéolaires. Elle s'accompagne d'une augmentation du niveau de la protéine durant les deux premières semaines suivant l'irradiation, avant de revenir à la normale. L'expression de l'arginine, quant à elle, augmente dans un second temps, à savoir entre 16 et 24 semaines post-irradiation (Zhang et al., 2011). Des macrophages alvéolaires de poumons de souris irradiées à 17,5 Gy produisent également de grandes quantités de TGF α et de TGF β , 4 semaines après irradiation (Rubin et al., 1992). Cette étude démontre bien qu'après une irradiation, il existe une balance entre les phénotypes M1 et M2 au cours du temps.

En revanche, dans des souris Balb/Ca, une irradiation thoracique de 10 Gy induit une infiltration et une activation de macrophages dans le poumon, ainsi qu'une augmentation de l'expression de iNOS et une diminution de l'expression de l'arginase jusqu'à 18 semaines après l'irradiation (Abernathy et al., 2015), soulignant une fois de plus les différences qui peuvent exister entre des modèles de souris différents.

Cette balance M1/M2 semble également dépendante de l'organe étudié puisqu'une inflammation persistante à long-terme a parfois été observée. Par exemple, une irradiation ciblée du rein chez des souris C57BL/6 à la dose de 16 Gy induit une infiltration de macrophages responsables de la sécrétion d'IL6 jusqu'à 20 semaines après l'irradiation (Scharpfenecker et al., 2012).

Une étude RNA-seq effectuée sur des BMDM irradiés à 6 Gy et provenant de différentes souches de souris, a permis de récapituler et d'affiner la liste des senseurs et des voies de signalisation impliqués dans la réponse des macrophages à l'irradiation. ATM a été montré comme régulant près de la moitié des gènes de réponse précoce à l'irradiation identifiés dans cette étude, et cela *via* l'activation de la voie NFκB et d'autres facteurs inductibles, selon un mécanisme dépendent de l' « Interferon Regulatory Factor 1 » (IRF1). De plus, plusieurs groupes de gènes activés par p53 et Nrf2 ont été identifiés (**Figure 32**) (Purbey et al., 2017).

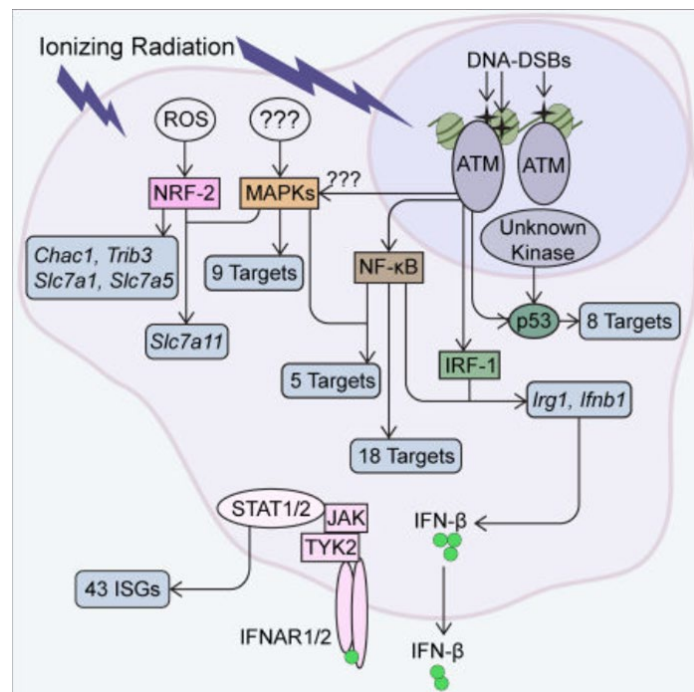


Figure 32 : Réponse transcriptionnelle des macrophages aux radiations ionisantes.

Cette étude transcriptomique a révélé l'activation radio-induite d'un petit nombre de senseurs et de voies de signalisation, notamment ATM, p53 et Nrf2. (Purbey et al., 2017)

3) Oxydes nitriques (NO) et peroxynitrites

Les NO produits par les macrophages *via* iNOS sont largement considérés comme étant cytotoxiques. Cependant, il semble que la majorité des effets cytotoxiques qui leur sont attribués ne sont pas directs mais plutôt dus à l'un de leurs produits, les peroxynitrites (ONOO⁻). Ces peroxynitrites sont le produit de la réaction entre les NO et les ions superoxydes. Une fois formées, ces molécules extrêmement

réactives interagissent avec les lipides, l'ADN et les protéines directement *via* des réactions oxydatives, ou indirectement *via* la formation d'autres radicaux libres. Ces interactions vont déclencher des mécanismes de défense de la cellule qui, s'ils ne sont pas suffisants, peuvent mener jusqu'à l'apoptose ou la nécrose (Pacher et al., 2007).

In vivo, les NO sont rapidement éliminés *via* leur fixation aux globules rouges dans lesquels ils sont rapidement convertis en nitrate par réaction avec l'oxyhémoglobine (Joshi et al., 2002). Cette réaction permet de limiter la demi-vie des NO à moins d'une seconde dans l'organisme. Toutefois, quand des NO sont produits à proximité d'ions superoxydes, ils se combineront spontanément pour former des peroxynitrites grâce à une réaction en diffusion limitée (Huie and Padmaja, 1993). Au vu des capacités de diffusion élevée des NO à travers les membranes, les NO et les ions superoxydes n'ont même pas besoin d'être produits dans la même cellule pour former des peroxynitrites (Pacher et al., 2007).

Une fois formés, les peroxynitrites peuvent eux aussi traverser les membranes plasmiques (Denicola et al., 1998). Ces molécules sont extrêmement réactives et vont pouvoir interagir avec de nombreuses macromolécules, entraînant des réponses cellulaires qui s'inscrivent dans les mécanismes de réponses à l'irradiation déjà documentés dans ce manuscrit.

Les peroxynitrites vont notamment inactiver les enzymes de la famille SOD, soit par un phénomène de nitration de tyrosine pour la MnSOD (MacMillan-Crow and Thompson, 1999), ou de modifications d'histidines et de nitration/oxydation de tryptophane pour la CuZnSOD (Yamakura et al., 2001; Alvarez et al., 2004).

Par des réactions d'oxydation, les peroxynitrites peuvent également induire des dommages aux bases de l'ADN, majoritairement au niveau des guanines et des 8-oxoguanines, ainsi que l'atténuation de l'activité de la 8-oxoguanine glycosylase (Ogg1), une des enzymes clé du mécanisme de réparation par excision de base (BER), pouvant entraîner la formation de SSB (Niles et al., 2006; Farhood et al., 2020). En attaquant directement les sucres constituant le squelette de la molécule d'ADN, les peroxynitrites peuvent également induire des DSB (Burney et al., 1999).

La mitochondrie a été montrée comme l'un des lieux principaux de formation et de réaction des peroxynitrites dans la cellule. Les peroxynitrites, lorsqu'ils sont en grande quantité, peuvent mener à des altérations de la formation d'ATP et de l'homéostasie du calcium, à l'arrêt de la chaîne de transfert des électrons et peuvent favoriser l'ouverture de Pores de Transition de la Perméabilité (PTP). Ces altérations sont dues à des mécanismes d'oxydation, de nitration et de nitrosation de composants de la matrice et des membranes internes et externes de l'organelle. L'altération de la synthèse d'ATP et la formation des PTP peuvent déclencher la cascade des caspases et donc l'apoptose, voire la nécrose

dans des cas où les peroxy-nitrites vont jusqu'à entraîner la destruction des membranes. L'ensemble de ces actions va également entraîner un stress oxydatif supplémentaire dans la mitochondrie et donc la formation de ROS secondaires (Radi et al., 2002).

En plus de cet effet sur les mitochondries, les peroxy-nitrites peuvent également déclencher l'apoptose en agissant sur différentes voies de signalisation. Ils peuvent activer les voies des MAPK, *via* ERK, JNK et p38 (Nabeyrat et al., 2003) et inactiver la voie PI3k/Akt (Hellberg et al., 1998; Shacka et al., 2006). Les peroxy-nitrites fonctionnent également comme des répresseurs de l'activation de la voie NFκB (Levrand et al., 2005).

La nécrose induite par les peroxy-nitrites est également médiée par l'induction directe de dommages à l'ADN, alors reconnus par PARP-1 qui, lorsqu'il est surproduit dans une cellule, peut entraîner sa nécrose (Szabó, 2006).

La réponse des macrophages à l'irradiation semble donc extrêmement dépendante de la dose d'exposition, de la souche de souris utilisée, mais aussi de l'organe étudié. Il est aussi à noter que les études décrivant les effets des radiations ionisantes sont majoritairement effectuées sur des lignées cellulaires ou sur des macrophages circulants et que très peu d'études portent sur les macrophages résidents des organes. Compte-tenu de l'importance des macrophages résidents dans l'homéostasie des organes et notamment au niveau de la niche hématopoïétique, leur étude pourrait mettre en lumière de nouveaux mécanismes dans la réponse des CSH à l'irradiation.

Durant mon travail de thèse, j'ai cherché à caractériser le rôle des macrophages résidents de la moelle osseuse dans la réponse des CSH à une dose modérée de radiations ionisantes.

Pour cela, j'ai utilisé deux modèles de souris déplétées en macrophages CD169⁺ : un modèle pharmacologique, par injection de clodronate-liposomes et un modèle génétique de souris CD169^{DTR/+} permettant de dépler spécifiquement les macrophages résidents.

Le premier objectif de ce travail a été d'évaluer la réponse des CSH à une irradiation corps entier (TBI), en présence et en absence des macrophages résidents de la moelle osseuse.

Dans le modèle pharmacologique, l'injection de clodronate-liposomes à des souris WT a permis d'induire une déplétion des macrophages de la moelle. La réponse des CSH à l'irradiation a ensuite été étudiée à court-terme (1 jour) et à long-terme (5 mois) après TBI. L'impact de l'irradiation associée à la déplétion des macrophages a aussi été évalué, en termes de nombres, sur différentes populations cellulaires de la niche : les macrophages résidents CD169⁺, les cellules endothéliales artériolaires et sinusoïdales, les cellules stromales CAR et PDGFR α et les ostéoblastes.

Dans le modèle génétique, l'injection de toxine diphtérique à des souris CD169^{DTR/+} a permis d'induire la déplétion spécifique des macrophages résidents CD169⁺. La réponse des CSH et la caractérisation de la niche après irradiation ont également été effectuées. Suite au travail de (Hur et al., 2016) décrivant une interaction directe entre le récepteur DARC des macrophages et le récepteur CD82 des CSH, il a semblé pertinent d'étudier la réponse différentielle des CSH CD82⁺ et CD82^{neg} à l'irradiation. Pour finir, des greffes de moelle osseuse, prélevée chez des souris WT et CD169^{DTR/+} 5 mois après irradiation, ont été effectuées afin de tester la fonctionnalité des CSH.

Le deuxième objectif était de mieux caractériser le stress oxydant radio-induit dans les CSH de souris WT ou CD169^{DTR/+}, puisque l'apparition d'un stress oxydant est l'un des effets majeurs des radiations ionisantes. Dans un premier temps, les niveaux de ROS intracellulaires ont été mesurés dans les CSH de souris WT et CD169^{DTR/+} après TBI et dans un second temps, l'effet d'un traitement avec un « scavenger » des ROS, le NAC, a été évalué sur l'impact de la TBI vis-à-vis des CSH.

Le dernier objectif a été de mettre en évidence le ou les mécanismes impliqués dans cet effet délétère des macrophages sur les CSH lors d'une irradiation. Pour cela, nous avons ciblé la réponse directe des macrophages à l'irradiation en étudiant plus particulièrement la production de NO, qui est

l'une des caractéristiques de la réponse pro-inflammatoire des macrophages. Pour cela, nous avons étudié l'expression de l'enzyme iNOS et mesuré les NO dans les macrophages CD169⁺. Les NO sont connus pour réagir avec les ions superoxydes pour former des peroxynitrites, une espèce réactive extrêmement cytotoxique. Des mesures de peroxynitrites dans les CSH ont donc été effectuées. La production de NO par les macrophages pouvant être impactée par un environnement oxydatif, nous avons évalué l'impact d'un traitement au NAC sur la proportion de macrophages présentant des NO et sur la proportion de CSH présentant des peroxynitrites.

Puis, afin de valider que cette action délétère d'une TBI sur les CSH passait par la production de NO, nous avons traité des souris, soit avec un inhibiteur spécifique de iNOS, le 1400W, soit avec un donneur de NO, le 3-morpholinosydnonimine (SIN-1).

Les résultats de ce travail sont présentés ici sous la forme d'un article qui sera bientôt soumis pour publication.

J'ai également signé un chapitre méthodologique intitulé :

« *Isolation and Phenotyping of Bone Marrow Macrophages* »

Methods in Molecular Biology (2018), 1784, 87-92

doi: 10.1007/978-1-4939-7837-3_8

Il se trouve en annexe de ce manuscrit.

Deleterious effect of CD169⁺ macrophages on Hematopoietic Stem Cells in response to irradiation

Marion Chalot^{1,2,3}, Vilma Barroca^{1,2,3}, Caroline Devanand^{1,2,3}, Françoise Hoffschir^{1,2,3}, Paul-Henri Romeo^{1,2,3,4,*} and Stéphanie G. Moreno^{1,2,3,4,*}

1. CEA, DRF-JACOB-IRCM-SCSR-LRTS, UMR «Stabilité génétique, Cellules Souches et Radiations », F-92265 Fontenay-Aux-Roses, France
2. INSERM, U1274, Team « Niche et Cancer dans l'Hématopoïèse », F-92265 Fontenay-Aux-Roses, France
3. UMR « Stabilité génétique, Cellules Souches et Radiations », Université de Paris – Université Paris Saclay, F-92265 Fontenay-Aux-Roses, France
4. These authors contributed equally

* Corresponding authors: stephanie.moreno@cea.fr , paul-henri.romeo@cea.fr

Abstract

In bone marrow, a sub-population of hematopoietic stem cell (HSC) are in contact with CD169⁺ resident macrophages (MΦ) that are supposed to protect HSC from oxidative stress. Here, we show an unexpected role of CD169⁺ MΦ in HSC response to a dose of irradiation commonly used in fractionated radiotherapy, as pharmacological or genetic depletion of CD169⁺ MΦ results in a complete recovery of functional HSC after a 2 Gy total body irradiation (TBI). CD169⁺ MΦ depletion impairs the TBI-mediated increased levels of reactive oxygen species (ROS) in HSC through a decreased production of nitric oxide (NO). This led to reduced levels of HSC presenting peroxynitrites, a cytotoxic NO product. Using NO modulators, we show that, after a 2 Gy TBI, diminution of NO production increases HSC recovery, whereas NO augmentation decreases the HSC compartment. Altogether, these results show deleterious effects of CD169⁺ MΦ on HSC after a 2 Gy TBI and suggest that regulation of NO production can be used to modulate the effects of TBI.

Introduction

Radiotherapy is one of the mostly used method in cancer treatment. Despite its efficiency to reduce tumor size, its use may be limited by the irradiation impact on the surrounding healthy tissues, which can lead to deleterious side effects in patients (Döerr, 2009). Bone and bone marrow (BM), which contains the hematopoietic stem cells (HSC) responsible for the renewal of the blood tissue all lifelong, are very sensitive to radiation therapy (Baxter et al., 2005; Costa and Reagan, 2019; Green and Rubin, 2014). Considering the fundamental role of HSC, the effects of radiation on them are highly investigated. It has been described that moderate doses, such as the one used in fractionated radiotherapy, induce apoptosis, oxidative stress and genomic instability in HSC (Guo et al., 2015; Mohrin et al., 2010). It's of prime importance to find out how to protect those cells from the harmful effects of radiations.

HSC are localized in a microenvironment called the hematopoietic stem cell niche, which is essential for HSC protection and regulation (Mendelson and Frenette, 2014). In a previous paper, we have shown that this microenvironment protects HSC from irradiation as their mobilization worsen their recovery post-irradiation (Rodrigues-Moreira et al., 2017).

Among the different cell populations of the hematopoietic stem cell environment, the CD169⁺ resident macrophages (MΦ) have been shown to maintain the HSC in their niche in order to regulate their quiescence and to protect them from oxidative stress (Chow et al., 2011; Hur et al., 2016; Ludin et al., 2012). They are radio-resistant and are necessary for effective transplantation and hematopoietic reconstitution after lethal irradiation (Kaur et al., 2018).

On the other side, CD169⁺ MΦ may have deleterious effects as they are able to produce proinflammatory molecules. For example, in gut, it has been shown that their depletion ameliorates colitis symptoms (Asano et al., 2015).

In this study, we characterized the detrimental role of CD169⁺ MΦ on HSC fate after a 2 Gy total body irradiation (TBI). By using different models of *in vivo* depletion, we showed that CD169⁺ resident MΦ are responsible for the decrease of the HSC pool after TBI and that their specific depletion allowed a complete HSC recovery 2 weeks post-irradiation.

Results and Discussion

Pharmacological depletion of bone marrow macrophages preserves the long-term hematopoietic stem cells compartment after a 2 Gy total body irradiation

To characterize the role of bone marrow (BM) macrophages (M Φ) on long-term hematopoietic stem cells (LT-HSC) after a 2 Gy total body irradiation (TBI), mice were treated with clodronate-liposomes (CLO-lipo) before TBI (Moreno, 2018) (Fig.1A, upper scheme). Forty hours after CLO-lipo treatment, 86% of BM M Φ were depleted and 98% of resident BM CD169⁺ M Φ were depleted (Fig.S1, upper panels). Of note, CD169⁺ M Φ number did not return to normal level even 5 months after the CLO-lipo treatment (Fig.S1, lower panel). One day after a 2 Gy TBI, the LT-HSC number in PBS-liposome (PBS-lipo) treated mice decreased by 3.7-fold but only by 1.9-fold in CLO-lipo treated mice (Fig.1A, lower left panel). This increased number of LT-HSC in CLO-lipo treated mice was associated with a decreased percentage of apoptotic LT-HSC (Fig.1A, lower middle panel) and an increased percentage of LT-HSC in S-G2-M (Fig.1A, lower right panel). Five months after a 2 Gy TBI, CLO-lipo treated mice had a normal number of LT-HSC whereas, in the PBS-lipo treated mice, the number of LT-HSC was 3-fold decreased (Fig.1B, left panel) and the percentage of LT-HSC in apoptosis was 2-fold increased (Fig.1B, right panel). Altogether, these results indicate that a CLO-lipo treatment delivered before a 2 Gy TBI decreases the deleterious effects of this irradiation on LT-HSC and allows a long-term complete recovery of the LT-HSC compartment.

CLO-lipo treatment acts on other cells than M Φ that are part of the hematopoietic stem cell niches, such as osteoblasts (OBC) or stromal cells (Batoon et al., 2019; Chow et al., 2011; Winkler et al., 2010). Cellular analysis of LT-HSC niche composition 40 h after PBS-lipo treatment showed no change compared to wild-type mice, whereas a CLO-lipo treatment resulted in unchanged numbers of arteriolar endothelial cells (AEC) and sinusoidal endothelial cells (SEC), decreased numbers of OBC and stromal CXCL12-abundant Reticular (CAR) cells (3.6 and 2.4-fold respectively), increased number of stromal PDGFR α cells (2.6-fold) and a high decreased number of the CD169⁺ M Φ (45-fold) (Fig.1C). One day after a 2 Gy TBI, PBS-lipo treated mice showed a decreased number of CD169⁺ M Φ (3.9-fold) and increased numbers of AEC (2-fold) and SEC (1.2-fold), whereas CLO-lipo treated mice showed a further decrease of CD169⁺ M Φ (2.3-fold), an increased number of SEC (1.6-fold) and decreased numbers of CAR (1.4-fold) and PDGFR α (2.4-fold) cells. Irradiation had no significant effect on CAR cells, PDGFR α cells and OBC from PBS-lipo and on OBC from CLO-lipo treated mice (Fig.1D).

These results show that CLO-lipo treatment results in complete depletion of CD169⁺ MΦ and suggest a role of CD169⁺ MΦ in the effects of a 2 Gy TBI on LT-HSC.

Genetic depletion of CD169⁺ MΦ results in a rapid and total recovery of functional LT-HSC after a 2 Gy total body irradiation

To overcome both the inflammation associated with CLO-lipo treatment and CLO-lipo-mediated depletion of other cells than CD169⁺ MΦ (Ferenbach et al., 2012; Lin and O'Connor, 2017), we used a genetic model of mice to specifically deplete CD169⁺ MΦ (Chow et al., 2011; Miyake et al., 2007). Intraperitoneal injection of diphtheria toxin (DT) in CD169^{DTR/+} mice resulted in depletion of 96% CD169⁺ MΦ from 72h after DT injection (Fig.S2A, upper panel). As with CLO-lipo treatment, the number of CD169⁺ MΦ did not return to normal level even 5 months after the DT treatment (Fig.S2A, lower panel).

Total BM cellularity followed the same kinetics in WT and CD169^{DTR/+} mice treated with DT and exposed to a 2 Gy TBI 72h later (Fig.S2B). However, whereas the LT-HSC number in WT mice decreased and started to increase 10 days after TBI (Fig.2A, upper left panels), the LT-HSC number in CD169^{DTR/+} mice started to increase 5 days after TBI to finally reached a normal number at 15 days after TBI (Fig.2A, upper left panels). Percentages of LT-HSC in apoptosis through time showed a first increase in both WT and CD169^{DTR/+} mice, with a peak one day after TBI that was lower in CD169^{DTR/+} mice than in WT mice and a second increase of apoptosis 6 days after TBI only in WT mice (Fig.2A, upper right panel). As observed after CLO-lipo treatment, the percentage of LT-HSC in S-G2-M one day after a 2 Gy TBI was higher in CD169^{DTR/+} mice than in WT mice (Fig.2A, lower panel).

Cellular analysis of LT-HSC niche composition 72 hours after DT treatment of WT or CD169^{DTR/+} mice showed unchanged number of AEC, increased number of SEC (1.5-fold), decreased numbers of OBC, CAR and PDGFRα cells (1.7-, 1.7- and 1.6-fold respectively) and a high decrease of CD169⁺ MΦ (35-fold) (Fig.2B). Analysis of the niche one day after a 2 Gy TBI showed a decreased number of CD169⁺ MΦ (2.5-fold) and an increased number of SEC (1.9-fold) in WT mice, but did not show any number modifications of the other components of the niche. In CD169^{DTR/+} mice, no modifications were observed except for the CD169⁺ MΦ compartment, which was further decreased (2.3-fold) after TBI (Fig. 2C).

As 40% of LT-HSC express the CD82 surface marker, that directly interact with the DARC receptor detected on 15% of CD169⁺ MΦ (Hur et al., 2016), we studied these two cell populations. In CD169^{DTR/+} mice, CD169⁺ DARC⁺ MΦ were depleted (Fig.2D, left panel) and this depletion was associated with a decreased number of CD82⁺ LT-HSC (Fig.2D, right panel). Kinetics of CD82⁺ and CD82^{neg} LT-HSC in WT and CD169^{DTR/+} mice showed similar

recovery of CD82⁺ LT-HSC (Fig.2E, left panel) but impaired recovery of CD82^{neg} LT-HSC in the irradiated WT mice (Fig.2E, right panel).

Five months after a 2 Gy TBI, LT-HSC number returned to normal in CD169^{DTR/+} mice but not in WT mice (Fig.2F, left panel), due to a decreased number of CD82^{neg} LT-HSC in the WT mice (Fig.2F, middle panel), whereas the CD82⁺ LT-HSC returned to normal (Fig. 2F right panel). This difference was not accounted for by clonal expansion as cytogenetic analysis of LSK (Lin^{neg} Sca-1^c-Kit⁺) cells five months after irradiation did not show any difference of LSK with chromosomal rearrangements in irradiated WT and CD169^{DTR/+} mice (Fig.S2C).

Five months after a 2 Gy TBI, bone marrow from WT or CD169^{DTR/+} mice was transplanted into conditioned recipient mice and, five months later, bone marrow was analyzed (Fig.2G, left scheme). BM cellularity and chimerism were similar in the four groups of mice, as well as the MPP2 and MPP3 numbers (Fig.S2D) and mature cell numbers (data not shown). However, whereas mice transplanted BM from irradiated WT mice had decreased numbers of LT- and ST-HSC, mice transplanted BM from irradiated CD169^{DTR/+} mice had normal numbers of LT- and ST-HSC (Fig. 2G, right panels).

Altogether, these results show that a 2 Gy TBI, delivered to mice specifically depleted in CD169⁺ M Φ , decreased LT-HSC apoptosis and resulted in a complete recovery of functional LT-HSC.

CD169⁺ M Φ depletion suppresses the intracellular Reactive Oxygen Species (iROS) increase in LT-HSC after a 2 Gy TBI.

To characterize the role of CD169⁺ M Φ on LT-HSC after a 2 Gy TBI, we first studied iROS levels, which are the primary mediator of ionizing radiation (Wang et al., 2010). In irradiated WT mice, a first increase of iROS⁺ LT-HSC started 5h after TBI, with a peak one day later, and a second increase started 6 days after TBI, with a peak 4 days later (Fig.3A, upper left panel). These two waves of increased iROS levels correlated with the two waves of apoptotic LT-HSC (see Fig.2A) and among the iROS⁺ LT-HSC in irradiated WT, there were more CD82⁺ cells than CD82^{neg} cells one and ten days after TBI (8- and 2-fold respectively) (Fig.3A, lower left and upper right panels). In contrast, in CD169^{DTR/+} mice, a 2 Gy TBI did not result in any increase of iROS⁺ LT-HSC (Fig.3A, upper left panel) suggesting a iROS-independent apoptosis of LT-HSC in these mice. To determine if CD169⁺ M Φ were necessary for the first and/or the second increase of iROS levels, CD169⁺ M Φ were depleted 4 days after a 2 Gy TBI, i.e. after the first increased of iROS levels (Fig. S3A). Ten days after TBI, this CD169⁺ M Φ depletion did not suppress the second increase of iROS levels in LT-HSC, did not decrease the percentage of apoptotic LT-HSC and did not lead to an increased LT-HSC number after a

2 Gy TBI (Fig.3B). These results show that the effects of the CD169⁺ MΦ deficiency on LT-HSC are associated with the suppression of the early increase of iROS levels after a 2 Gy TBI. To determine if increased iROS levels were directly involved in the decreased number of LT-HSC in 2 Gy irradiated WT mice, mice were treated with N-acetyl-L-cysteine (NAC), a ROS scavenger (Wang et al., 2010), before and after TBI (Fig.3C, upper scheme). This NAC treatment resulted in the absence of iROS increase one day after a 2 Gy TBI (Fig. 3C, middle left panel). Compared to non-treated mice, the LT-HSC number was higher 1 day after a 2 Gy TBI in WT mice treated with NAC and was similar to the one observed in 2 Gy irradiated CD169^{DTR/+} mice treated or not with NAC (Fig.3C, middle middle panel). This increased number of LT-HSC was associated with a decreased percentage of radio-induced apoptotic LT-HSC in WT mice treated with NAC (Fig. 3C, middle right panel). Twenty-one days after TBI, the LT-HSC number remained higher in WT mice treated with NAC, but was diminished when compared to irradiated CD169^{DTR/+} mice (Fig.3C, lower panel), suggesting that increased levels of ROS were only partially involved in the long-term phenotype of LT-HSC.

As a 2 Gy TBI has effects on many organs, only one leg of WT and CD169^{DTR/+} mice was irradiated at 2 Gy. One day later, in the irradiated leg of WT mice, the LT-HSC number was decreased and the number of iROS⁺ LT-HSC and apoptotic LT-HSC was increased when compared to the non-irradiated leg. In CD169^{DTR/+} mice, the decrease of LT-HSC number was smaller and the number of iROS⁺ LT-HSC and apoptotic LT-HSC was similar to the ones in the non-irradiated leg (Fig.S3B).

Altogether, these results show that CD169⁺ MΦ deficiency results in a local protection of LT-HSC against the deleterious effects of a 2 Gy irradiation.

A 2 Gy TBI triggers Nitric Oxide production by CD169⁺ MΦ and increased levels of peroxynitrites in LT-HSC.

In response to oxidative stress, MΦ produce pro-inflammatory molecules such as nitric oxide (NO), through activation of the nitric oxide synthase 2 (iNOS) (Narang and Krishna, 2005). After a 2 Gy TBI, almost all iNOS⁺ MΦ were CD169⁺ (Fig.4A, left panel) and displayed a 2.5-fold increase of iNOS expression (Fig.4A, right panel). After a 2 Gy TBI, the MΦ producing NO were mostly CD169⁺ as small percentages of CD169^{neg} MΦ in WT (Fig4B, left panel) and in CD169^{DTR/+} mice (Fig.4B, middle panel) were NO⁺. The percentage of NO⁺ CD169⁺ MΦ in WT mice started to increase 5h up to at least one day after irradiation and a second increase of NO⁺ CD169⁺ MΦ occurred 10 days later (Fig.4B, right panel). These two increases correlated with the two waves of increased iROS⁺ LT-HSC after a 2 Gy TBI (see Fig.3A).

After irradiation, MΦ can produce NO. NO are extremely diffusible reactive species that can react with superoxide ions (O₂⁻) produced from ROS to form peroxynitrite anions (OONO⁻) that

can be highly toxic to cells and lead to apoptosis (Pacher et al., 2007) (Fig.4C). In WT mice, a first increase of LT-HSC containing peroxynitrites occurred between 12h and 1 day after a 2 Gy TBI and a second increase occurred between 10 and 15 days after TBI (Fig.4D, upper left panel). These two increases correlated with increased NO levels in CD169⁺ MΦ and with increased iROS levels in LT-HSC. In CD169^{DTR/+} mice, the percentage of LT-HSC containing peroxynitrites after a 2 Gy TBI was similar to the one in non-irradiated mice (Fig.4D, upper right panel). As for iROS⁺ LT-HSC, there were more CD82⁺ peroxynitrite⁺ LT-HSC than CD82^{neg} peroxynitrite⁺ LT-HSC 1 and 10 days post-TBI (Fig.4D, lower left histograms), suggesting a possible link between the formation of peroxynitrites in LT-HSC and their association with CD169⁺ MΦ shown to produce NO.

The effects of NAC treatment on the number of CD169⁺ MΦ producing NO and of peroxynitrite⁺ LT-HSC were studied in WT mice and compared to CD169^{DTR/+} mice. One day after a 2 Gy TBI, the number of CD169⁺ MΦ with NO was reduced in WT mice after NAC treatment, but was still higher than in CD169^{DTR/+} mice (Fig.4E, left panel). The proportion of peroxynitrite⁺ LT-HSC was also reduced after NAC treatment in irradiated WT mice and became similar to the one observed in irradiated CD169^{DTR/+} mice (Fig.4E, right panel). Together with the data shown in Fig.3C, these results suggest that the peroxynitrite formation, via the iROS elevation in LT-HSC and NO production by CD169⁺ MΦ, accounted for the decrease of LT-HSC in irradiated WT mice.

After a 2 Gy TBI, iNOS inhibitor increases recovery of LT-HSC and NO donor increases LT-HSC depletion.

WT mice were treated with 1400W, a selective inhibitor of iNOS (Garvey et al., 1997), 30 min before a 2 Gy TBI, and 1h30 and 4h30 after TBI (Fig.5A, upper scheme). This treatment decreased the percentage of NO⁺ CD169⁺ MΦ 1 day after TBI to levels similar to non-irradiated mice (Fig. 5A, upper right panel). One day after a 2 Gy TBI, the proportion of LT-HSC in the S-G2-M phase of cell cycle was increased when mice were treated with 1400W (Fig.5A, lower left panel). And 21 days after a 2 Gy TBI, the 1400W treatment led to an increased number of LT-HSC, that was still lower than without irradiation (Fig.5A, lower middle and right panels). However, an additional 1400W injection 11h after TBI was able to restore the LT-HSC in WT mice 21 days after irradiation (Fig.5B)

Inversely, to determine if increased NO levels were directly involved in a decreased number of LT-HSC after TBI, WT and CD169^{DTR/+} mice were injected with SIN-1, a NO donor (Singh et al., 1999), 10 min, 11h, 24h and 48h after a 2 Gy TBI (Fig.5C, upper scheme). Twenty-one days after TBI, the LT-HSC number was more decreased in WT mice treated with SIN-1 compared to non-treated WT mice and was also diminished in CD169^{DTR/+} mice treated with

SIN-1 (Fig. 5C, lower panel), suggesting an important role of NO on the LT-HSC fate after a 2 Gy TBI.

Altogether, these data demonstrate that bone marrow resident CD169⁺ MΦ have a detrimental effect on HSC response to irradiation. Their absence during a 2 Gy TBI inhibits the radio-induced iROS elevation and diminishes apoptosis in LT-HSC, allowing a better and complete recovery of a functional LT-HSC pool long-term post-TBI. Those observations are consistent with previous studies that identify resident macrophages as inducers of tissue toxicity in different pathologies such as obesity or atherosclerosis (Caslin et al., 2020; Yang et al., 2020). However, our study shows for the first time a deleterious effect of resident macrophages in response to irradiation.

We demonstrate here that after a 2 Gy TBI, a higher proportion of bone marrow CD169⁺ macrophages produce NO, which is one of macrophage pro-inflammatory characteristic in response to an irradiation at this dose (Narang and Krishna, 2005). This augmentation is correlated with an increase of HSC with peroxynitrites. Those peroxynitrites are extremely cytotoxic oxidants that are the results of a reaction between NO and superoxide anions. Their cytotoxicity has been defined to be due to (i) an inactivation of SOD enzymes (Alvarez et al., 2004; MacMillan-Crow and Thompson, 1999; Yamakura et al., 2001), (ii) an induction of DNA damage (Niles et al., 2006) and (iii) a disturbance in mitochondria function leading to secondary ROS formation (Radi et al., 2002). Taken together, all those effects could participate to the iROS elevation and to the higher apoptosis observed in irradiated WT mice.

This deleterious effect of CD169⁺ macrophages seems to be linked to the radio-induced oxidative stress as a NAC treatment to mice diminished both NO production by macrophages and peroxynitrite augmentation in LT-HSC, restoring partially the HSC number 21 days after irradiation.

The use of 1400W, a specific iNOS inhibitor, led to a diminution of NO production and allowed us to show a decrease in the proportion of apoptotic LT-HSC and a restoration of their number. Those experiments confirm the role of NO in radio-induced cell death of LT-HSC. As 1400W has previously been shown to increase survival and to suppress tumoral growth in lung and breast cancer (Xu et al., 2020), its use seems to be promising for radiotherapy as it could allow to treat tumor while preserving LT-HSC. At the opposite, the use of SIN-1, a NO donor, led to a more pronounced decrease of the LT-HSC number after irradiation. This potentiation of irradiation effect in decreasing LT-HSC pool could become an interesting new tool for reduced intensity-conditioning regimens used in medical myeloablation (Wong et al., 2018).

Our results demonstrate for the first time a deleterious role of resident macrophages in HSC response to irradiation. This deleterious effect seems to be partly linked to the production of NO by resident macrophages as inhibition of iNOS restore a complete pool of LT-HSC after a 2 Gy TBI. This work allows a better understanding of the HSC niche response to a radio-induced oxidative stress and support NO modulation as an interesting tool to improve some radiotherapeutic protocols.

Material and Methods

Mice

All experiments were performed on 8 to 12-week-old male mice with a C57BL/6 background. Mice were bred in our animal facility or purchased from Janvier laboratory (CD45.2⁺ C57BL/6JRj mice) or from Charles River laboratory (CD45.1⁺ C57BL/6-Ly5.1 mice).

CD169-DTR homozygous mice (CD169^{DTR/DTR}, No. RBRC04395) were purchased from RIKEN BRC through the National Bio-Resource Project of the MEXT/AMED, Japan (Miyake et al., 2007; Saito et al., 2001). CD169-DTR heterozygous mice (CD169^{DTR/+}) were obtained by crossing CD169^{DTR/DTR} with C57BL/6JRj mice.

Experimental procedures were performed in accordance with the European Community Council Directive (EC/2010/63) and were approved by our ethic committee (APAFIS#18486-2019011514438518v1). All mice were housed in our specific-pathogen-free-animal facility (registration number C9203202) at the CEA of Fontenay-aux-Roses and handled in compliance with the institutional guidelines and French Ministry of Agriculture's regulations.

Macrophage depletion

Chemical model: Clodronate-liposomes and PBS-liposomes (control) were purchased from LIPOSOMA. C57BL/6 mice were previously anesthetized with isoflurane before an intravenous retro-orbital injection. Clodronate-liposomes (200 µl) or PBS-liposomes (200 µl) were twice injected at 40 and 16 hours before irradiation.

Genetic model: CD169^{DTR/+} and control C57BL/6 mice were injected intraperitoneally with 10 µg/Kg of Diphtheria Toxin (DT, Sigma-Aldrich #D0564) 72h before irradiation.

Mice Irradiation

Irradiations were performed on a GSR D1 irradiator from GSM Company. It is a self-shielded irradiator with four sources of ¹³⁷Cesium with a total activity around 180.28 TBq (in March 2014) and which emits gamma rays. Mice were total body irradiated (TBI) at 2 or 9.5 Gy with a dose output of 1.04 Gy/min taking the radioactive decrease into account. Mice were irradiated in specific box designed solely for irradiation. Prior to irradiation, dosimetry was performed with this box. A cylindrical ionizing chamber 31010 by PTW was used as the recommendation of the AAPM'S TG-61. This ionizing chamber has a cavity of 0.125 cm³ calibrated in ¹³⁷ Cesium dose water at the PTB reference facility number 1904443. The polarity and the ion recombination were measured for this ¹³⁷Cesium source. Each measurement was corrected by the KTP factor to take the variation of temperature and atmospheric pressure into account.

For the one leg irradiation experiment, mice were first anesthetized with 150 µl of a solution containing 1.2 mg/ml of Ketamine and 4.4 µg/ml of Domitor. They were then placed in a lead box with holes, in order to place one leg on the irradiation field and irradiated at 2 Gy with a dose output of 1.04 Gy/min, taking the radioactive decrease into account. Awakening of the mice was performed through a 150 µl injection of a 38 µg/ml solution of Antisedant. As for TBI, dosimetry was performed prior irradiation (as described before).

Mice treatment

N-Acetyl-L-Cysteine (NAC, Sigma-Aldrich #A7250) treatment was performed through three intraperitoneal injections with a dose of 150 mg/kg per injection per mice. Injections were performed the day prior irradiation, 2h before irradiation and 1h post-irradiation. From the first injection, up to the animal sacrifice, 2g/L of NAC was added to their drinking water.

1400W dihydrochloride (1400W, Sigma-Aldrich #W4262) treatment was performed through three or four intraperitoneal injections with a dose of 0.3 mg per mice per injection. Injections were performed 30 min before irradiation, 1h30 post-irradiation, 4h30 post-irradiation and 11h post-irradiation for the 4th injection.

The NO donor 3-Morpholinosydnonimine hydrochloride (SIN-1, Enzo Life Sciences #BML-CN245) treatment was performed through four intraperitoneal injections with a final dose of 0.1 mg per mice per injection. Injections were performed 10 min, 11h, 24h and 48h post-irradiation.

Transplantations

For long-term reconstitution assay, CD45.1 recipient mice were lethally irradiated at a single dose of 9.5 Gy and transplanted with 3 million bone marrow cells, harvested 5 months after a 2 Gy TBI of CD45.2 wild-type or CD169^{DTR/+} mice. Mice were anesthetized with isoflurane and cells were injected through an intravenous retro-orbital injection. TRISULMIX[®] was added to the drinking water during 1 month to prevent infections. A body condition scoring was performed during 15 days post-irradiation.

Flow Cytometry

Flow cytometry analysis was performed with a BD FACSLSR11[™] flow cytometer (BD Biosciences) or with a FACSCANTO II flow cytometer (BD Biosciences).

Bone marrow cells were flushed out from the femurs, tibias and pelvis using a syringe filled with PBS (DPBS). Red blood cells were lysed for 10 min with an ammonium chloride solution (STEMCELL[™], #07850) and bone marrow cells were filtered through a 70µm-cell strainer.

For characterization of LT-HSC, bone marrow cells were stained for 15 minutes at 4°C with the following antibody panel: lineage cell detection cocktail antibody, biotin-conjugated

(Miltenyi Biotec, #130-092-613), APC/Cyanine7-conjugated anti-CD117 (c-kit) (clone 2B8, Biolegend), PercP-Cyanine 5.5-conjugated anti-Ly-6A/E (Sca-1) (clone D7, eBioscience), Brilliant Violet 421TM-conjugated anti-CD135 (Flk2) (clone A2F10, Biolegend), APC-conjugated anti-CD48 (clone HM48-1, Biolegend), FITC-conjugated anti-CD150 (clone 9D1, eBioscience), R-PE-conjugated anti-CD82 (Purified Rabbit Polyclonal anti-CD82 from Biorbyt #orb36411 was labeled with the Lightning-link R-PE antibody from Novus Biologicals #703-0015 according to the manufacturer's protocol). Biotin was then revealed with a streptavidin-BUV395 antibody (BD Biosciences) during 5 minutes at 4°C.

For the LT-HSC, ST-HSC, MPP2 and MPP3 chimerism analysis in transplanted mice experiment, PE/Cy7-conjugated anti-CD45.2 (clone 104, Biolegend) was added to the mix.

For cell cycle analysis in LT-HSC, bone marrow cells were first stained for 15 minutes at 4°C with a lineage cell detection cocktail antibody, biotin conjugated (Miltenyi Biotec), PercP-Cyanine 5.5-conjugated anti-Ly-6A/E (Sca-1) (clone D7, eBioscience), APC/Cyanine7-conjugated anti-CD117 (c-kit) (clone 2B8, Biolegend), APC-conjugated anti-CD150 (clone 9D1, eBioscience), PE/Cy7-conjugated anti-CD48 (clone HM48-1, Biolegend) and a R-PE-conjugated anti-CD82 (prepared as described before). Biotin was then revealed with a streptavidin-BD HorizonTM PE-CF594 antibody (BD Biosciences) for 5 minutes at 4°C. To analyze the chimerism in cycling LT-HSC in transplantation experiments, PE-conjugated anti-CD45.2 (clone A20, eBioscience) was added to the mix.

Cells were then permeabilized according to manufacturer's protocol (BD Cytofix/Cytoperm, BD Bioscience), incubated with FITC-conjugated Ki-67 (clone SolA15, eBioscience) for 30 min at 4°C and then with 2.5 µg/ml Hoechst 33258 solution (Sigma-Aldrich).

For characterization of macrophages, bone marrow cells were first incubated for 15 minutes at RT with an anti-mouse CD16/32 monoclonal antibody (Fc block) (clone 93, eBioscience) and then stained for 15 minutes at 4°C with APC/Cyanine7-conjugated anti-Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) (clone RB6-8C5, Biolegend), Biotin-conjugated anti-CD115 (CSF-1R) (clone AFS98, Biolegend), Pacific Blue-conjugated anti-F4/80 (clone BM8, Biolegend), FITC-conjugated anti-CD169 (clone 3D6.112, Bio-Rad) and APC-conjugated anti-m/r DARC (R&D system). Biotin was then revealed with a streptavidin-BUV395 antibody (BD Biosciences) for 5 minutes at 4°C.

For characterization of cells from the hematopoietic niche, two sets of femur/tibia/pelvis were harvested and cleaned using scissors to remove surrounding muscle and connective tissue. Bone marrow was flushed with 5 mL of medium (Dulbecco's modified Eagle's medium GlutaMAXTM, 10 mM HEPES, 10% FBS) using a 26G syringe. Remaining pieces of bones were carefully cut into small-sized fragments (1 mm) and mixed with flushed bone marrow in

a 6-well plate. After homogenization using a 1 mL pipette, enzymatic digestion was performed by incubation in DNase I (0.2 mg/mL, Sigma-Aldrich #D4513) and Collagenase Type 2 (0.04 g/mL, Worthington) at 37 °C for 45 min under gentle agitation (60 rpm). Digestion was stopped with 5 ml cold DPBS w/o calcium, magnesium containing 10% FBS. Cells were then filtered through a 100 µm cell strainer and red blood cells were lysed with ammonium chloride. After washing with DPBS, cells were blocked for 15 min using an anti-mouse CD16/32 monoclonal antibody (Fc block) (clone 93, eBioscience) and stained for 30 min at 4°C with different cocktails of antibodies. Cells were then washed twice with DPBS, re-suspended in PBS containing Hoechst 33258 (0.5 µg/ml) and analyzed on a BD CANTO II cytometer. Mesenchymal Stem cells (MSC) and Endothelial cells (EC) were analyzed with the following mix: FITC-conjugated anti-CD45.2 (clone 104, Biolegend), FITC-conjugated anti-TER-119, PercP-Cyanine 5.5 conjugated anti-Ly-6A/E (Sca-1) (clone D7, eBioscience), PE-conjugated anti-CD31 (clone 390, Biolegend), APC-conjugated anti-CD140b (clone APB5, eBioscience) and PE/Cy7-conjugated anti-CD105 (clone MJ7/18, Biolegend) (Helbling et al., 2019). Osteoblasts were discriminated with the following mix: FITC-conjugated anti-CD45.2 (clone 104, Biolegend), PercP-Cyanine 5.5 conjugated anti-Ly-6A/E (Sca-1) (clone D7, eBioscience), APC-conjugated anti-CD31 (clone 390, Biolegend), PE-conjugated anti-CD51 (clone RMV7, Biolegend) and a lineage cell detection cocktail antibody, biotin conjugated (Miltenyi Biotec). Biotin was revealed with a streptavidin-PE/Cy7 antibody for 5 minutes at 4°C (Thermo Fisher Scientific).

Measurement of intracellular ROS and apoptosis

For iROS and apoptosis measurement in LT-HSC, bone marrow cells were first stained for 15 minutes at 4°C with a lineage cell detection cocktail antibody, biotin conjugated (Miltenyi Biotec), PercP-Cyanine 5.5-conjugated anti-Ly-6A/E (Sca-1) (clone D7, eBioscience), APC/Cyanine7-conjugated anti-CD117 (c-kit) (clone 2B8, Biolegend), Brilliant Violet 421™-conjugated anti-CD135 (Flk2) (clone A2F10, Biolegend), PE/Cy7-conjugated anti-CD48 (clone HM48-1, Biolegend), PE-conjugated anti-CD150 (clone 9D1, eBioscience). Biotin was then revealed with a streptavidin-BUV395 antibody (BD Biosciences) for 5 minutes at 4°C.

Cells were then re-suspended in DPBS (1X), calcium and magnesium (Gibco) supplemented with 5% Bovine Serum Albumine (Sigma-Aldrich) and incubated with the molecular probe™ CellROX™ Deep Red (Invitrogen) (5 µM final, 30 minutes at 37°C). Cells were washed twice with DPBS w/o calcium and magnesium (Gibco) and the CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent was added (1/1000) for 40 min at RT. Samples were then placed on ice until FACS analysis.

For iROS and apoptosis measurement in LT-HSC expressing CD82, the antibody mix was modified using Pacific Blue-conjugated anti-Ly-6A/E (Sca-1) (clone E13-161.7, Biolegend),

Percp/Cyanine 5.5 anti-CD150 (TC15-12F12.2, Biolegend) and a R-PE-conjugated anti-CD82 (prepared as described before). Brilliant Violet 421TM-conjugated anti-CD135 (Flk2) was removed from the panel.

Measurement of intracellular iNOS and NO in macrophages

Bone marrow cells were first incubated for 15 minutes at RT with an anti-mouse CD16/32 monoclonal antibody (Fc block) (clone 93, eBioscience).

For iNOS measurement cells were stained for 15 minutes at 4°C with APC-conjugated anti-Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) (clone RB6-8C5, Biolegend, PE-conjugated anti-CD115 (CSF-1R) (clone AFS98, Biolegend), Pacific Blue-conjugated anti-F4/80 (clone BM8, Biolegend), FITC-conjugated anti-CD169 (clone 3D6.112, Bio-Rad). Cells were then permeabilized according to the manufacturer's protocol (BD Cytofix/Cytoperm, BD Bioscience) and incubated with PE/Cy7-conjugated iNOS (CXNFT, eBioscience) for 45 min at 4°C.

For NO measurement, cells were stained for 15 minutes at 4°C with APC/Cyanine7-conjugated anti-Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) (clone RB6-8C5, Biolegend), Biotin-conjugated anti-CD115 (CSF-1R) (clone AFS98, Biolegend), Pacific Blue-conjugated anti-F4/80 (clone BM8, Biolegend) and FITC-conjugated anti-CD169 (clone 3D6.112, Bio-Rad). Biotin was then revealed with a streptavidin-BUV395 antibody for 5 minutes at 4°C. (BD Biosciences).

Cells were then re-suspended in HBSS and incubated for 45 min at 37°C with DAX-J2TM Red reagent (AAT Bioquest) (10 µM final). Samples were then placed on ice until FACS analysis.

Measurement of peroxynitrites in LT-HSC

Bone marrow cells were stained for 15 minutes at 4°C with a lineage cell detection cocktail antibody, biotin conjugated (Miltenyi Biotec), APC/Cyanine7-conjugated anti-CD117 (c-kit) (clone 2B8, Biolegend), PercP-Cyanine 5.5-conjugated anti-Ly-6A/E (Sca-1) (clone D7, eBioscience), Brilliant Violet 421TM-conjugated anti-CD135 (Flk2) (clone A2F10, Biolegend), PE/Cy7-conjugated anti-CD48 (clone HM48-1, Biolegend), APC-conjugated anti-CD150 (clone 9D1, eBioscience) and R-PE-conjugated anti-CD82. Biotin was then revealed with a streptavidin-BUV395 antibody (BD Biosciences) for 5 minutes at 4°C.

Cells were then incubated with DAX-J2TM PON Green reagent for 1h at 37°C (AAT Bioquest) (1/400 final). Samples were then placed on ice until FACS analysis.

Cytogenetic analysis (M-FISH)

For LSK sorting, bone marrow cells were stained for 15 minutes at 4°C with a lineage cell detection cocktail antibody, biotin conjugated (Miltenyi Biotec), PE-conjugated anti-Ly-6A/E (Sca-1) (clone E13.161.7, BD Biosciences), APC-conjugated anti-CD117 (c-kit) (clone 2B8, Biolegend). Biotin was then revealed with a streptavidin-eFluor 450 antibody (ThermoFisher

Scientific) for 5 minutes at 4°C. LSK were sorted with a BD Influx™ Cell Sorter (BD Biosciences).

After plating in 6-well plates (5×10^2 cells per well in triplicate per mice), LSK were cultured at 33°C with 5% CO₂ for 6 days in a StemSpan™ serum-free medium (STEMCELL Technologies) supplemented with mouse IL11 (100 ng/ml) (STEMCELL Technologies), mouse Flt3L (100 ng/ml) (STEMCELL Technologies), mouse SCF (50 ng/ml) (Miltenyi Biotech) and 1% Penicillin-Streptomycin (ThermoFisher Scientific). Cells were then incubated for 3h with 10 µg/ml colchicine (Sigma), harvested and incubated for 15 min at 37°C in a mixed solution (v/v) of 75 mM KCl and 30% FCS solution previously diluted 1/6 in water. Cells were fixed in ethanol/acetic acid (3:1 v/v) and spread on cold humidified slides. Hybridization with the 21X-Cyte Mouse Multicolor FISH Probe Kit (MetaSystems) was performed following manufacturer's instructions. Briefly, chromosomes were denatured by incubating slides in a basic solution of 0.07 N sodium hydroxide (NaOH) at room temperature, washed in several solutions of a salt sodium citrate solution (SSC) prepared at a 1/200 and 1/10 dilution and dehydrated with increasing concentrations of ethanol. Meanwhile, probe mix was denatured for 5 min at 75°C, 1 min on ice and 30 min at 37°C. Slides were then hybridized in a humidified chamber containing formamide at 37°C for 72 h, washed with SSC, counterstained with DAPI and mounted with Fluoromount-G®. Metaphases were finally visualized and captured using an Axio Imager microscope Zeiss driven by MetaSystems hardware. Cytogenetic analysis was performed using the ISIS software (MetaSystems). At least, 50 metaphase spreads were analyzed for each experimental point.

Statistical analysis

All statistical analysis was performed using Prism 8 (GraphPad Software). Two-tailed Mann-Whitney *U* test was used to evaluate the statistical significance between two groups. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Acknowledgments

The authors thank J. Baijer and N. Dechamps for their technical assistance in cell sorting and V. Neuville and Animalliance for taking care of mice. Thanks to our institute veterinary Silvia Vincent-Naulleau and to V. Mesnard for her technical assistance with irradiation. The authors thank also Dr Kenji Kohno and Dr Masato Tanaka for acceptance of the use of CD169^{DTR/DTR} mice.

Fundings

This study was supported by grants from INSERM and CEA (Radiobiology segment). MC is a PhD fellow from CEA, *via* the IRTELIS program. The 4th year of MC thesis was funded by the Medical Research Foundation (FRM).

Figure legends

Figure 1.

Clodronate-treated mice display a normal LT-HSC number long-term post a 2 Gy total body γ -irradiation. (A) Above: Experimental protocol is depicted. C57BL/6 mice were injected intravenously with either clodronate-liposomes or PBS-liposomes (as a control) 40 h before a 2 Gy TBI. Below: LT-HSC number and proportions of apoptotic and cycling LT-HSC were analyzed 1 day after TBI ($n \geq 3$ independent experiments). (B) LT-HSC number ($n = 3$ independent experiments) and proportion of apoptotic LT-HSC ($n = 2$ independent experiments) were analyzed 5 months after TBI. (C) Bone marrow niche was studied in CLO-lipo treated mice and compared to wild-type and PBS-lipo treated mice ($n = 4$ independent experiments). (D) Bone marrow niche was compared in CLO-lipo and PBS-lipo treated mice 1 day after a 2 Gy TBI ($n = 3$ independent experiments). Data in A and B represent means \pm SEM. Data in C and D are represented with Min to Max box-and-whisker. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ (two-tailed Mann-Whitney U test).

Figure 2.

Specific depletion of CD169⁺ M Φ in CD169^{DTR/+} mice allows a rapid and complete recovery of functional LT-HSC after a 2 Gy total body γ -irradiation. (A) Above: Experimental protocol is depicted. Wild-type C57BL/6 mice and CD169^{DTR/+} mice were injected intraperitoneally with diphtheria toxin 72 h before a 2 Gy TBI. Total LT-HSC number and proportions of apoptotic LT-HSC were analyzed following a kinetic after TBI ($n \geq 3$ independent experiments for each time point). Below: proportion of LT-HSC in S-G2-M was analyzed 1 day post-TBI in total bone marrow from WT and CD169^{DTR/+} mice. (B) Bone marrow niche was compared in wild-type and CD169^{DTR/+} mice 72h after injection of diphtheria toxin ($n = 4$ independent experiments). (C) Bone marrow niche was compared in wild-type and CD169^{DTR/+} mice 1 day after a 2 Gy TBI ($n = 3$ independent experiments). (D) Number of CD169⁺ M Φ expressing DARC and number of LT-HSC expressing the CD82 marker were compared in wild-type and CD169^{DTR/+} non-irradiated mice 72h after DT injection. (E) Numbers of CD82⁺ LT-HSC and CD82^{neg} LT-HSC were analyzed following a kinetic after TBI ($n \geq 3$ independent experiments for each time point). (F) Numbers of total LT-HSC, CD82^{neg} LT-HSC and CD82⁺ LT-HSC ($n = 4$ independent experiments) were analyzed 5 months after TBI. (G) Left: Experimental protocol for engraftment of bone marrow, harvested 5 months post-TBI from wild-type or CD169^{DTR/+} mice, is depicted. Right: donor LT-HSC and ST-HSC numbers were measured 5 months after engraftment. Data in A, D, E and F represent means \pm SEM. Data in

B, C and G are represented with Min to Max box-and-whisker. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001 (two-tailed Mann-Whitney U test).

Figure 3.

LT-HSC recovery in CD169^{DTR/+} mice after a 2 Gy TBI is associated with the absence of iROS. Depletion of CD169⁺ MΦ after the first wave of iROS does not allow a preservation of the LT-HSC pool after TBI. (A) Above: Proportions of LT-HSC with intracellular iROS were analyzed in wild-type and CD169^{DTR/+} mice following a kinetic after TBI (n ≥ 3 mice for each time point). Below: Number of iROS⁺ LT-HSC expressing or not the CD82 marker was analyzed 1 and 10 days post-TBI in wild-type mice. (B) Wild-type C57BL/6 mice and CD169^{DTR/+} mice were injected intraperitoneally with diphtheria toxin 72 h before or 4 days after a 2 Gy TBI. Proportions of iROS⁺ or apoptotic LT-HSC and LT-HSC number were analyzed 10 days after TBI (n = 2 independent experiments). (C) Above: Experimental protocol is depicted. WT and DT-treated CD169^{DTR/+} mice were injected intraperitoneally with N-acetyl-L-cysteine (NAC) 1 day and 2 h before and 1 h after a 2 Gy TBI. NAC was added to the drinking water up to mouse sacrifice for analysis. Middle: LT-HSC number and proportions of iROS⁺ and apoptotic LT-HSC were analyzed 1 day post-TBI in wild-type and CD169^{DTR/+} mice treated or not with NAC. Below: LT-HSC number was analyzed 3 weeks post-TBI in wild-type and CD169^{DTR/+} mice treated or not with NAC. Data represent means ± SEM. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001 (two-tailed Mann-Whitney U test).

Figure 4.

A 2 Gy TBI of wild-type mice leads to an increased production of nitric oxide by CD169⁺ MΦ and of peroxynitrites by LT-HSC. (A) Left: iNOS expression was compared between CD169⁺ MΦ expressing iNOS and CD169^{neg} MΦ at 1 day post-TBI in wild-type mice. Right: Relative integrated median fluorescence intensity (iMFI) of iNOS was measured in wild-type CD169⁺ MΦ 1 day post-TBI (n = 3 independent experiments). (B) Proportion of CD169^{neg} MΦ producing nitric oxide (NO) was measured through time after irradiation and compared in wild-type (left) and CD169^{DTR/+} mice (middle). Proportion of CD169⁺ MΦ producing nitric oxide (NO) was measured through time after irradiation in wild-type mice (right) (n ≥ 3 mice for each time point). A representative flow analysis of NO expression in CD169⁺ versus CD169^{neg} MΦ 1 day post-TBI was depicted (left). (C) A scheme describing formation of peroxynitrites from ROS and NO production was depicted. (D) Above: Proportion of LT-HSC with peroxynitrites through time after irradiation was compared in wild-type mice (left) and in CD169^{DTR/+} mice (right). Below: Numbers of LT-HSC with peroxynitrites expressing or not the CD82 marker were analyzed 1 and 10 days post-TBI in wild-type mice. (E) Number of CD169⁺ MΦ producing NO

(left) and proportion of LT-HSC with peroxynitrites (right) were analyzed 1 day post-TBI in wild-type and CD169^{DTR/+} mice treated or not with N-acetyl-L-cysteine (NAC). Data in A (left), B, D and E represent means \pm SEM. Data in A (right) are represented with Min to Max box-and-whisker. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001 (two-tailed Mann-Whitney U test).

Figure 5.

Specific inhibition of iNOS allows a recovery of the LT-HSC pool in wild-type mice after TBI, whereas the use of a NO donor aggravates the loss of LT-HSC in wild-type C57BL/6 mice or induces a decrease of LT-HSC in CD169^{DTR/+} mice after TBI.

(A) Above: Experimental protocol is depicted. Wild-type C57BL/6 mice were injected 3 times intraperitoneally with 1400W 30 min before a 2 Gy TBI, 1h30 and 4h30 after TBI. Inhibition of NO production by CD169⁺ M Φ is validated. Below: Proportion of cycling LT-HSC were analyzed 1 day after TBI (n = 2 independent experiments for each time point). Number of LT-HSC was analyzed following 5h, 18h and 21 days after TBI (n = 3 independent experiments).

(B) Experimental protocol is depicted. Wild-type C57BL/6 mice were injected 4 times intraperitoneally with 1400W 30 min before a 2 Gy TBI, 1h30, 4h30 and 11h after TBI. Number of LT-HSC was analyzed 21 days after TBI.

(C) Above: Experimental protocol is depicted. Wild-type C57BL/6 mice and CD169^{DTR/+} mice were injected 4 times intraperitoneally with SIN-1 10 min, 11h, 24h and 48h after a 2 Gy TBI. Below: Number of LT-HSC was analyzed 21 days after TBI (n = 2 experiment). Data represent means \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001 (two-tailed Mann-Whitney U test).

Supplemental Figure legends

Figure S1.

Intravenous injection of clodronate-liposome (CLO-lipo) in mice depletes efficiently, but transiently bone marrow macrophages (MΦ). Above: Representative flow plots showing depletion of total and CD169⁺ macrophages in bone marrow 40h after CLO-lipo injection. Below: Kinetics of depletion and repopulation of CD169⁺ MΦ between 40h and 5 months after CLO-lipo injection. Data represent means ± SEM. **P<0.01, ***P<0.001 (two-tailed Mann-Whitney U test).

Figure S2.

Diphtheria toxin injection in CD169^{DTR/+} mice depletes specifically, but transiently CD169⁺ MΦ in bone marrow. Transplantation experiments show that bone marrow cells harvested 5 months after TBI in are functional to produce Multipotent progenitors. (A) Above: Representative flow plots showing depletion of bone marrow CD169⁺ MΦ in CD169^{DTR/+} mice compared to wild-type mice 72h after intraperitoneal diphtheria toxin (DT) injection. Below: Kinetics of depletion and repopulation of CD169⁺ MΦ between 72h and 5 months after DT injection. **(B)** Kinetics of bone marrow cell repopulation in irradiated wild-type and CD169^{DTR/+} mice. **(C)** Chromosomal rearrangements observed in LSK of wild-type and CD169^{DTR/+} mice 5 months post-TBI. **(D)** Above: BM cellularity and BM chimerism measured 5 months after transplantation of BM cells, harvested from irradiated or non-irradiated donor wild-type and CD169^{DTR/+} mice 5 months post-TBI, in conditioned CD45.1⁺ mice. Below: Number of donor MPP2 and MPP3 5 months after transplantation in conditioned CD45.1⁺ mice. Data in A, B and C represent means ± SEM. Data in D are represented with Min to Max box-and-whisker. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001 (two-tailed Mann-Whitney U test).

Figure S3.

CD169⁺ MΦ depletion was validated 10 days post-TBI when DT was injected after the first wave of ROS. Effect of a local 2 Gy irradiation on LT-HSC is comparable to that observed after TBI. (A) Left: Experimental protocol is depicted. Wild-type C57BL/6 mice and CD169^{DTR/+} mice were injected intraperitoneally with diphtheria toxin 4 days after a 2 Gy TBI. Right: Depletion of CD169⁺ macrophages was validated 10 days after TBI in DT-injected mice (n = 2 independent experiments). **(B)** Above: Experimental protocol is depicted. Wild-type C57BL/6 mice and CD169^{DTR/+} mice were injected intraperitoneally with diphtheria toxin 72 h before a 2 Gy irradiation of one leg. Contralateral leg was considered as non-irradiated control.

Below: LT-HSC number and proportions of iROS⁺ or apoptotic LT-HSC from the irradiated and non-irradiated legs were compared 1 day after irradiation (n = 2 independent experiments). Data in A and B (left panel) represent means \pm SEM. Data in B (middle and right panels) are represented with Min to Max box-and-whisker. *P<0.05, **P<0.01, ****P<0.0001 (two-tailed Mann-Whitney U test).

Figure 1

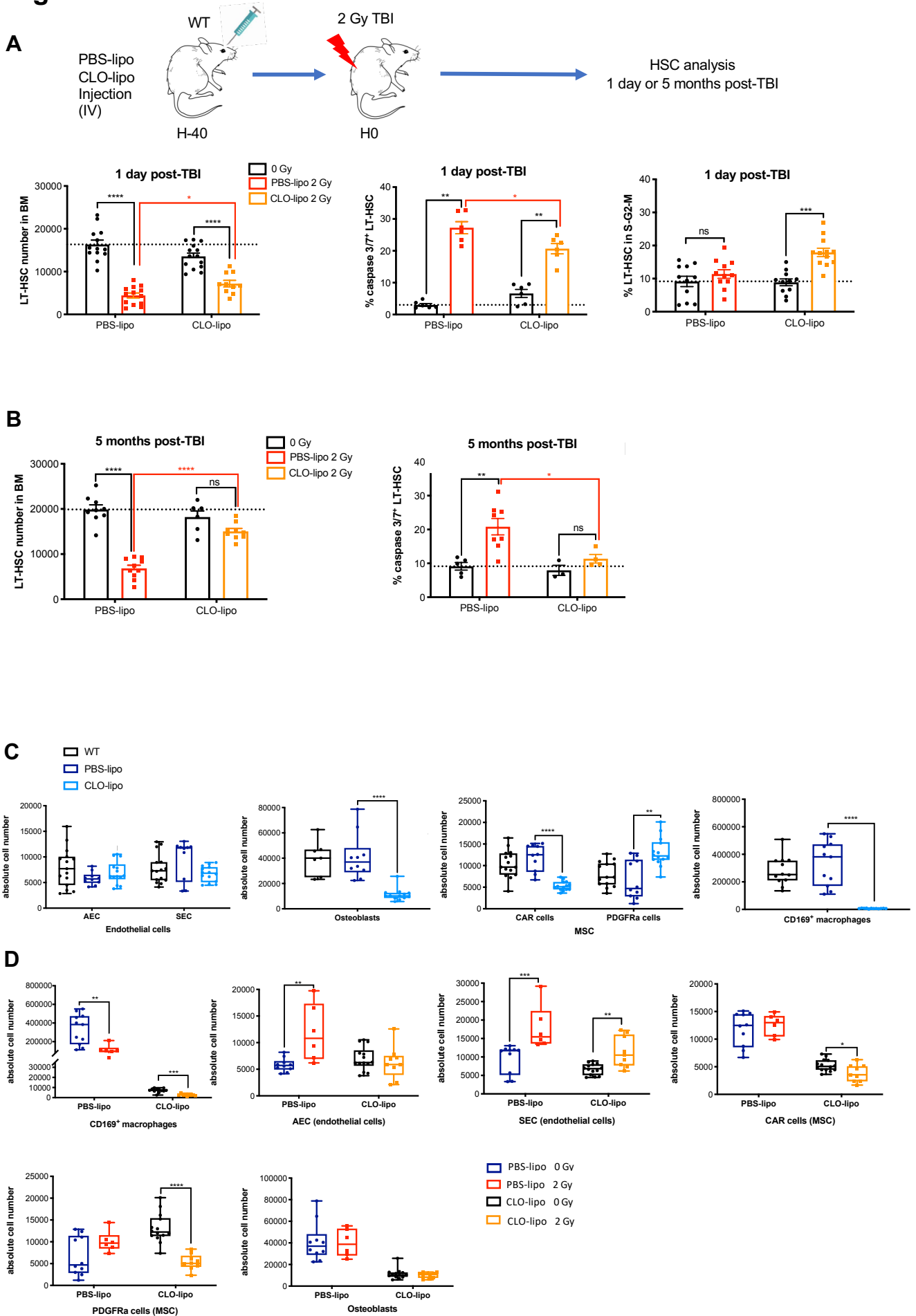


Figure 2

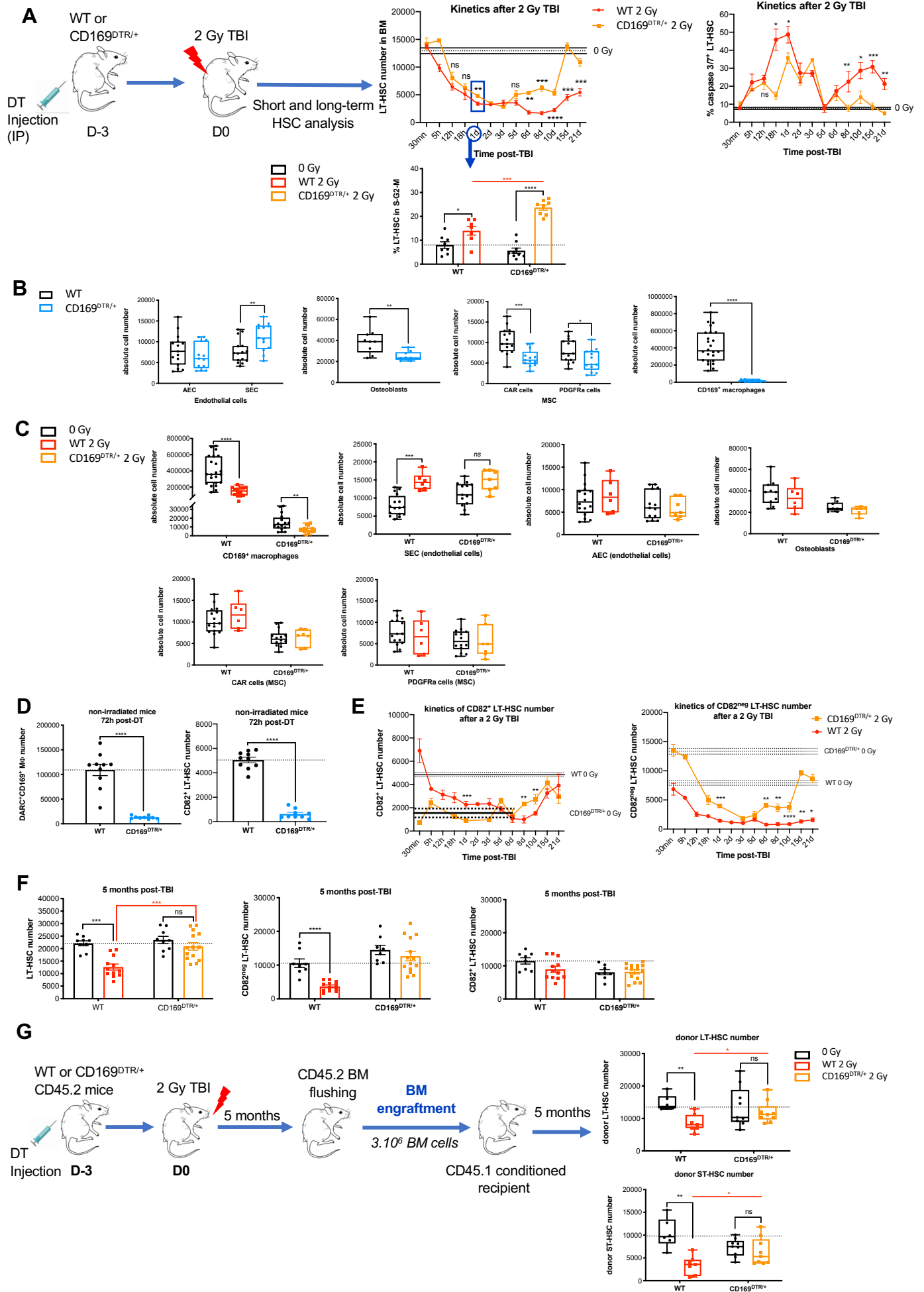


Figure 3

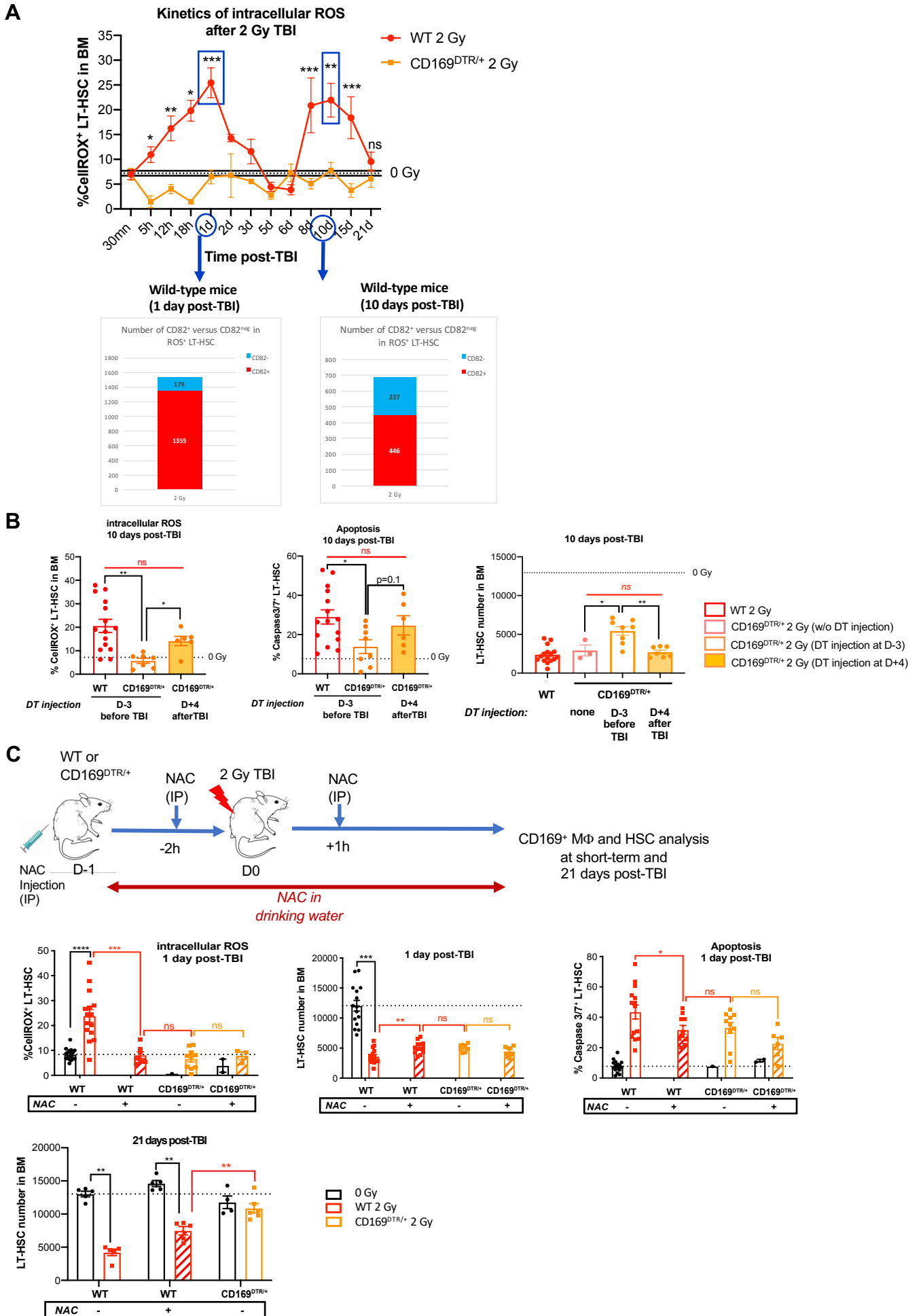


Figure 4

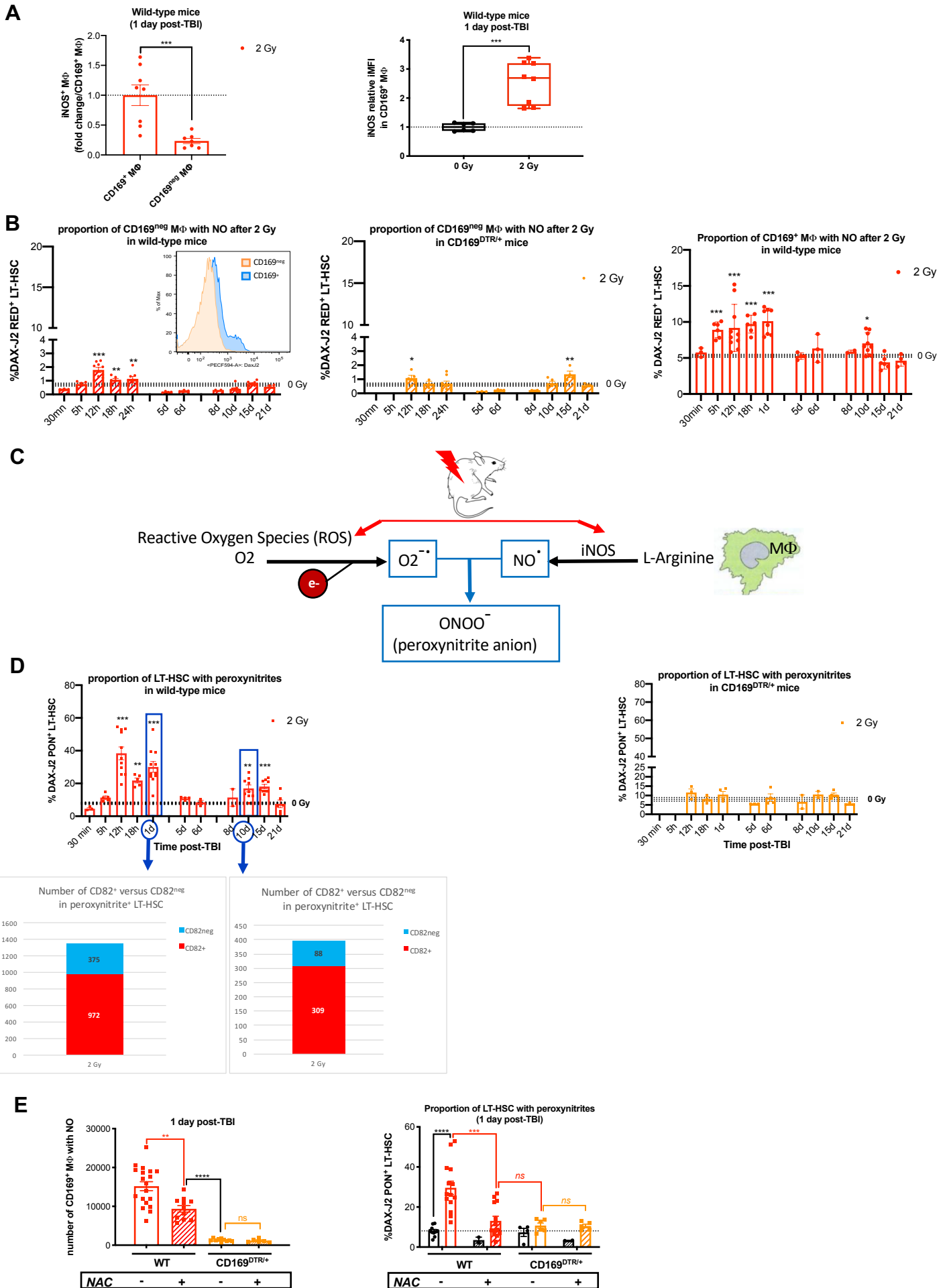
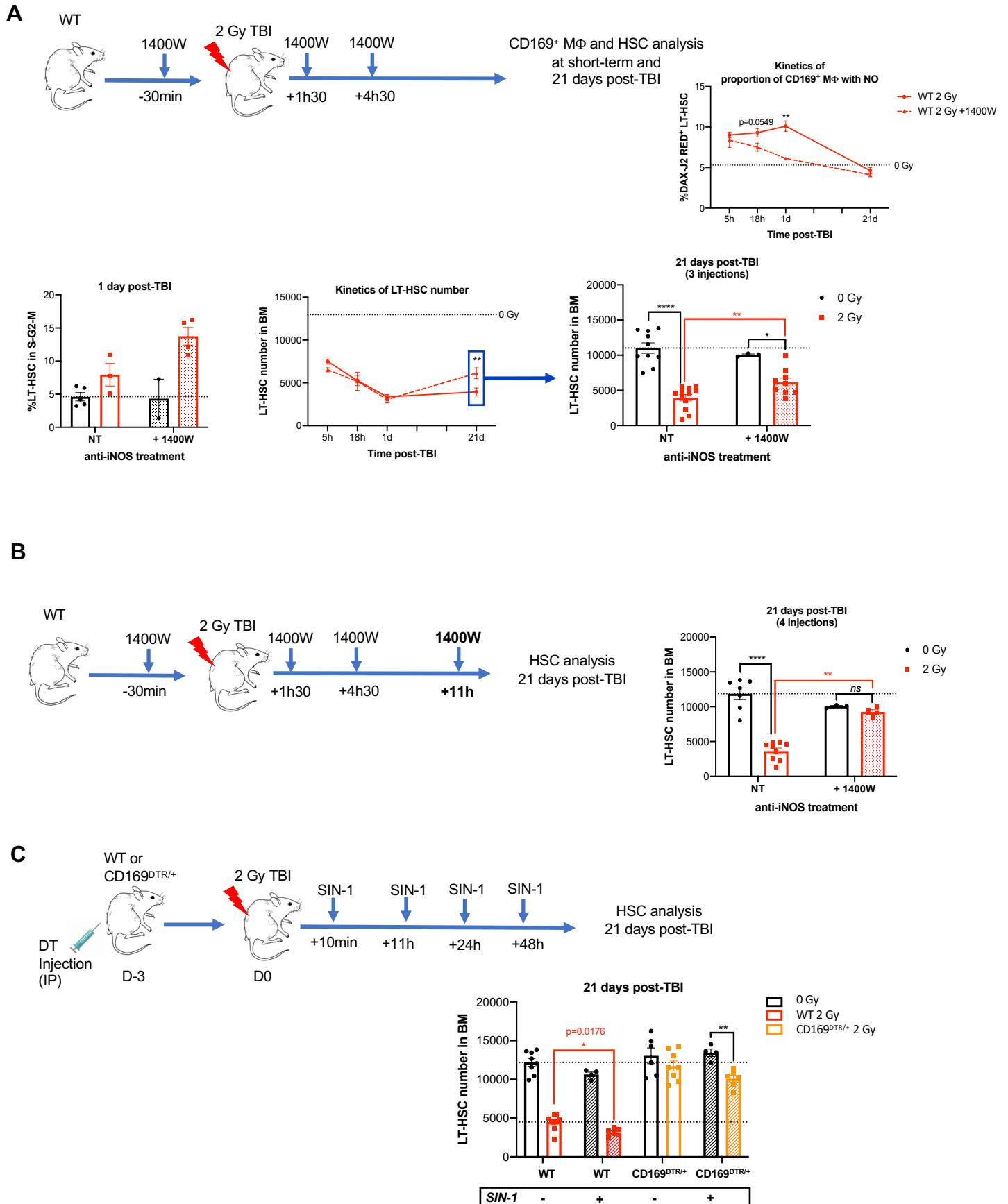
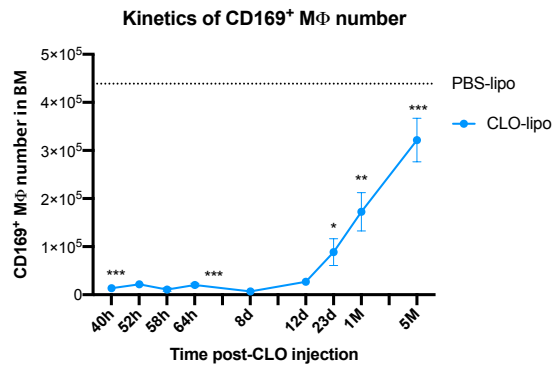
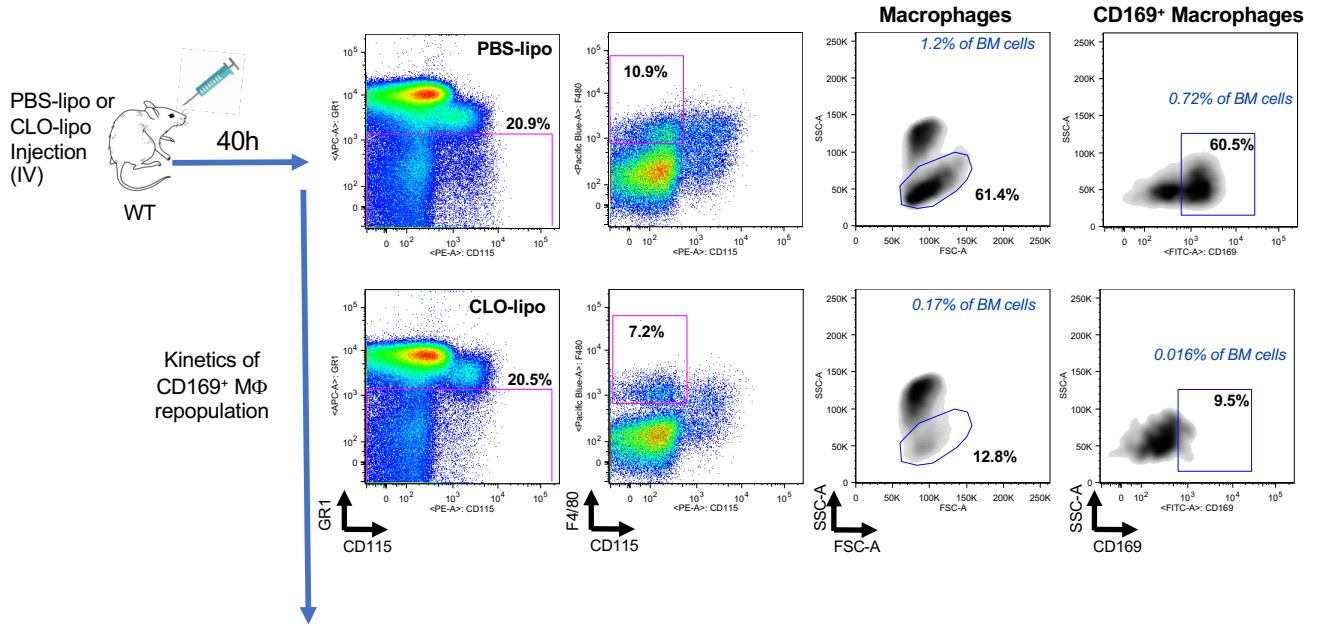


Figure 5

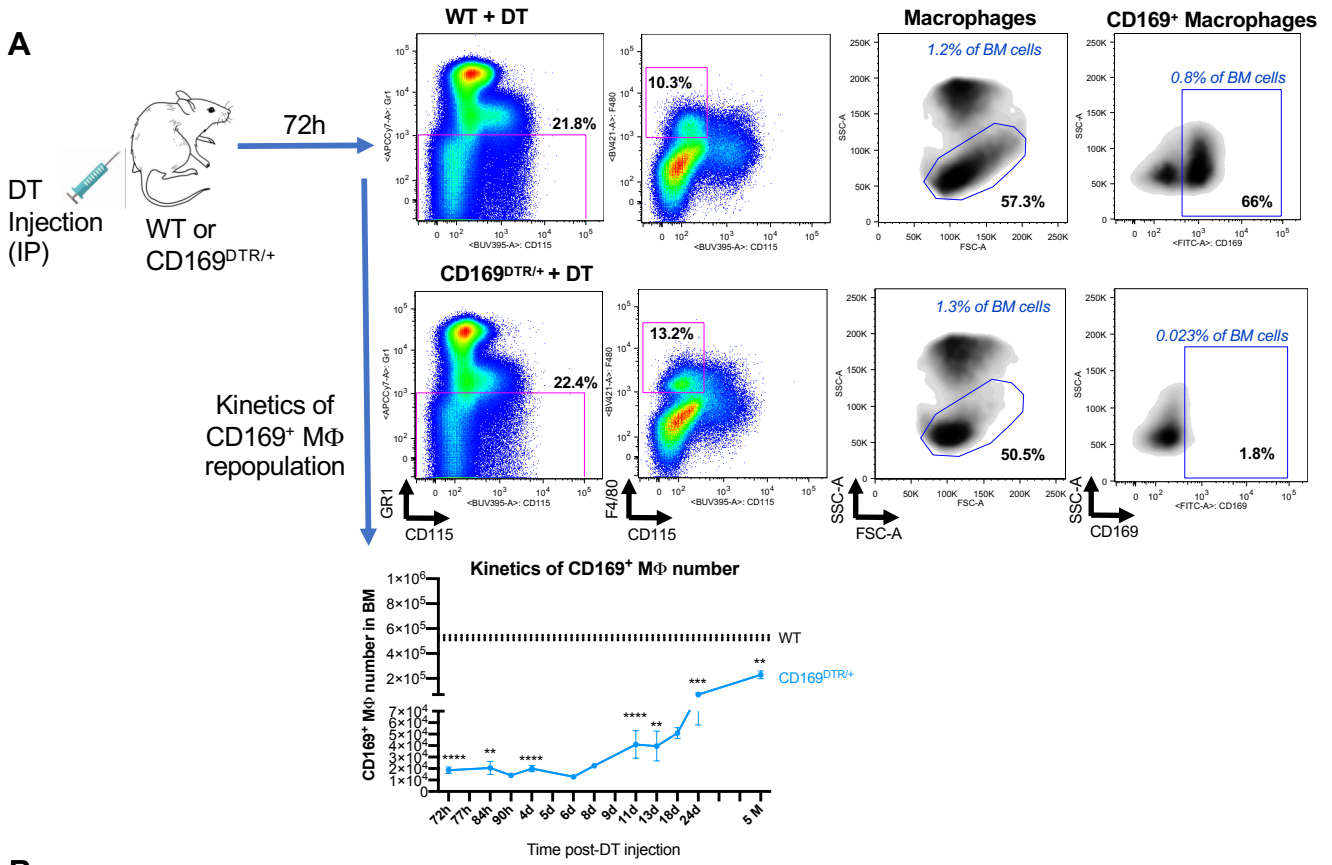


SUP Figure 1

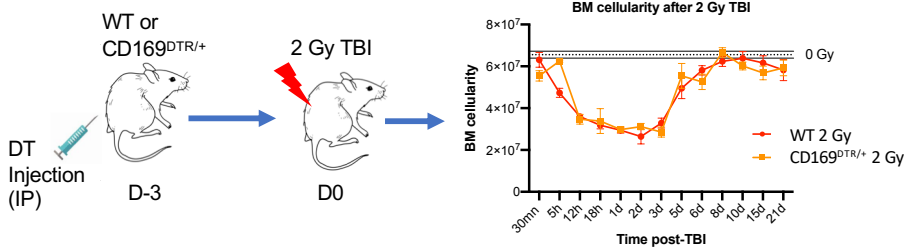


SUP Figure 2

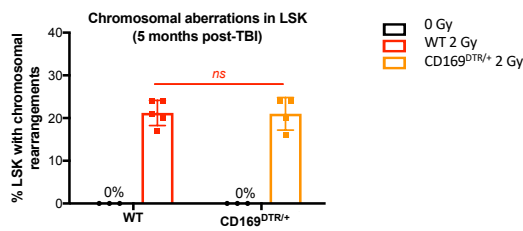
A



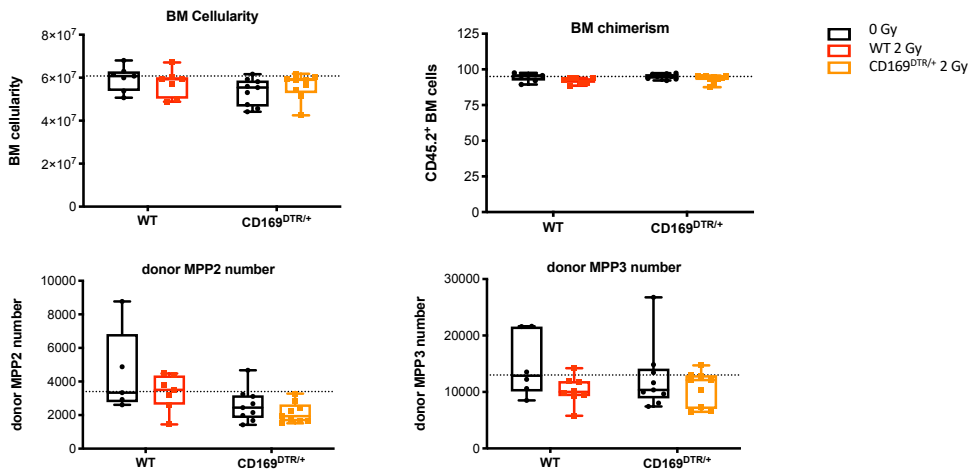
B



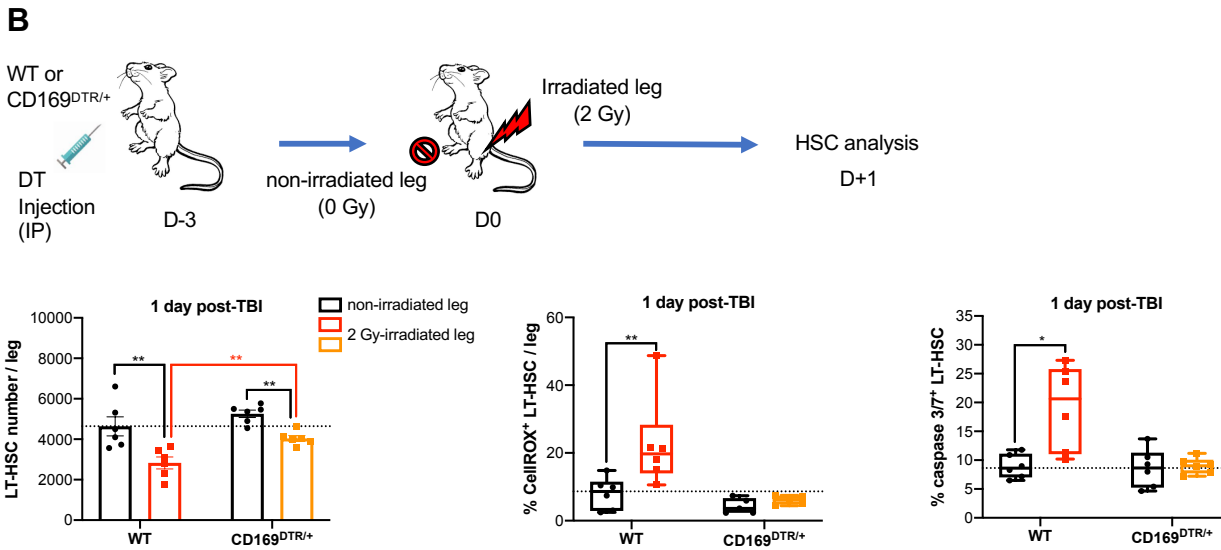
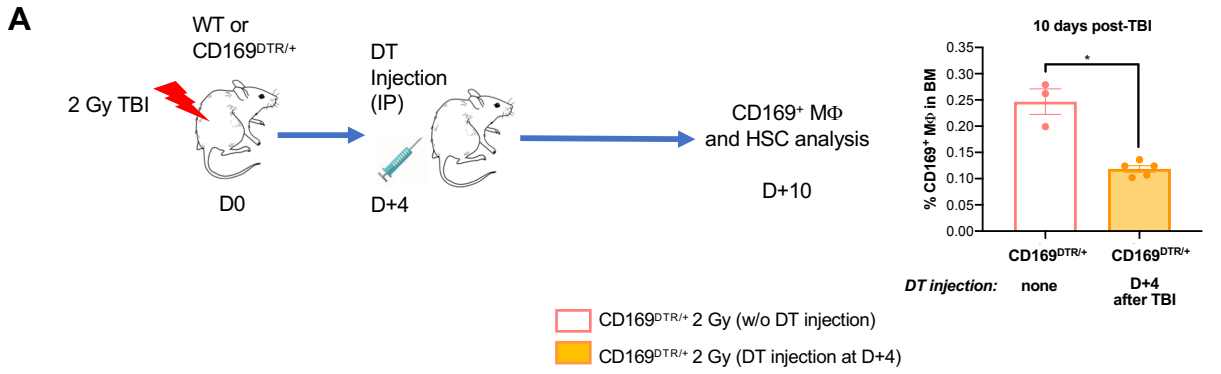
C



D



SUP Figure 3



References

- Alvarez, B., V. Demicheli, R. Durán, M. Trujillo, C. Cerveñansky, B.A. Freeman, and R. Radi. 2004. Inactivation of human Cu,Zn superoxide dismutase by peroxy nitrite and formation of histidinyl radical. *Free Radical Biology and Medicine*. 37:813–822. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.006.
- Asano, K., N. Takahashi, M. Ushiki, M. Monya, F. Aihara, E. Kuboki, S. Moriyama, M. Iida, H. Kitamura, C.-H. Qiu, T. Watanabe, and M. Tanaka. 2015. Intestinal CD169(+) macrophages initiate mucosal inflammation by secreting CCL8 that recruits inflammatory monocytes. *Nat Commun*. 6:7802. doi:10.1038/ncomms8802.
- Batoon, L., S.M. Millard, M.E. Wullschleger, C. Preda, A.C.-K. Wu, S. Kaur, H.-W. Tseng, D.A. Hume, J.-P. Levesque, L.J. Raggatt, and A.R. Pettit. 2019. CD169+ macrophages are critical for osteoblast maintenance and promote intramembranous and endochondral ossification during bone repair. *Biomaterials*. 196:51–66. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.10.033.
- Baxter, N.N., E.B. Habermann, J.E. Tepper, S.B. Durham, and B.A. Virnig. 2005. Risk of pelvic fractures in older women following pelvic irradiation. *JAMA*. 294:2587–2593. doi:10.1001/jama.294.20.2587.
- Caslin, H.L., M. Bhanot, W.R. Bolus, and A.H. Hasty. 2020. Adipose tissue macrophages: Unique polarization and bioenergetics in obesity. *Immunol Rev*. 295:101–113. doi:10.1111/imr.12853.
- Chow, A., D. Lucas, A. Hidalgo, S. Méndez-Ferrer, D. Hashimoto, C. Scheiermann, M. Battista, M. Leboeuf, C. Prophete, N. van Rooijen, M. Tanaka, M. Merad, and P.S. Frenette. 2011. 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. doi:10.1084/jem.20101688.
- Costa, S., and M.R. Reagan. 2019. Therapeutic Irradiation: Consequences for Bone and Bone Marrow Adipose Tissue. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 10. doi:10.3389/fendo.2019.00587.
- Döerr, W. 2009. Pathogenesis of normal-tissue side-effects. CRC Press.
- Ferenbach, D.A., T.A. Sheldrake, K. Dhaliwal, T.M.J. Kipari, L.P. Marson, D.C. Kluth, and J. Hughes. 2012. Macrophage/monocyte depletion by clodronate, but not diphtheria toxin, improves renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Kidney Int*. 82:928–933. doi:10.1038/ki.2012.207.
- Garvey, E.P., J.A. Oplinger, E.S. Furfine, R.J. Kiff, F. Laszlo, B.J. Whittle, and R.G. Knowles. 1997. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 272:4959–4963. doi:10.1074/jbc.272.8.4959.
- Green, D.E., and C.T. Rubin. 2014. Consequences of irradiation on bone and marrow phenotypes, and its relation to disruption of hematopoietic precursors. *Bone*. 63:87–94. doi:10.1016/j.bone.2014.02.018.
- Guo, C.-Y., L. Luo, Y. Urata, S. Goto, W.-J. Huang, S. Takamura, F. Hayashi, H. Doi, Y. Kitajima, Y. Ono, T. Ogi, and T.-S. Li. 2015. Sensitivity and dose dependency of radiation-induced injury in hematopoietic stem/progenitor cells in mice. *Sci Rep*. 5:8055. doi:10.1038/srep08055.

- Helbling, P.M., E. Piñeiro-Yáñez, R. Gerosa, S. Boettcher, F. Al-Shahrour, M.G. Manz, and C. Nombela-Arrieta. 2019. Global Transcriptomic Profiling of the Bone Marrow Stromal Microenvironment during Postnatal Development, Aging, and Inflammation. *Cell Rep.* 29:3313–3330.e4. doi:10.1016/j.celrep.2019.11.004.
- Hur, J., J.-I. Choi, H. Lee, P. Nham, T.-W. Kim, C.-W. Chae, J.-Y. Yun, J.-A. Kang, J. Kang, S.E. Lee, C.-H. Yoon, K. Boo, S. Ham, T.-Y. Roh, J.K. Jun, H. Lee, S.H. Baek, and H.-S. Kim. 2016. CD82/KAI1 Maintains the Dormancy of Long-Term Hematopoietic Stem Cells through Interaction with DARC-Expressing Macrophages. *Cell Stem Cell.* 18:508–521. doi:10.1016/j.stem.2016.01.013.
- Kaur, S., L.J. Raggatt, S.M. Millard, A.C. Wu, L. Batoon, R.N. Jacobsen, I.G. Winkler, K.P. MacDonald, A.C. Perkins, D.A. Hume, J.-P. Levesque, and A.R. Pettit. 2018. Self-repopulating recipient bone marrow resident macrophages promote long-term hematopoietic stem cell engraftment. *Blood.* 132:735–749. doi:10.1182/blood-2018-01-829663.
- Lin, H.-N., and J.P. O'Connor. 2017. Osteoclast depletion with clodronate liposomes delays fracture healing in mice: OSTEOCLAST DEPLETION IMPAIRS FRACTURE HEALING. *J. Orthop. Res.* 35:1699–1706. doi:10.1002/jor.23440.
- Ludin, A., T. Itkin, S. Gur-Cohen, A. Mildner, E. Shezen, K. Golan, O. Kollet, A. Kalinkovich, Z. Porat, G. D'Uva, A. Schajnovitz, E. Voronov, D.A. Brenner, R.N. Apte, S. Jung, and T. Lapidot. 2012. Monocytes-macrophages that express a-smooth muscle actin preserve primitive hematopoietic cells in the bone marrow. *nature immunology.* 13:13.
- MacMillan-Crow, L.A., and J.A. Thompson. 1999. Tyrosine Modifications and Inactivation of Active Site Manganese Superoxide Dismutase Mutant (Y34F) by Peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 366:82–88. doi:10.1006/abbi.1999.1202.
- Mendelson, A., and P.S. Frenette. 2014. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nat Med.* 20:833–846. doi:10.1038/nm.3647.
- Miyake, Y., K. Asano, H. Kaise, M. Uemura, M. Nakayama, and M. Tanaka. 2007. Critical role of macrophages in the marginal zone in the suppression of immune responses to apoptotic cell-associated antigens. *J Clin Invest.* 117:2268–2278. doi:10.1172/JCI31990.
- Mohrin, M., E. Bourke, D. Alexander, M.R. Warr, K. Barry-Holson, M.M. Le Beau, C.G. Morrison, and E. Passegué. 2010. Hematopoietic Stem Cell Quiescence Promotes Error-Prone DNA Repair and Mutagenesis. *Cell Stem Cell.* 7:174–185. doi:10.1016/j.stem.2010.06.014.
- Moreno, S.G. 2018. Depleting Macrophages In Vivo with Clodronate-Liposomes. *Methods Mol Biol.* 1784:259–262. doi:10.1007/978-1-4939-7837-3_23.
- Narang, H., and M. Krishna. 2005. Inhibition of radiation induced nitration by curcumin and nicotinamide in mouse macrophages. *Mol Cell Biochem.* 276:7–13. doi:10.1007/s11010-005-2241-y.
- Niles, J.C., J.S. Wishnok, and S.R. Tannenbaum. 2006. Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: Structures and mechanisms of product formation. *Nitric Oxide.* 14:109–121. doi:10.1016/j.niox.2005.11.001.
- Pacher, P., J.S. Beckman, and L. Liaudet. 2007. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews.* 87:315–424. doi:10.1152/physrev.00029.2006.

Radi, R., A. Cassina, R. Hodara, C. Quijano, and L. Castro. 2002. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*. 33:1451–1464. doi:10.1016/S0891-5849(02)01111-5.

Rodrigues-Moreira, S., S.G. Moreno, G. Ghinatti, D. Lewandowski, F. Hoffschir, F. Ferri, A.-S. Gallouet, D. Gay, H. Motohashi, M. Yamamoto, M.C. Joiner, N. Gault, and P.-H. Romeo. 2017. Low-Dose Irradiation Promotes Persistent Oxidative Stress and Decreases Self-Renewal in Hematopoietic Stem Cells. *Cell Reports*. 20:3199–3211. doi:10.1016/j.celrep.2017.09.013.

Saito, M., T. Iwawaki, C. Taya, H. Yonekawa, M. Noda, Y. Inui, E. Mekada, Y. Kimata, A. Tsuru, and K. Kohno. 2001. Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nat Biotechnol*. 19:746–750. doi:10.1038/90795.

Singh, R.J., N. Hogg, J. Joseph, E. Konorev, and B. Kalyanaraman. 1999. The peroxynitrite generator, SIN-1, becomes a nitric oxide donor in the presence of electron acceptors. *Arch Biochem Biophys*. 361:331–339. doi:10.1006/abbi.1998.1007.

Wang, Y., L. Liu, S.K. Pazhanisamy, H. Li, A. Meng, and D. Zhou. 2010. Total body irradiation causes residual bone marrow injury by induction of persistent oxidative stress in murine hematopoietic stem cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 48:348–356. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.005.

Winkler, I.G., N.A. Sims, A.R. Pettit, V. Barbier, B. Nowlan, F. Helwani, I.J. Poulton, N. van Rooijen, K.A. Alexander, L.J. Raggatt, and J.-P. Lévesque. 2010. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood*. 116:4815–4828. doi:10.1182/blood-2009-11-253534.

Wong, J.Y.C., A.R. Filippi, B.S. Dabaja, J. Yahalom, and L. Specht. 2018. Total Body Irradiation: Guidelines from the International Lymphoma Radiation Oncology Group (ILROG). *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 101:521–529. doi:10.1016/j.ijrobp.2018.04.071.

Xu, J., Y. Luo, C. Yuan, L. Han, Q. Wu, L. Xu, Y. Gao, Y. Sun, S. Ma, G. Tang, S. Li, W. Sun, Y. Gong, and C. Xie. 2020. Downregulation of Nitric Oxide Collaborated with Radiotherapy to Promote Anti-Tumor Immune Response via Inducing CD8⁺ T Cell Infiltration. *Int J Biol Sci*. 16:1563–1574. doi:10.7150/ijbs.41653.

Yamakura, F., T. Matsumoto, T. Fujimura, H. Taka, K. Murayama, T. Imai, and K. Uchida. 2001. Modification of a single tryptophan residue in human Cu,Zn-superoxide dismutase by peroxynitrite in the presence of bicarbonate. *Biochim Biophys Acta*. 1548:38–46. doi:10.1016/s0167-4838(01)00212-6.

Yang, Y., J. Wang, S. Guo, S. Pourteymour, Q. Xu, J. Gong, Z. Huang, Z. Shen, K. Diabakte, Z. Cao, G. Wu, S. Natalia, Z. Tian, H. Jin, and Y. Tian. 2020. Non-lethal sonodynamic therapy facilitates the M1-to-M2 transition in advanced atherosclerotic plaques via activating the ROS–AMPK–mTORC1–autophagy pathway. *Redox Biology*. 32:101501. doi:10.1016/j.redox.2020.101501

Discussion et Perspectives

Résumé du travail

Dans ce travail de thèse, j'ai cherché à mettre en évidence le rôle des macrophages résidents CD169⁺ de la moelle osseuse dans la réponse des CSH à l'irradiation.

Les CSH sont en effet les cellules à l'origine de tout le lignage hématopoïétique. C'est pourquoi, comprendre leur réponse à différents stress est essentiel afin d'identifier de nouveaux moyens de les en protéger. Dans le cadre d'irradiations ionisantes à des doses couramment utilisées en radiothérapie fractionnée, l'irradiation a été montrée comme générant des modifications génétiques (Mohrin et al., 2010). De façon plus générale, l'irradiation est connue pour augmenter le stress oxydatif (Wang et al., 2010), l'apoptose (Simonnet et al., 2009) et la sénescence (Wang et al., 2006) des CSH.

Les CSH sont contenues dans un microenvironnement, la niche hématopoïétique, qui contient de nombreux types cellulaires, dont certains ont été montrés comme ayant un rôle dans la réponse des CSH à différents stress. Parmi les cellules de cet environnement, les macrophages résidents sont impliqués dans le maintien des CSH dans leur niche (Chow et al., 2011) et dans leur protection lors d'un stress oxydatif (Ludin et al., 2012).

Ces données nous ont poussés à évaluer si les macrophages résidents pouvait avoir un rôle protecteur dans la réponse des CSH à l'irradiation.

Dans ce cadre, j'ai utilisé deux modèles de souris déplétées en macrophages CD169⁺ : un modèle pharmacologique *via* l'injection de clodronate-liposomes, qui induit la déplétion de la totalité des macrophages et un modèle génétique, les souris CD169^{DTR/+}, qui permet de dépléter spécifiquement les macrophages CD169⁺. Grâce à ces deux modèles, j'ai montré qu'une déplétion des macrophages CD169⁺ avant l'irradiation entraîne à court-terme une diminution moins importante du réservoir de CSH, accompagnée d'une diminution de leur apoptose, d'une augmentation du cycle cellulaire et d'une absence d'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS), généralement induites par l'irradiation. J'ai également ciblé une sous-population de CSH exprimant le récepteur CD82, définie comme interagissant avec une sous-population de macrophages exprimant le récepteur DARC (Hur et al., 2016). Dans cette étude, j'ai montré que la population de CSH exprimant le CD82 est celle ayant la plus grande proportion de cellules apoptotiques, mais aussi présentant une élévation des ROS et de peroxy-nitrites. A plus long-terme, cette absence de macrophages CD169⁺ semble permettre un rétablissement complet du réservoir de CSH après irradiation. Pour finir, j'ai montré que l'absence de macrophages lors de l'irradiation n'entraîne pas de défaut de fonctionnalité des CSH.

De façon surprenante et allant à l'encontre de notre hypothèse de départ, l'ensemble de ces résultats démontrent que la présence des macrophages résidents lors d'une irradiation a un rôle délétère vis à vis des CSH, en diminuant leur réserve au sein de la moelle osseuse.

Afin de mettre en évidence le ou les mécanismes provoquant cet effet délétère, je me suis intéressée à la réponse directe des macrophages CD169⁺ à l'irradiation, en ciblant particulièrement les phénomènes liés au stress oxydatif. J'ai observé que la TBI entraîne une augmentation de la proportion de macrophages CD169⁺ qui produisent de l'oxyde nitrique (NO), une des caractéristiques de la réponse de type pro-inflammatoire des macrophages. Cette augmentation est corrélée à une augmentation des CSH ayant des peroxyntrites. Ces peroxyntrites sont des oxydants extrêmement cytotoxiques issus de la réaction entre les NO d'une part et les ions superoxydes provenant des ROS radio-induits produits majoritairement par la mitochondrie d'autre part. L'abolissement du stress oxydatif par un traitement au NAC, un « scavenger » des ROS, permet de limiter la présence de ROS intracellulaires, mais également la production de NO dans les macrophages, ce qui favorise une meilleure récupération du nombre de CSH après irradiation.

Pour finir, l'utilisation d'un inhibiteur de iNOS (1400W), enzyme responsable de la formation de NO par les macrophages, après une TBI de 2 Gy a montré que la diminution de production de NO par les macrophages après irradiation peut permettre de limiter l'apoptose des CSH et de restaurer leur nombre. En revanche, l'administration d'un donneur de NO (SIN-1) a montré que l'augmentation de NO dans l'environnement accentuait ou entraînait une diminution du nombre des CSH respectivement chez des souris WT et CD169^{DTR/+} après irradiation.

Cette étude démontre ainsi que l'irradiation accroît rapidement la production de NO par les macrophages résidents de la moelle, entraînant un effet nocif sur la réserve de CSH à long-terme. Ces nouvelles données identifient donc le macrophage résident CD169⁺ comme un candidat potentiel pour moduler les effets de l'irradiation sur les CSH.

Macrophages résidents, gardiens de l'homéostasie et relais de toxicité

Dans cette étude, l'utilisation de deux modèles de déplétion de macrophages, à savoir l'injection de clodronate-liposomes et les souris CD169^{DTR/+}, m'a permis de mettre en évidence un rôle délétère des macrophages dans la réponse des CSH à l'irradiation.

Les macrophages sont des cellules programmées pour adopter un profil pro-inflammatoire lorsqu'ils sont stimulés par un environnement oxydatif, ou contenant des cytokines pro-inflammatoires, ce qui en fait parfois des relais de toxicité dans certaines pathologies.

L'efficacité de la déplétion en macrophages pour protéger les tissus a d'ailleurs déjà été démontrée dans le traitement de plusieurs pathologies. Par exemple, la déplétion des macrophages par le clodronate permet de réduire les lésions cérébrales causées par une occlusion artérielle (Ma et al., 2016) et protège les poumons de l'inflammation induite par la fumée de cigarette (Lim et al., 2018).

Dans le cadre d'une irradiation, il est également connu que la déplétion en macrophages peut atténuer certains effets radiotoxiques sur les tissus. Par exemple, l'utilisation de l'anticorps neutralisant CSF1R permet, dans un modèle d'irradiation à 16 Gy du thorax, d'empêcher la survenue de fibrose pulmonaire (Meziani et al., 2018b). Ces anticorps neutralisants permettent également, de diminuer les lésions à l'ADN comme les DSB et l'apoptose dans les intestins et la langue de souris suite à une irradiation de 10 Gy par microfaisceaux (Lobachevsky et al., 2019).

Au vu de toutes ces études, il n'est pas surprenant qu'après une irradiation, les macrophages puissent entraîner des effets délétères sur les CSH. En revanche, c'est la première fois qu'il est montré que cette action délétère n'est due qu'à l'action des macrophages résidents.

Les macrophages résidents sont présents dans de nombreux tissus où ils remplissent des rôles essentiels à leur fonctionnement. Par exemple, les cellules de Küpffer du foie sont impliquées dans le recyclage du fer (Terpstra and van Berkel, 2000), la microglie du cerveau est impliquée dans le support du réseau neuronal (Wake et al., 2013) et les ostéoclastes sont au centre de l'équilibre du tissu osseux (Teitelbaum, 2000).

Ainsi, on considère généralement que les macrophages résidents présentent plutôt un phénotype M2, anti-inflammatoire, qui permet de promouvoir l'homéostasie des tissus dans des conditions normales. Toutefois, il a été montré que dans certaines situations pathologiques, les macrophages résidents pouvaient présenter un phénotype M1 ou du moins plus orienté pro-inflammatoire, qui participerait à la non-résolution ou à l'aggravation de certains phénomènes inflammatoires.

De façon non exhaustive, nous citerons les macrophages du tissu adipeux qui ont notamment été montrés comme adoptant un phénotype orienté pro-inflammatoire chez les individus obèses, participant ainsi à l'inflammation chronique caractéristique du tissu adipeux chez les individus en surpoids (Caslin et al., 2020). Les macrophages résidents des artères présentent également un phénotype M1 dans les plaques d'athéromes, participant ainsi à l'inflammation et à la fragilité de ces plaques (Yang et al., 2020). Les macrophages résidents du foie, appelés cellules de Küpffer, ont été montrés comme adoptant un phénotype plutôt pro-inflammatoire chez des souris hyperglycémiques. Ce phénotype orienté M1 se caractérise ici par une sécrétion plus importante de facteurs pro-

inflammatoires, des niveaux plus élevés de ROS ou encore une induction plus importante de l'expression du gène iNOS (Wang et al., 2019).

Ainsi, la balance entre rôles anti- et pro-inflammatoires des macrophages résidents est capitale pour l'homéostasie de l'organisme. Toutefois, lorsqu'elle est perdue, elle peut mener à l'aggravation de certains phénomènes inflammatoires. C'est probablement le cas pour les macrophages résidents de la moelle lors d'une irradiation.

Nécessité d'une meilleure caractérisation des effets des macrophages sur les CSH lors d'une irradiation

J'ai mis en évidence ici que l'absence de macrophages résidents permet de limiter l'apoptose et le stress oxydatif des CSH et d'augmenter leur entrée dans les phases S-G2-M du cycle cellulaire. Il pourrait être intéressant de regarder si d'autres différences existent dans les caractéristiques de la réponse des CSH à l'irradiation, telle que l'induction de la sénescence *via* les marqueurs SA- β -gal, p16, p21 (Insinga et al., 2013) ...

Une autre caractéristique de la réponse des CSH à l'irradiation est la survenue de dommages à l'ADN (Mohrin et al., 2010). Dans mon étude, j'ai montré que 5 mois après l'irradiation, l'absence de macrophages n'a pas d'impact sur la proportion de cellules souches et progénitrices (KLS) présentant des réarrangements chromosomiques. Toutefois, ces réarrangements sont dus à la fois aux dommages à l'ADN et également aux mécanismes de réparation. Afin de déterminer si l'absence de macrophages a un impact sur le nombre de dommages à l'ADN radio-induits, il serait intéressant de rechercher s'il existe une différence dans le nombre de foyers γ H2AX induits à court-terme après irradiation et/ou persistant à long-terme après l'irradiation.

Afin d'évaluer les capacités de reconstitution et donc les capacités fonctionnelles des CSH, j'ai également effectué des greffes de moelle osseuse provenant de souris WT et CD169^{DTR/+} irradiées et prélevée 5 mois après leur irradiation. J'ai montré que les souris transplantées avec de la moelle de souris WT irradiées ont un nombre diminué de CSH, ce qui n'est pas le cas pour les souris transplantées avec de la moelle de souris CD169^{DTR/+} irradiées. Afin de mieux caractériser la capacité de reconstitution à long-terme de ces CSH, il pourrait être intéressant de réaliser des transplantations sériées, l'effet de certaines altérations ne se révélant parfois qu'à la troisième ou quatrième transplantation (Borges et al., 2019).

Une meilleure caractérisation de l'action des macrophages sur les CSH après irradiation passe évidemment par une meilleure caractérisation de la réponse des macrophages résidents CD169⁺ de la moelle osseuse après la TBI de 2 Gy. J'ai démontré qu'en réponse à l'irradiation, l'expression de iNOS est augmentée dans les macrophages CD169⁺, favorisant la production de NO, une molécule à la fois oxydante et pro-inflammatoire. La sécrétion de NO est d'ailleurs une caractéristique des macrophages M1 dits pro-inflammatoires.

En réponse à l'irradiation, les macrophages M1 sont également connus pour sécréter d'autres molécules pro-inflammatoires tels que le TNF α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12 ou encore l'IL-18 (Hosoi et al., 2001; Shan et al., 2007; Ray et al., 2013). Ces cytokines participent à de nombreuses pathologies, en induisant par exemple des dommages cérébraux après une lésion cérébrale traumatique pour le TNF α (Bermphol et al., 2007), des dommages aigus du poumon pour l'IL-1 β (Kolb et al., 2001), l'arthrite rhumatoïde pour l'IL-6 (Nakahara et al., 2003) ou encore une inflammation de la muqueuse intestinale pour l'IL-12 et l'IL-18 (Chikano et al., 2000).

Il serait intéressant d'évaluer l'expression de ces différents gènes dans les macrophages CD169⁺ de la moelle à différents temps après irradiation. Nous pourrions également effectuer une mesure de ces différentes cytokines dans le surnageant de moelle irradiée entre des souris WT et des souris CD169^{DTR/+}.

Rôle des NO et des peroxynitrites dans la réponse des CSH à l'irradiation

Les NO sont des espèces qui ne sont pas considérées comme étant directement radiotoxiques. En revanche, les peroxynitrites sont des espèces extrêmement cytotoxiques qui découlent de la réaction des NO avec les superoxydes, ROS majoritairement produits par la mitochondrie (Pacher et al., 2007). Dans cette étude, j'ai pu montrer une corrélation entre la production de NO par les macrophages CD169⁺ et une augmentation des peroxynitrites dans les CSH de souris WT irradiées, appuyée par le fait que la déplétion des macrophages CD169⁺ empêche cette augmentation des peroxynitrites dans les CSH de souris CD169^{DTR/+} irradiées. Ces résultats suggèrent ainsi un rôle direct des macrophages CD169⁺ dans la formation de peroxynitrites cytotoxiques dans les CSH.

Ceci ne permet toutefois pas de démontrer :

- Un lien entre la présence de peroxynitrites et les dommages aux CSH.
- Un lien direct entre la réponse des macrophages à l'irradiation et les dommages aux CSH.

L'effet direct des peroxynitrites sur les CSH n'a jamais été mis en évidence. Il serait intéressant d'induire *in vitro* des peroxynitrites dans le milieu de culture de CSH grâce à l'addition à la fois d'un donneur de superoxydes comme le superoxyde potassium (Maioli et al., 2015) et d'un donneur de NO comme le SIN-1, que j'ai utilisé dans cette étude. Afin de mesurer l'impact des peroxynitrites sur la

CSH, l'évaluation des dégâts qu'ils induisent généralement, tels que l'apoptose, les dommages à l'ADN et l'altération de la chaîne de transfert mitochondriale, pourrait ensuite être mesurée. D'ailleurs, il a été montré dans une lignée de progéniteurs hématopoïétiques murins, la 32D cl3, que des irradiations de 10 et 50 Gy couplées à un donneur de NO, le GSNO, induisent des dommages aux complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale (Pearce et al., 2001). Au vu des effets connus des peroxy-nitrites sur les cellules, il serait également intéressant d'évaluer la différence d'atteinte mitochondriale dans les CSH des souris WT et CD169^{DTR/+} après TBI, par exemple en mesurant l'activité des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et en mesurant la production d'ions superoxydes.

Il est également connu que l'augmentation des ROS dans les cellules après une irradiation est majoritairement due à l'altération de la chaîne mitochondriale (Dayal et al., 2009; Yamamori et al., 2012). Si les peroxy-nitrites sont, au moins en partie, impliqués dans l'altération de la chaîne mitochondriale des CSH après l'irradiation, cela pourrait expliquer que dans les souris CD169^{DTR/+}, qui ne présentent pas d'augmentation de peroxy-nitrites après irradiation, il n'y ait pas non plus d'élévation des ROS.

Afin de mettre en évidence le lien direct entre la réponse des macrophages à l'irradiation et les dommages à la CSH, la méthode la plus simple et la plus indiquée serait d'effectuer des co-cultures de macrophages et de CSH. Malheureusement, malgré de nombreux essais je n'ai pas réussi à maintenir des macrophages CD169⁺ de la moelle plus de 5 jours en culture. Les macrophages, définis sur les critères CD115^{low} Gr1^{med/low} F4/80⁺ SSC^{low} CD169⁺ (Chow et al., 2011), ont été triés en testant plusieurs milieux de recueil et plusieurs milieux de culture. J'ai également essayé de tester leur fonctionnalité *in vitro* grâce à des tests de phagocytose mais je n'ai rien pu observer de concluant (données non incluses dans ce manuscrit).

Aucune autre équipe n'a encore décrit de mise au point de culture de macrophages résidents de la moelle osseuse. Toutefois, la culture de certains autres types de macrophages résidents provenant du foie, de la rate, du poumon et du cerveau a été développée (Ogawa et al., 2019). Pour ce faire, les auteurs ont traité chaque organe suivant différentes étapes de dissections, digestions, lavages jusqu'à obtenir une suspension cellulaire pouvant être placée en culture. Après plusieurs jours, les auteurs ont pu obtenir une culture adhérente composée de cellules stromales et de macrophages. Dans un deuxième temps, l'ensemencement de cette co-culture sur des boîtes de pétri bactériologiques a permis l'adhérence des macrophages tout en gardant les cellules stromales en suspension. Des tests de phagocytose et des vérifications par cytométrie ont ensuite permis de valider que ces cellules adhérentes étaient bien des macrophages résidents fonctionnels, spécifiques des différents tissus. Développer une variante de cette technique sur la moelle osseuse permettrait peut-être de mettre au

point une culture de macrophages résidents CD169⁺ de la moelle osseuse, mais cela nécessitera certainement beaucoup de mises au point.

Réponse différentielle des sous population CD82⁺ et CD82^{neg} au sein des CSH

Le travail de (Hur et al., 2016), déjà décrit dans mon introduction, a montré que l'interaction entre le récepteur DARC, situé à la surface d'une sous-population de macrophages de la moelle, interagit avec le récepteur CD82 situé à la surface de certaines CSH (30 à 40%). Cette interaction permet de maintenir les CSH en quiescence par une signalisation impliquant la voie TGFβ et l'activation de certains inhibiteurs du cycle cellulaire. Lorsque cette interaction entre les deux récepteurs est perdue, CD82 est endocyté puis dégradé, interrompant la cascade de signalisation et levant l'inhibition du cycle cellulaire (**Figure 20**).

Mes travaux ont montré que la majorité des macrophages exprimant le récepteur DARC fait partie de la population CD169⁺ (donnée non incluse), ce qui m'a permis de déterminer que la présence de DARC à la membrane est une caractéristique des macrophages résidents. J'ai montré que la déplétion des macrophages CD169⁺ et donc de la sous-population DARC⁺ (qui représente 10 à 15% des macrophages CD169⁺) entraîne une diminution de la proportion des CSH exprimant le CD82 à leur surface. Dans les souris WT irradiées, je montre également que ces CSH CD82⁺, donc en théorie les plus proches des macrophages résidents, représentent la plus grande part des cellules apoptotiques, des cellules présentant une élévation des ROS et des peroxy-nitrites à 1 et 10 jours post irradiation.

De façon surprenante, 5 mois après l'irradiation, alors que les CSH CD82⁺ sont revenues à un nombre normal à la fois dans les souris WT et les souris CD169^{DTR/+} irradiées, ce sont les CSH CD82^{neg} qui restent diminuées dans le groupe des souris WT irradiées. C'est donc cette population qui reflète la baisse du nombre de CSH à long-terme après TBI. Ce retour des CD82^{neg} à la normale dans les souris CD169^{DTR/+} est en réalité observé entre 10 et 21 jours après irradiation. Si nous nous référons au travail de Hur et al, nous pouvons émettre l'hypothèse que cette population de CSH CD82^{neg} dans ces souris déplétées en macrophages correspond en réalité à une population mixte de CSH constituée (i) de CSH n'exprimant pas le CD82 et (ii) de CSH ayant endocyté leur récepteur CD82 suite à la perte d'interaction avec le récepteur DARC. Toujours d'après Hur et al, ces cellules ayant endocyté leur récepteur sont plus cyclantes que les autres CSH. Cette augmentation de prolifération chez les CSH CD82^{neg} pourrait expliquer la différence de récupération entre les CSH CD82^{neg} des souris WT et CD169^{DTR/+} irradiées. Pour éprouver cette hypothèse, nous comptons étudier la prolifération des CSH CD82⁺ et des CD82^{neg} par un marquage au BrdU, 10 jours après irradiation, c'est-à-dire au moment de la remontée du nombre de CSH chez les souris CD169^{DTR/+} irradiées.

L'abolition du stress oxydatif : un impact sur les CSH et sur leur environnement

La déplétion des macrophages CD169⁺ de la moelle osseuse a montré une abolition de l'augmentation des ROS radio-induits au cours des trois semaines suivant l'irradiation. Afin d'évaluer l'impact de l'absence de ces ROS sur la récupération du nombre de CSH au cours du temps, j'ai traité des souris WT avec un « scavenger » des ROS, le NAC, avant et après l'irradiation. En me plaçant 1 jour après l'irradiation, j'ai validé que le traitement au NAC permet de supprimer l'augmentation radio-induite des ROS. Cette observation est corrélée à une diminution de l'apoptose, qui se situe alors au même niveau observé dans les CSH de souris CD169^{DTR/+} irradiées. A 21 jours après l'irradiation, le traitement au NAC permet une meilleure récupération du nombre de CSH par rapport aux WT non traitées, mais qui reste toutefois moins importante que dans les CD169^{DTR/+}. Cela peut signifier que l'augmentation des ROS dans les CSH n'est que partiellement impliquée dans la diminution du nombre de CSH après l'irradiation. Cet effet protecteur du NAC sur les CSH après l'irradiation a déjà été observé par le groupe de (Wang et al., 2010) qui a montré que, lors d'une TBI de 6,5 Gy, le traitement au NAC permet d'atténuer l'inhibition de la fonction clonogénique radio-induite des CSH et d'atténuer la réduction de leur capacité à se greffer à long-terme.

Toutefois, il est assez compliqué de tirer des conclusions quant au mécanisme se trouvant derrière cette action du NAC. Le NAC va certes diminuer le niveau de ROS dans les CSH, mais également diminuer les ROS extra et intracellulaires (Cui et al., 2015) dans toute la souris. Cette diminution des ROS dans les cellules environnantes des CSH va potentiellement abroger certains mécanismes impliqués dans la réponse des CSH à l'irradiation. En effet, je montre ici que le traitement au NAC permet la diminution de la production de NO par les macrophages et la diminution corrélée des peroxy-nitrites dans les CSH. Il est connu que les ROS sont capables d'entraîner la production de NO par les macrophages, notamment *via* l'activation des voies NFκB et AP-1 (Su et al., 2011; Tsai et al., 2013a). Par ailleurs, le traitement au NAC dans des cellules RAW264.7 stimulées à la sphingomyélinase, inhibe l'activation du gène iNOS (Hatanaka et al., 1998).

Ainsi, nous pouvons conclure que la diminution du stress oxydatif radio-induit permet d'améliorer la reconstitution du nombre de CSH probablement (i) *via* la diminution des ROS directement dans les CSH et indirectement (ii) *via* l'environnement, peut-être par la modulation de la réponse des macrophages à l'irradiation.

L'énigme de la deuxième vague de ROS

La persistance du stress oxydatif après l'irradiation est un phénomène connu qui a été observé pour de nombreuses doses d'irradiation différentes. Ici, je montre qu'une première vague de ROS radio-induits prend place entre 12h et 3 jours après l'irradiation, avec un point culminant à 1 jour post irradiation. De façon surprenante, une deuxième vague de ROS est observée entre 8 et 15 jours après l'irradiation. Ces deux vagues de ROS ont déjà été observées au laboratoire après une irradiation *in vitro* de CSH à faible dose (20 mGy). La première vague, très courte, est observée immédiatement après irradiation et disparaît dans les 2h. La seconde augmentation de ROS est ensuite observée 6 jours après irradiation pour perdurer à long-terme (Rodrigues-Moreira et al., 2017). Ces deux vagues ont également été observées dans d'autres types cellulaires, par exemple dans des cellules de lignée de colon humain, les SW60, après une irradiation de 7,5 Gy. Dans ce cas, la première vague prend place pendant les trois premiers jours suivant l'irradiation et la deuxième de 5 à 10 jours après l'irradiation (Tulard et al., 2003). Ces deux dernières études effectuées *in vitro* laissent donc penser que la survenue de cette deuxième vague n'est pas dépendante de l'environnement, mais plutôt d'un stress persistant intrinsèque aux cellules. Toutefois, aucune explication n'a été trouvée à ce jour pour expliquer cette deuxième vague de ROS.

Dans cette étude, j'ai montré que la déplétion de macrophages permet de supprimer à la fois la première et la deuxième vague de ROS radio-induits. Toutefois, la déplétion des macrophages, si elle est effectuée 4 jours après l'irradiation, c'est-à-dire après la première vague de ROS, n'affecte pas de façon significative l'augmentation des ROS observée 10 jours après la TBI. Cela conforte encore plus l'hypothèse que ce second stress oxydatif n'est pas dépendant de l'environnement mais plutôt d'un stress interne aux cellules qui se met en place de façon précoce après l'irradiation.

Bien qu'il n'existe pas d'explication claire à ces vagues de stress oxydatif, des pistes ont toutefois été trouvées permettant d'expliquer une persistance du stress oxydatif parfois pendant plusieurs mois après l'irradiation. Cela pourrait constituer des pistes intéressantes pour expliquer ces vagues de ROS. Parmi les candidats intéressants, on peut citer la dysfonction mitochondriale *via* une baisse d'activité du complexe I de la chaîne mitochondriale et qui a été observée après une irradiation de 5 Gy sur des cellules issues d'une lignée de muscle lisse thoracique de rat, les A7r5 (Yoshida et al., 2012). Au vu de l'effet connu des peroxy-nitrites sur la chaîne mitochondriale suite à une irradiation (Pearce et al., 2001), cela pourrait constituer une piste intéressante pour notre étude.

L'induction décalée de la NADPH oxydase appelée « Dual Oxidase 1 » (DUOX1), plusieurs jours après l'irradiation (Ameziane-El-Hassani et al., 2015) est aussi une piste intéressante. En effet, dans les CSH,

une autre NADPH oxydase, la NOX4 est sur-réglée jusqu'à plusieurs semaines après une TBI de 6,5 Gy et participe probablement à la persistance du stress oxydatif (Wang et al., 2010).

Rôle des autres cellules de la niche dans la réponse des CSH à l'irradiation

Les macrophages résidents de la moelle osseuse ont été montrés comme régulant d'autres cellules de la niche hématopoïétique. Leur déplétion entraîne notamment une baisse du nombre des ostéoblastes (Winkler et al., 2010) et une diminution de la production de CXCL12 par les cellules stromales Nestin⁺ de la niche, entraînant une mobilisation des CSH (Chow et al., 2011). De plus, ces macrophages sont impliqués dans la régénération hématopoïétique médiée par le NPY, un neuropeptide sécrété par le SNS de la niche des CSH (Park et al., 2015), et dans le recyclage des neutrophiles âgés de la circulation sanguine (Casanova-Acebes et al., 2013).

Dans mon étude de la niche médullaire, j'ai pu moi-même observer que la déplétion des macrophages dans le modèle CD169^{DTR/+} entraîne une baisse des ostéoblastes et des cellules stromales CAR et PDGFR α et, à l'inverse, une augmentation du nombre de cellules endothéliales sinusoïdales (SEC).

Plusieurs de ces populations cellulaires affectées par une déplétion des macrophages ont été montrées comme ayant un impact sur la réponse des CSH après l'irradiation.

Les cellules endothéliales participent à la régénération des CSPH *via* la sécrétion de CCL5 (Piryani et al., 2019a), et probablement *via* de nombreux autres facteurs sécrétés. En effet, le traitement de CSPH irradiées grâce à des vésicules dérivées de cellules endothéliales permet de diminuer l'apoptose radio-induite (Piryani et al., 2019b).

La co-culture de MSC avec des CSPH irradiées permet de réduire les dommages à l'ADN et l'apoptose radio-induite. Cette protection semble s'effectuer grâce à la sécrétion de Jagged 1 par les cellules stromales, ce qui permet de diminuer la cytotoxicité induite par l'irradiation sur les CSPH (Kim et al., 2018) et celle d'Angiopoïétine 1 qui permet d'accélérer la récupération hématopoïétique (Zhou et al., 2015).

Quant au SNS, son rôle régénérateur sur le tissu hématopoïétique passe par l'activation des récepteurs Y1 à la surface des macrophages (Park et al., 2015).

D'autres cellules de la niche, qui n'ont pas été montrées comme étant directement régulées par les macrophages, sont également des modulateurs de la réponse des CSH après l'irradiation. L'adiponectine sécrétée par les adipocytes a été montrée comme accélérant la récupération du nombre de CSH après l'irradiation (Masamoto et al., 2017). Enfin les mégacaryocytes peuvent stimuler l'expansion des CSH après une greffe dans une souris ayant subi une myéloablation par irradiation létale (Olson et al., 2013).

Dans notre étude, je me suis concentrée sur le rôle direct des macrophages sur la réponse des CSH à l'irradiation. Mais compte tenu de la complexité des interactions entre les nombreux types cellulaires de la niche hématopoïétique et l'altération de ce réseau suite à la déplétion des macrophages, il est fort possible que des effets indirects, passant par d'autres cellules de la niche participent au phénotype à long-terme que j'observe. Au vu de leur régulation par les macrophages et de leur rôle dans la modulation de la réponse des CSH à l'irradiation, il pourrait être intéressant d'étudier la réponse des cellules endothéliales et stromales à l'irradiation en présence et en absence de macrophages.

L'inhibition de iNOS, un intérêt pour la radiothérapie ?

A l'équilibre, les NO sont de petites molécules produites de façon endogène par l'organisme et servant de molécule de signalisation. Ces NO sont produits par une classe d'enzymes appelées les NO synthases (NOS) qui possèdent trois isoformes : NOS1, NOS2 et NOS3. NOS1 aussi appelé nNOS est exprimée dans les cellules neuronales et les NO qu'elle produit permettent de réguler plusieurs mécanismes telles que la signalisation synaptique, la plasticité neuronale ou encore la contractilité musculaire dans les muscles squelettiques (Mungrue and Bredt, 2004). L'expression de NOS3 ou eNOS est restreinte aux cellules endothéliales et dans ce cas, les NO produits sont impliqués dans les phénomènes de vasodilatation. Ces deux isoformes, nNOS et eNOS, sont considérées comme étant constitutivement actives et produisent donc constamment de faibles quantités de NO.

A l'inverse, l'enzyme NOS2 ou iNOS est une enzyme inductible. Elle est majoritairement exprimée par les macrophages mais peut aussi être retrouvée dans d'autres cellules comme les astrocytes ou les cellules épithéliales. L'induction de cette enzyme est généralement déclenchée par la présence de cytokines pro-inflammatoires et d'un stress oxydatif. Une fois induite, iNOS va continuellement permettre la production de grandes quantités de NO pendant des heures voire des jours, principalement par les macrophages (Choudhari et al., 2013).

Dans cette étude, j'ai utilisé un inhibiteur spécifique de iNOS, le 1400W (Garvey et al., 1997) qui a donc permis d'inhiber spécifiquement la production de NO induite par l'irradiation, sans altérer le fonctionnement des deux autres isoformes. Cet inhibiteur a permis de mettre en évidence que le blocage de l'activité de iNOS et donc l'inhibition de la production de NO par les macrophages pouvait améliorer la récupération des CSH trois semaines après irradiation. L'action de cet inhibiteur, administré par injection intrapéritonéale, ne permet pas de cibler l'inactivation d'iNOS spécifiquement dans nos macrophages d'intérêts, à savoir les CD169⁺ de la moelle osseuse. Cependant, j'ai pu observer que seuls les macrophages CD169⁺ produisent des NO après irradiation, mais pas les CD169^{neg}. Cela laisse supposer que dans la moelle, seuls les macrophages résidents CD169⁺ produisent les NO et donc que l'inhibition de iNOS les cible plus particulièrement. Une façon d'affiner cette conclusion serait

d'irradier un modèle de souris dans lequel il serait possible d'inhiber iNOS spécifiquement et de façon inductible dans les macrophages CD169⁺, par exemple un modèle Cre/lox CD169-Cre x iNOS^{fl/fl}. En revanche, les connaissances actuelles ne permettent pas de distinguer et donc de cibler les macrophages résidents des différents organes.

La dose d'irradiation choisie pour cette étude est une dose de 2 Gy. Elle correspond à une fraction utilisée lors d'une radiothérapie fractionnée. Je démontre ici que l'inhibition de iNOS permet de réduire les effets délétères de l'irradiation sur les CSH. La question est maintenant de savoir si ce traitement est applicable dans le cadre d'une radiothérapie médicale, c'est-à-dire utilisable dans le traitement des cancers.

Dans plusieurs types de cancers comme le mélanome ou le cancer du sein, l'expression de iNOS au niveau de la tumeur est associée avec une survie diminuée (Ekmekcioglu et al., 2006; Glynn et al., 2010). L'utilisation d'inhibiteurs de NOS tel que la nitroarginine (L-NNA) se combine favorablement avec une irradiation localisée de 10 Gy en permettant de limiter la croissance d'une tumeur de carcinome squameux (Cardnell and Mikkelsen, 2011). De même, l'utilisation d'un autre inhibiteur, le L-N^G-Nitro arginine méthyl ester (L-NAME), permet d'améliorer la réponse tumorale à l'irradiation en induisant un délai de croissance tumorale après l'irradiation à 10 Gy dans le cadre d'une tumeur de carcinome squameux (Ridnour et al., 2015). Dans un modèle orthotopique d'adénocarcinome pancréatique ductal, la croissance tumorale est retardée lorsque la radiothérapie est couplée à l'inhibition d'iNOS par le 1400W (Pereira et al., 2020). De plus, le 1400W combiné à une radiothérapie entraîne une augmentation de la survie et supprime la croissance tumorale *in vivo* dans des cas de cancers du poumon et du sein. Cette action semble passer par une augmentation de l'infiltration et de la prolifération de cellules T CD8⁺ qui est connue pour être un facteur favorable dans l'élimination des tumeurs (Xu et al., 2020).

D'un autre côté, de hauts niveaux de NO ont été montrés comme favorisant la radiosensibilité de certaines cellules tumorales. L'utilisation de plusieurs composés générant des NO, comme le nitrate glycidyl, le dinitrate isosorbide et le JS-K entraînent respectivement une augmentation de la radiosensibilité de cellules de cancer colorectal, de tumeurs FSall et de cellules de gliomes U87 (Jordan et al., 2003; Ning et al., 2014; Heckler et al., 2017). De plus, le donneur de NO, Diethylenetriamine/nitric oxide adduct (DETA-NO) a été montré comme sensibilisant des cellules de neuroblastome à l'irradiation en augmentant leur apoptose radio-induite (Wang et al., 2003).

L'ensemble de ces études et nos propres résultats démontrent que l'utilisation d'inhibiteur de NOS et même plus particulièrement l'utilisation de l'inhibiteur spécifique d'iNOS, le 1400W, permet dans un contexte de radiothérapie, de protéger le réservoir de CSH, mais également d'augmenter la

radiosensibilité de la tumeur. Malgré cela, le rôle potentiel des NO dans la promotion de la radiosensibilité tumorale implique que cette action du 1400W doit être vérifiée dans plusieurs types de tissus tumoraux et à plusieurs doses d'irradiation pour valider son effet. Pour finir, je n'ai montré l'effet protecteur du 1400W sur les CSH qu'à la dose de 2 Gy. Il serait intéressant de tester son efficacité avec de plus fortes doses, par exemple avec l'accumulation de doses fractionnées, ou encore à de faibles doses qui ont également été montrées comme étant délétères pour les CSH (Rodrigues-Moreira et al., 2017). Il est d'autant plus nécessaire de tester d'autres doses d'irradiation, qu'à une dose de 6 Gy en TBI et à deux semaines après l'irradiation l'utilisation de souris *iNOS^{-/-}* n'a montré aucun effet sur la réponse du tissu hématopoïétique à l'irradiation (Li et al., 2018a).

L'induction de NO : un intérêt pour l'amélioration de la myéloablation par radiothérapie ?

Dans cette étude, j'ai également utilisé un donneur de NO, le SIN-1. Après irradiation, j'ai montré qu'un traitement des souris au SIN-1 pendant les 2 premiers jours suivant l'irradiation induit une diminution du nombre de CSH dans les souris *CD169^{DTR/+}* et une diminution du nombre de CSH encore plus important dans les souris WT. Cette expérience appuie encore plus le fait que les NO ont un effet délétère sur les CSH lors d'une irradiation.

Cette expérience démontre ainsi que l'administration d'un donneur de NO potentialise la diminution du nombre de CSH à irradiation égale.

Bien que de plus amples tests soient nécessaires, comme par exemple l'administration de doses d'irradiation plus fortes, le fractionnement de la dose totale ou encore l'injection d'une plus grande quantité de SIN-1, nous pouvons avancer que le SIN-1 semble être un candidat intéressant pour améliorer les protocoles d'irradiation corporelle totale utilisés pour la transplantation de moelle osseuse.

La transplantation de moelle osseuse permet de greffer des cellules de moelle osseuse saines chez des patients souffrant de pathologies du tissu hématopoïétique. Afin de permettre la greffe de moelle, une myéloablation généralement effectuée par radiothérapie ou chimiothérapie est nécessaire.

Dans le cadre du conditionnement utilisant la radiothérapie, la méthode la plus utilisée a longtemps été l'irradiation corporelle totale (TBI). Mais cette TBI est désormais largement remplacée par des formes plus ciblées qui permettent d'irradier la moelle osseuse à la dose maximale mais d'épargner en partie ou complètement les autres organes du corps. Une autre technique permettant de diminuer la dose maximale utilisée et donc la toxicité associée est la mise au point de régimes de conditionnement à intensité réduite (RIC) (Wong et al., 2018). L'utilisation de ces régimes de conditionnement est généralement effectuée pour des personnes âgées ou présentant des comorbidités. Ils consistent à diminuer la dose d'irradiation en la combinant avec des molécules

potentialisant ses effets, tout en gardant bien sûr la même efficacité de traitement. Par exemple, l'utilisation de fludarabine, un produit de chimiothérapie, combiné à une irradiation de 8 Gy (4 fractions de 2 Gy) présente la même efficacité qu'une irradiation seule de 12 Gy (6 doses de 2 Gy) (Bornhäuser et al., 2012).

Au vu de mes résultats, l'utilisation du SIN-1 pourrait se révéler intéressante pour un nouveau protocole de RIC. De plus, la dose de SIN-1 utilisée n'affecte pas le nombre de CSH dans les souris non irradiées ce qui pourrait indiquer que le SIN-1 pourrait ne pas affecter les organes non irradiés lors du conditionnement, ce qui en ferait un atout supplémentaire. Toutefois, des tests de toxicité sont nécessaires afin de valider cette dernière observation.

Pour conclure, notre étude démontre pour la première fois un rôle délétère des macrophages résidents CD169⁺ dans la réponse des CSH à l'irradiation. Cette action délétère se caractérise, du moins en partie, par la production d'oxydes nitriques (NO) par les macrophages. Nous démontrons également que l'inhibition de cette production de NO par les macrophages permet de protéger le réservoir de CSH des effets de l'irradiation, ouvrant de nouvelles pistes pour une possible utilisation en clinique.



Isolation and Phenotyping of Bone Marrow Macrophages

Marion Chalot

Abstract

Macrophages are present in most of the tissues in the organism. They are basically separated into two categories: the resident macrophages, specific of the tissue and capable of proliferation, and the macrophages deriving from the monocyte differentiation. In the bone marrow, the “resident” macrophages are part of the hematopoietic stem cell niche.

Those macrophages are known to have a role in the support of erythropoiesis (Chow, *Nat Med* 19:429–436, 2013), the maintenance of stem cell in their niches (Chow, *J Exp Med* 208:261–271, 2011), and are an independent self-renewing population (Hashimoto, *Immunity* 38:792–804, 2013).

Key words “Resident” macrophages, Bone marrow, Cell sorting, Cell culture

1 Introduction

The HSC niche is usually defined as the cellular and molecular environment that surrounds HSC and regulates their functions. Among the cells that constitute these niches, macrophages seems to play a major role in the regulation of HSCs.

Chow et al. [1], Christopher et al. [2], and Winkler et al. [3] reported a role of bone marrow macrophages in the maintenance and retention of HSCs. They also have shown an interaction between other cells of the niche like nestin+ perivascular MSC (mesenchymal stem cells) and endosteal OB (osteoblasts) [4]. Indeed phagocytes seem to be positive regulators of those two types of cells that also have important roles in the hematopoietic niche.

Chow et al. [5] completed their characterization of those CD169+ macrophages by highlighting their role in the promotion of late erythroid maturation. Moreover Hashimoto et al [6] described that the bone marrow macrophages are an independent self-renewing population.

Taken together those results prove the importance of CD169+ macrophages in the hematopoietic niche. Their study seems critical

to understand the hematopoietic niche functioning, the regulation of HSC, and by extension the hematopoiesis.

In the bone marrow, macrophages are characterized by a Gr1^{medium/low}, CD115^{neg}, F4/80^{high}, SSC^{low} phenotype [1]. The bone marrow “resident” macrophages also express the CD169 marker.

Here we describe a method to phenotype bone marrow macrophages and a method to isolate them.

2 Materials

For every step phosphate-buffered saline (PBS), without calcium and magnesium, is used.

2.1 For Mouse Sacrifice and Bone Marrow Preparation

1. Mouse.
2. Syringe and 23G needle.
3. Dissecting tools.
4. 4 M NH₄Cl.
5. 70 µm cell strainer.
6. Anti-mouse CD16/CD32 purified (Clone 93).

2.2 For Macrophage Phenotyping

1. Gr1-PECy7 (clone RB6-8C5).
2. CD115-biotin (clone AFS98).
3. F4/80 Pacific Blue (clone BM8).
4. CD169-FITC (clone 3D6.112).
5. Streptavidin-BUV395.

2.3 For Macrophage Sort and Culture

1. B220-biotin (clone RA3-6B2).
2. CD3-biotin (Clone 17A2).
3. Ly6G-biotin (clone 1A8).
4. CD115-biotin (clone AFS98).
5. Gr1-PECy7 (clone RB6-8C5).
6. F4/80-PerCPCY5.5 (clone BM8).
7. CD169-PE (clone 3D6.112).
8. Streptavidin-efluor450.
9. Bovine serum albumin, 30% solution (BSA).
10. Ethylenediaminetetraacetic acid solution (EDTA) 0.5 M.
11. Column buffer: PBS, 0.5% BSA, 2 mM EDTA.
12. LS columns (Miltenyi Biotec).
13. µMACS separator (Miltenyi Biotec).
14. Anti-biotin microbeads (Miltenyi Biotec).

15. Culture medium: Iscove's modified Dulbecco's medium with Glutamax (IMDM), 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 µg/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (*see* **Note 1**).

3 Methods

3.1 Mouse Sacrifice and Bone Marrow Treatment (*See* **Notes 2 and 3**)

1. Sacrifice the mouse (*see* **Note 4**) and dissect the lower limbs. Skin and muscles must be removed in order to separate and clean the bones (tibias, femurs, and hips).

Once the bones are cleaned, the bone marrow needs to be flushed out of it.

Fill the syringe with PBS and attach the 23G needle.

Cut the extremities of the bones, insert the needle, and flush the bone marrow in a 50 mL tube with PBS.

2. Once bone marrow is collected, spin the tube at 300 g for 5 min at 20 °C. Remove the supernatant and resuspend the pellet in 1 mL of a 4 M NH₄Cl solution per mice. Incubate for 10 min at room temperature (RT) to lyse the red blood cells.
3. Filtrate the bone marrow in a 70 µm cell strainer in a new 50 mL tube. Wash the previous tube with PBS and filtrate it as well.
4. Spin at 300 g for 5 min at 20 °C, remove the supernatant, and resuspend the pellet in 1 mL of PBS per mice. Count the number of cells (*see* **Note 5**).
5. Add anti-CD16/CD32 (1:100 dilution) for 10 min at RT. This step will saturate the CD16/CD32 sites on macrophages.

3.2 Macrophage Phenotyping

For a concentration of 50 million bone marrow cells/mL:

1. Prepare the antibody mix for the staining. For 100 µL of cell suspension, add 1 µL of Gr1-PECy7, 0.5 µL of CD115-biotin, 1 µL of F4/80 Pacific Blue, and 1 µL of CD169-FITC. Also prepare a tube without CD169-FITC in order to have a fluorescence minus one (FMO) as a setup control.
2. Incubate for 15 min at 4 °C, wash by adding 1 mL of PBS, and spin at 300 g for 5 min at 20 °C. Resuspend the pellet in 100 µL of PBS and add 0.5 µL of streptavidin-BUV395. Incubate for 5 min at 4 °C, wash by adding 1 mL of PBS, spin at 300 g for 5 min at 20 °C, and resuspend the pellet in 300 µL of PBS.
3. Proceed to FACS analysis (*see* **Note 6**). An example of the gating we use is shown in Fig. 1.

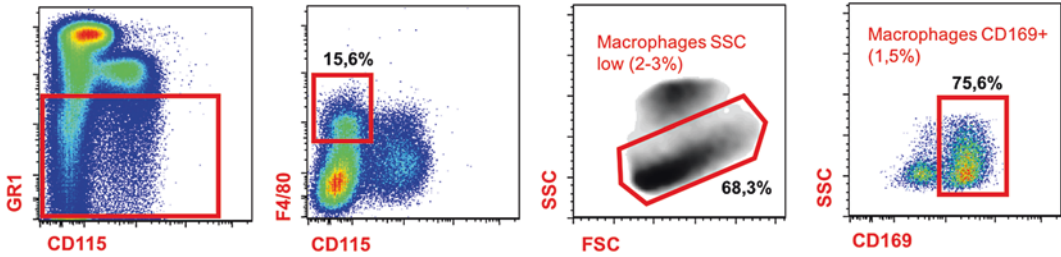


Fig. 1 Gating strategy of the bone marrow “resident” macrophages. They are characterized by a $GR1^{med/low} CD115^{neg} F4/80^{high} SSC^{low} CD169^{+}$ phenotype (*see Note 7*)

3.3 Macrophage Sort and Culture

1. (*See Note 8*) For a concentration of 100 million bone marrow cells/mL, add 10 μ L of B220-biotin, 5 μ L of CD3-biotin, 10 μ L of Ly6G-biotin, and 10 μ L of CD115-biotin (*see Note 9*). Incubate for 15 min at 4 $^{\circ}$ C.
2. Prepare column buffer and place it on ice (*see Note 10*).
3. Wash by adding 1 mL of PBS; spin at 300 g, 5 min at 20 $^{\circ}$ C; discard the supernatant; and resuspend the pellet in 80 μ L of column buffer for 10^7 cells. Add 20 μ L of anti-biotin microbeads for 10^7 cells. Incubate for 15 min on ice.
4. Wash by adding 30 mL of column buffer; spin at 300 g, 5 min at 20 $^{\circ}$ C; and resuspend in 1.5 mL of column buffer.
5. Place the LS column on the MACS separator and equilibrate it by adding 3 mL of column buffer. When the flow stops, place a 15 mL tube below the column to collect the negative fraction.
6. Add the 1.5 mL of cell suspension to the column. When there is no more drop falling, add 3 mL of column buffer to the column. Repeat this step twice and discard the column (*see Note 11*).
7. Spin at 300 g for 5 min at 20 $^{\circ}$ C, resuspend the pellet in 500 μ L of PBS, and count the cells (*see Notes 5 and 12*).
8. Prepare the antibody mix for the sort. For 500 μ L of cell suspension add 2.5 μ L of Gr1-PECy7, 10 μ L of F4/80-PerCPCy5.5, and 5 μ L of CD169-PE. Also prepare a tube without CD169-FITC in order to have a FMO as a setup control.
9. Incubate for 15 min at 4 $^{\circ}$ C. Wash by adding 1 mL of PBS, spin at 300 g for 5 min at 20 $^{\circ}$ C, and add 2.5 μ L of streptavidin-efluor450–500 μ L of cells. Incubate for 5 min at 4 $^{\circ}$ C.
10. Wash by adding 1 mL of PBS, spin at 300 g for 5 min at 20 $^{\circ}$ C, discard the supernatant, and resuspend the pellet in PBS (1 mL PBS for ten million of cells).

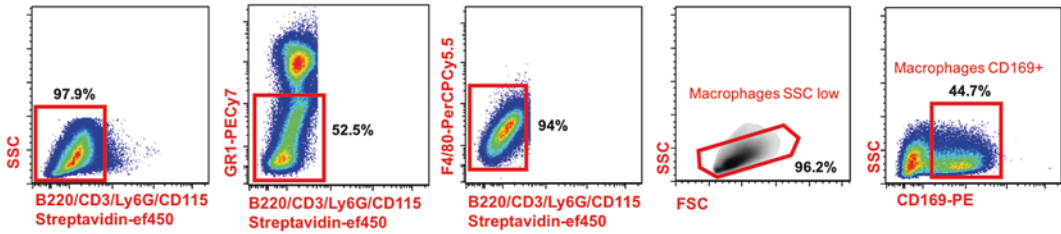


Fig. 2 Gating strategy for the sort of the bone marrow “resident” macrophages. They are characterized by a B220^{neg} CD115^{neg} GR1^{med/low} F4/80^{high} SSC^{low} CD169⁺ phenotype (see **Note 7**)

11. Prepare culture medium and prepare collection tubes for the sort by placing 300 μ L of culture medium in 1.5 mL Eppendorf tubes.
12. Prepare the machine for the sort (see **Note 13**). We use a 100 μ m nozzle and a 45 Psi pressure.
13. The gating to select our population of interest is shown in Fig. 2 (see **Note 7**):
14. Once the sort is done, spin isolated macrophages at 300 g for 5 min at 20 $^{\circ}$ C and resuspend the pellet in culture medium.
15. Place the macrophages in culture plates at 37 $^{\circ}$ C in a 5% CO₂ incubator with culture medium (20,000 cells/ mm^2) (see **Note 14**).

4 Notes

1. Some suppliers sell penicillin/streptomycin (Pen/Strep) mix already prepared at a 100 \times concentration.
2. These steps are common for both phenotyping and isolation of bone marrow macrophages.
3. The results and the example presented here have been performed with 3-month-old C57BL/6 male mice.
4. All animals must be handled and sacrificed in compliance with the institutional guidelines and in accordance with the Animal Ethics Committee recommendations. We personally chose to sacrifice the mice with cervical dislocation.
5. To count the cells, we chose to use the Scepter Handheld Automated Cell Counter with 40 μ m sensors (Merck), but any efficient counting method may be used.
6. Phenotyping of the bone marrow was performed on a LSRII flow cytometer (BD Bioscience).
7. The analysis was performed with the FlowJo software.
8. This step is a negative selection with magnetic cell sorting (MACS).
9. This step will discard lymphocytes, neutrophils, and monocytes.

10. The volume of column buffer to prepare must be calculated each time depending on the number of mice, cells collected, and columns you use for your experiment. However, we consider that a volume of 45 mL of column buffer for 1 mice (around 50 million bone marrow cells) and 1 column is enough.
11. For **steps 7–11** you can refer to the manufacturer's protocol: Anti-Biotin Microbeads, Ref. 130-090-485, Miltenyi Biotec.
12. At this stage, you have 10% remaining bone marrow cells.
13. The sort was performed with a SORP ARIA II cytometer (BD Bioscience).
14. It is possible to keep those cells in culture for a maximum of 5 days.

The morphology of sorted macrophages is round and they do not seem to have a phagocytic activity. The seeding density doesn't seem to have an incidence on the growing of the cells.

References

1. Chow A, Lucas D, Hidalgo A et al (2011) 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
2. Christopher MJ, Rao M, Liu F et al (2011) 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
3. Winkler IG, Sims NA, Pettit AR et al (2010) Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cells (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood* 116:4815–4828
4. Ehninger A, Trumpp A (2011) The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J Exp Med* 208:421–428
5. Chow A, Huggins M, Ahmed J et al (2013) CD169+ macrophages provide a niche promoting erythropoiesis under homeostasis and stress. *Nat Med* 19:429–436
6. Hashimoto D, Chow A, Noizat C et al (2013) Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38:792–804

Références

- Abernathy, L.M., Fountain, M.D., Rothstein, S.E., David, J.M., Yunker, C.K., Rakowski, J., Lonardo, F., Joiner, M.C., and Hillman, G.G. (2015). Soy Isoflavones Promote Radioprotection of Normal Lung Tissue by Inhibition of Radiation-Induced Activation of Macrophages and Neutrophils. *J. Thorac. Oncol.* *10*, 1703–1712.
- Acar, M., Kocherlakota, K.S., Murphy, M.M., Peyer, J.G., Oguro, H., Inra, C.N., Jaiyeola, C., Zhao, Z., Luby-Phelps, K., and Morrison, S.J. (2015). Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature* *526*, 126–130.
- Adams, G.B., Chabner, K.T., Alley, I.R., Olson, D.P., Szczepiorkowski, Z.M., Poznansky, M.C., Kos, C.H., Pollak, M.R., Brown, E.M., and Scadden, D.T. (2006). Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature* *439*, 599–603.
- Adams, G.B., Martin, R.P., Alley, I.R., Chabner, K.T., Cohen, K.S., Calvi, L.M., Kronenberg, H.M., and Scadden, D.T. (2007). Therapeutic targeting of a stem cell niche. *Nat. Biotechnol.* *25*, 7.
- Adolfsson, J., Månsson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C.T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.-J., Thoren, L.A.M., et al. (2005). Identification of Flt3⁺ Lympho-Myeloid Stem Cells Lacking Erythro-Megakaryocytic Potential. *Cell* *121*, 295–306.
- Ahmed, K.M., and Li, J.J. (2008). NF- κ B-mediated adaptive resistance to ionizing radiation. *Free Radic. Biol. Med.* *44*, 1–13.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* *404*, 193–197.
- Albiero, M., Poncina, N., Ciciliot, S., Cappellari, R., Menegazzo, L., Ferraro, F., Bolego, C., Cignarella, A., Avogaro, A., and Fadini, G.P. (2015). Bone Marrow Macrophages Contribute to Diabetic Stem Cell Mobilopathy by Producing Oncostatin M. *Diabetes* *64*, 2957–2968.
- Alvarez, B., Demicheli, V., Durán, R., Trujillo, M., Cerveñansky, C., Freeman, B.A., and Radi, R. (2004). Inactivation of human Cu,Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidiny radical. *Free Radic. Biol. Med.* *37*, 813–822.
- Ambrosi, T.H., Scialdone, A., Graja, A., Gohlke, S., Jank, A.-M., Bocian, C., Woelk, L., Fan, H., Logan, D.W., Schürmann, A., et al. (2017). Adipocyte Accumulation in the Bone Marrow during Obesity and Aging Impairs Stem Cell-Based Hematopoietic and Bone Regeneration. *Cell Stem Cell* *20*, 771-784.e6.
- Ameziane-El-Hassani, R., Talbot, M., de Souza Dos Santos, M.C., Al Ghuzlan, A., Hartl, D., Bidart, J.-M., De Deken, X., Miot, F., Diallo, I., de Vathaire, F., et al. (2015). NADPH oxidase DUOX1 promotes long-term persistence of oxidative stress after an exposure to irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 5051–5056.

Ansó, E., Weinberg, S.E., Diebold, L.P., Thompson, B.J., Malinge, S., Schumacker, P.T., Liu, X., Zhang, Y., Shao, Z., Steadman, M., et al. (2017). The mitochondrial respiratory chain is essential for haematopoietic stem cell function. *Nat. Cell Biol.* *19*, 614–625.

Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G.Y., and Suda, T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* *118*, 149–161.

Arnold, C.P., Tan, R., Zhou, B., Yue, S.-B., Schaffert, S., Biggs, J.R., Doyonnas, R., Lo, M.-C., Perry, J.M., Renault, V.M., et al. (2011). MicroRNA programs in normal and aberrant stem and progenitor cells. *Genome Res.* *21*, 798–810.

Artyomov, M.N., Lis, M., Devadas, S., Davis, M.M., and Chakraborty, A.K. (2010). CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 16916–16921.

Asada, N., Katayama, Y., Sato, M., Minagawa, K., Wakahashi, K., Kawano, H., Kawano, Y., Sada, A., Ikeda, K., Matsui, T., et al. (2013). Matrix-embedded osteocytes regulate mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Stem Cell* *12*, 737–747.

Asada, N., Kunisaki, Y., Pierce, H., Wang, Z., Fernandez, N.F., Birbrair, A., Ma'ayan, A., and Frenette, P.S. (2017). Differential cytokine contributions of perivascular haematopoietic stem cell niches. *Nat. Cell Biol.* *19*, 214–223.

Asano, K., Takahashi, N., Ushiki, M., Monya, M., Aihara, F., Kuboki, E., Moriyama, S., Iida, M., Kitamura, H., Qiu, C.-H., et al. (2015). Intestinal CD169(+) macrophages initiate mucosal inflammation by secreting CCL8 that recruits inflammatory monocytes. *Nat. Commun.* *6*, 7802.

Aubrey, B.J., Kelly, G.L., Janic, A., Herold, M.J., and Strasser, A. (2018). How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ.* *25*, 104–113.

Audzevich, T., Bashford-Rogers, R., Mabbott, N.A., Frampton, D., Freeman, T.C., Potocnik, A., Kellam, P., and Gilroy, D.W. (2017). Pre/pro-B cells generate macrophage populations during homeostasis and inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, E3954–E3963.

Avila, A.I., Illing, A., Becker, F., Maerz, L.D., Morita, Y., Philipp, M., and Burkhalter, M.D. (2016). Xpg limits the expansion of haematopoietic stem and progenitor cells after ionising radiation. *Nucleic Acids Res.* *44*, 6252–6261.

Babior, B.M. (2004). NADPH oxidase. *Curr. Opin. Immunol.* *16*, 42–47.

Baccin, C., Al-Sabah, J., Velten, L., Helbling, P.M., Grünschläger, F., Hernández-Malmierca, P., Nombela-Arrieta, C., Steinmetz, L.M., Trumpp, A., and Haas, S. (2020). Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization. *Nat. Cell Biol.* *22*, 38–48.

- de Back, D.Z., Kostova, E.B., van Kraaij, M., van den Berg, T.K., and van Bruggen, R. (2014). Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Front. Physiol.* 5, 9.
- Bain, C.C., Bravo-Blas, A., Scott, C.L., Perdiguero, E.G., Geissmann, F., Henri, S., Malissen, B., Osborne, L.C., Artis, D., and Mowat, A.M. (2014). Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat. Immunol.* 15, 929–937.
- Bajayo, A., Bar, A., Denes, A., Bachar, M., Kram, V., Attar-Namdar, M., Zallone, A., Kovács, K.J., Yirmiya, R., and Bab, I. (2012). Skeletal parasympathetic innervation communicates central IL-1 signals regulating bone mass accrual. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 15455–15460.
- Balazs, A.B., Fabian, A.J., Esmon, C.T., and Mulligan, R.C. (2006). Endothelial protein C receptor (CD201) explicitly identifies hematopoietic stem cells in murine bone marrow. *Blood* 107, 2317–2321.
- Ban, N., and Kai, M. (2009). Implication of replicative stress-related stem cell ageing in radiation-induced murine leukaemia. *Br. J. Cancer* 101, 363–371.
- Baryawno, N., Przybylski, D., Kowalczyk, M.S., Kfoury, Y., Severe, N., Gustafsson, K., Kokkaliaris, K.D., Mercier, F., Tabaka, M., Hofree, M., et al. (2019). A Cellular Taxonomy of the Bone Marrow Stroma in Homeostasis and Leukemia. *Cell* 177, 1915-1932.e16.
- Basu, S., Broxmeyer, H.E., and Hangoc, G. (2013). Peroxisome proliferator-activated- γ coactivator-1 α -mediated mitochondrial biogenesis is important for hematopoietic recovery in response to stress. *Stem Cells Dev.* 22, 1678–1692.
- Batoon, L., Millard, S.M., Wullschleger, M.E., Preda, C., Wu, A.C.-K., Kaur, S., Tseng, H.-W., Hume, D.A., Levesque, J.-P., Raggatt, L.J., et al. (2019). CD169+ macrophages are critical for osteoblast maintenance and promote intramembranous and endochondral ossification during bone repair. *Biomaterials* 196, 51–66.
- Baxter, N.N., Habermann, E.B., Tepper, J.E., Durham, S.B., and Virnig, B.A. (2005). Risk of pelvic fractures in older women following pelvic irradiation. *JAMA* 294, 2587–2593.
- Becker, A.J., McCULLOCH, E.A., and Till, J.E. (1963). Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells. *Nature* 197, 452–454.
- Becker, A.J., Mcculloch, E.A., Siminovitch, L., and Till, J.E. (1965). THE EFFECT OF DIFFERING DEMANDS FOR BLOOD CELL PRODUCTION ON DNA SYNTHESIS BY HEMOPOIETIC COLONY-FORMING CELLS OF MICE. *Blood* 26, 296–308.
- Benveniste, P., Frelin, C., Janmohamed, S., Barbara, M., Herrington, R., Hyam, D., and Iscove, N.N. (2010). Intermediate-Term Hematopoietic Stem Cells with Extended but Time-Limited Reconstitution Potential. *Cell Stem Cell* 6, 48–58.

- Bermopohl, D., You, Z., Lo, E.H., Kim, H.-H., and Whalen, M.J. (2007). TNF alpha and Fas mediate tissue damage and functional outcome after traumatic brain injury in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *27*, 1806–1818.
- Bertrand, J.Y., Jalil, A., Klaine, M., Jung, S., Cumano, A., and Godin, I. (2005). Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood* *106*, 3004–3011.
- Birbrair, A., and Frenette, P.S. (2016). Niche heterogeneity in the bone marrow. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1370*, 82–96.
- Blum, J.S., Wearsch, P.A., and Cresswell, P. (2013). Pathways of Antigen Processing. *Annu. Rev. Immunol.* *31*, 443–473.
- Boettcher, S., Gerosa, R.C., Radpour, R., Bauer, J., Ampenberger, F., Heikenwalder, M., Kopf, M., and Manz, M.G. (2014). Endothelial cells translate pathogen signals into G-CSF-driven emergency granulopoiesis. *Blood* *124*, 1393–1403.
- Böiers, C., Carrelha, J., Lutteropp, M., Luc, S., Green, J.C.A., Azzoni, E., Woll, P.S., Mead, A.J., Hultquist, A., Swiers, G., et al. (2013). Lymphomyeloid Contribution of an Immune-Restricted Progenitor Emerging Prior to Definitive Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* *13*, 535–548.
- Boisset, J.-C., and Robin, C. (2012). On the origin of hematopoietic stem cells: progress and controversy. *Stem Cell Res.* *8*, 1–13.
- Boisset, J.-C., Clapes, T., Klaus, A., Papazian, N., Onderwater, J., Mommaas-Kienhuis, M., Cupedo, T., and Robin, C. (2015). Progressive maturation toward hematopoietic stem cells in the mouse embryo aorta. *125*, 5.
- Bolus, N.E. (2017). Basic Review of Radiation Biology and Terminology. *J. Nucl. Med. Technol.* *45*, 259–264.
- Borges, L., Oliveira, V.K.P., Baik, J., Bendall, S.C., and Perlingeiro, R.C.R. (2019). Serial transplantation reveals a critical role for endoglin in hematopoietic stem cell quiescence. *Blood* *133*, 688–696.
- Bornhäuser, M., Kienast, J., Trenschele, R., Burchert, A., Hegenbart, U., Stadler, M., Baurmann, H., Schäfer-Eckart, K., Holler, E., Kröger, N., et al. (2012). Reduced-intensity conditioning versus standard conditioning before allogeneic haemopoietic cell transplantation in patients with acute myeloid leukaemia in first complete remission: a prospective, open-label randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *13*, 1035–1044.
- Bourdieu, A., Avalon, M., Lapostolle, V., Ismail, S., Mombled, M., Debeissat, C., Guérinet, M., Duchez, P., Chevalerey, J., Vlaski-Lafarge, M., et al. (2018). Steady state peripheral blood provides cells with functional and metabolic characteristics of real hematopoietic stem cells. *J. Cell. Physiol.* *233*, 338–349.

- Bowers, M., Zhang, B., Ho, Y., Agarwal, P., Chen, C.-C., and Bhatia, R. (2015). Osteoblast ablation reduces normal long-term hematopoietic stem cell self-renewal but accelerates leukemia development. *Blood* *125*, 2678–2688.
- Bowie, M.B., Kent, D.G., Dykstra, B., McKnight, K.D., McCaffrey, L., Hoodless, P.A., and Eaves, C.J. (2007). Identification of a new intrinsically timed developmental checkpoint that reprograms key hematopoietic stem cell properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 5878–5882.
- Bradley, T.R., and Metcalf, D. (1966). The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* *44*, 287–299.
- Brandsma, I., and Gent, D.C. (2012). Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome Integr.* *3*, 9.
- Brenet, F., Kermani, P., Spektor, R., Rafii, S., and Scandura, J.M. (2013). TGF β restores hematopoietic homeostasis after myelosuppressive chemotherapy. *J. Exp. Med.* *210*, 623–639.
- Bruns, I., Lucas, D., Pinho, S., Ahmed, J., Lambert, M.P., Kunisaki, Y., Scheiermann, C., Schiff, L., Poncz, M., Bergman, A., et al. (2014). Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat. Med.* *20*, 1315–1320.
- Burnett, S.H., Kershen, E.J., Zhang, J., Zeng, L., Straley, S.C., Kaplan, A.M., and Cohen, D.A. (2004). Conditional macrophage ablation in transgenic mice expressing a Fas-based suicide gene. *J. Leukoc. Biol.* *75*, 612–623.
- Burney, S., Caulfield, J.L., Niles, J.C., Wishnok, J.S., and Tannenbaum, S.R. (1999). The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* *424*, 37–49.
- Butcher, S.K., O’Carroll, C.E., Wells, C.A., and Carmody, R.J. (2018). Toll-Like Receptors Drive Specific Patterns of Tolerance and Training on Restimulation of Macrophages. *Front. Immunol.* *9*, 933.
- Butler, J.M., Nolan, D.J., Vertes, E.L., Varnum-Finney, B., Kobayashi, H., Hooper, A.T., Seandel, M., Shido, K., White, I.A., Kobayashi, M., et al. (2010). Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* *6*, 251–264.
- Cabezas-Wallscheid, N., Klimmeck, D., Hansson, J., Lipka, D.B., Reyes, A., Wang, Q., Weichenhan, D., Lier, A., von Paleske, L., Renders, S., et al. (2014). Identification of regulatory networks in HSCs and their immediate progeny via integrated proteome, transcriptome, and DNA methylome analysis. *Cell Stem Cell* *15*, 507–522.
- Cain, K., Brown, D.G., Langlais, C., and Cohen, G.M. (1999). Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J. Biol. Chem.* *274*, 22686–22692.

- Cain, K., Bratton, S.B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D.G., Sun, X.M., and Cohen, G.M. (2000). Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J. Biol. Chem.* 275, 6067–6070.
- Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringham, F.R., et al. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841–846.
- Calvi, L.M., Bromberg, O., Rhee, Y., Weber, J.M., Smith, J.N.P., Basil, M.J., Frisch, B.J., and Bellido, T. (2012). Osteoblastic expansion induced by parathyroid hormone receptor signaling in murine osteocytes is not sufficient to increase hematopoietic stem cells. *Blood* 119, 2489–2499.
- Campbell-Valois, F.-X., Trost, M., Chemali, M., Dill, B.D., Laplante, A., Duclos, S., Sadeghi, S., Rondeau, C., Morrow, I.C., Bell, C., et al. (2012). Quantitative Proteomics Reveals That Only a Subset of the Endoplasmic Reticulum Contributes to the Phagosome. *Mol. Cell. Proteomics* 11, M111.016378-1-M111.016378-13.
- Capparelli, C., Chiavarina, B., Whitaker-Menezes, D., Pestell, T.G., Pestell, R.G., Hult, J., Andò, S., Howell, A., Martinez-Outschoorn, U.E., Sotgia, F., et al. (2012). CDK inhibitors (p16/p19/p21) induce senescence and autophagy in cancer-associated fibroblasts, “fueling” tumor growth via paracrine interactions, without an increase in neo-angiogenesis. *Cell Cycle* 11, 3599–3610.
- Cardnell, R.J.G., and Mikkelsen, R.B. (2011). Nitric oxide synthase inhibition enhances the antitumor effect of radiation in the treatment of squamous carcinoma xenografts. *PLoS One* 6, e20147.
- Casanova-Acebes, M., Pitaval, C., Weiss, L.A., Nombela-Arrieta, C., Chèvre, R., A-González, N., Kunisaki, Y., Zhang, D., van Rooijen, N., Silberstein, L.E., et al. (2013). Rhythmic Modulation of the Hematopoietic Niche through Neutrophil Clearance. *Cell* 153, 1025–1035.
- Caselli, A., Olson, T.S., Otsuru, S., Chen, X., Hofmann, T.J., Nah, H.-D., Grisendi, G., Paolucci, P., Dominici, M., and Horwitz, E.M. (2013). IGF-1-mediated osteoblastic niche expansion enhances long-term hematopoietic stem cell engraftment after murine bone marrow transplantation. *Stem Cells Dayt. Ohio* 31, 2193–2204.
- Caslin, H.L., Bhanot, M., Bolus, W.R., and Hasty, A.H. (2020). Adipose tissue macrophages: Unique polarization and bioenergetics in obesity. *Immunol. Rev.* 295, 101–113.
- Champagne, C.M., Takebe, J., Offenbacher, S., and Cooper, L.F. (2002). Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2. *Bone* 30, 26–31.
- Chan, D.C. (2012). Fusion and Fission: Interlinked Processes Critical for Mitochondrial Health. *Annu. Rev. Genet.* 46, 265–287.
- Chang, H.H.Y., Pannunzio, N.R., Adachi, N., and Lieber, M.R. (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 495–506.

- Chang, M.K., Raggatt, L.-J., Alexander, K.A., Kuliwaba, J.S., Fazzalari, N.L., Schroder, K., Maylin, E.R., Ripoll, V.M., Hume, D.A., and Pettit, A.R. (2008). Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *181*, 1232–1244.
- Chapman, J.R., Taylor, M.R.G., and Boulton, S.J. (2012). Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Mol. Cell* *47*, 497–510.
- Chasis, J.A., and Mohandas, N. (2008). Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood* *112*, 470–478.
- Chávez-Galán, L., Olleros, M.L., Vesin, D., and Garcia, I. (2015). Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+) Macrophages. *Front. Immunol.* *6*, 263.
- Chen, C., Boylan, M.T., Evans, C.A., Whetton, A.D., and Wright, E.G. (2005). Application of Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis to Studying Bone Marrow Macrophages and Their in Vivo Responses to Ionizing Radiation. *J. Proteome Res.* *4*, 1371–1380.
- Chen, C., Liu, Y., Liu, R., Ikenoue, T., Guan, K.-L., Liu, Y., and Zheng, P. (2008). TSC–mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. *J. Exp. Med.* *205*, 2397–2408.
- Chen, C.-Z., Li, M., de Graaf, D., Monti, S., Göttgens, B., Sanchez, M.-J., Lander, E.S., Golub, T.R., Green, A.R., and Lodish, H.F. (2002). Identification of endoglin as a functional marker that defines long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 15468–15473.
- Chen, J.Y., Miyanishi, M., Wang, S.K., Yamazaki, S., Sinha, R., Kao, K.S., Seita, J., Sahoo, D., Nakauchi, H., and Weissman, I.L. (2016). Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche. *Nature* *530*, 223–227.
- Chen, M.J., Li, Y., De Obaldia, M.E., Yang, Q., Yzaguirre, A.D., Yamada-Inagawa, T., Vink, C.S., Bhandoola, A., Dzierzak, E., and Speck, N.A. (2011). Erythroid/myeloid progenitors and hematopoietic stem cells originate from distinct populations of endothelial cells. *Cell Stem Cell* *9*, 541–552.
- Chen, Q., Liu, Y., Jeong, H.-W., Stehling, M., Dinh, V.V., Zhou, B., and Adams, R.H. (2019). Apelin+ Endothelial Niche Cells Control Hematopoiesis and Mediate Vascular Regeneration after Myeloablative Injury. *Cell Stem Cell* *25*, 768-783.e6.
- Cheng, T., Rodrigues, N., Shen, H., Yang, Y., Dombkowski, D., Sykes, M., and Scadden, D.T. (2000a). Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* *287*, 1804–1808.
- Cheng, T., Rodrigues, N., Dombkowski, D., Stier, S., and Scadden, D.T. (2000b). Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27(kip1). *Nat. Med.* *6*, 1235–1240.

Chikano, S., Sawada, K., Shimoyama, T., Kashiwamura, S.I., Sugihara, A., Sekikawa, K., Terada, N., Nakanishi, K., and Okamura, H. (2000). IL-18 and IL-12 induce intestinal inflammation and fatty liver in mice in an IFN-gamma dependent manner. *Gut* 47, 779–786.

Cho, I.J., Lui, P.P., Obajdin, J., Riccio, F., Stroukov, W., Willis, T.L., Spagnoli, F., and Watt, F.M. (2019). Mechanisms, Hallmarks, and Implications of Stem Cell Quiescence. *Stem Cell Rep.* 12, 1190–1200.

Choppin, G., Rydberg, J., and Liljenzin, J.-O. (2002). *Radiochemistry and Nuclear Chemistry* (Elsevier).

Choudhari, S.K., Chaudhary, M., Bagde, S., Gadbail, A.R., and Joshi, V. (2013). Nitric oxide and cancer: a review. *World J. Surg. Oncol.* 11, 118.

Chow, A., Lucas, D., Hidalgo, A., Méndez-Ferrer, S., Hashimoto, D., Scheiermann, C., Battista, M., Leboeuf, M., Prophete, C., van Rooijen, N., et al. (2011). 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.

Chow, A., Huggins, M., Ahmed, J., Hashimoto, D., Lucas, D., Kunisaki, Y., Pinho, S., Leboeuf, M., Noizat, C., van Rooijen, N., et al. (2013). CD169⁺ macrophages provide a niche promoting erythropoiesis under homeostasis and stress. *Nat. Med.* 19, 429–436.

Christensen, J.L., and Weissman, I.L. (2001). Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: A simple method to isolate long-term stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 14541–14546.

Christensen, J.L., Wright, D.E., Wagers, A.J., and Weissman, I.L. (2004). Circulation and Chemotaxis of Fetal Hematopoietic Stem Cells. *PLoS Biol.* 2, e75.

Christopher, M.J., Rao, M., Liu, F., Woloszynek, J.R., and Link, D.C. (2011). 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.

Chua, H.L., Plett, P.A., Sampson, C.H., Joshi, M., Tabbey, R., Katz, B.P., MacVittie, T.J., and Orschell, C.M. (2012). Long-Term Hematopoietic Stem Cell Damage in a Murine Model of the Hematopoietic Syndrome of the Acute Radiation Syndrome: *Health Phys.* 103, 356–366.

Chute, J.P., Muramoto, G.G., Salter, A.B., Meadows, S.K., Rickman, D.W., Chen, B., Himburg, H.A., and Chao, N.J. (2007). Transplantation of vascular endothelial cells mediates the hematopoietic recovery and survival of lethally irradiated mice. *Blood* 109, 2365–2372.

Coates, P.J., Rundle, J.K., Lorimore, S.A., and Wright, E.G. (2008). Indirect Macrophage Responses to Ionizing Radiation: Implications for Genotype-Dependent Bystander Signaling. *Cancer Res.* 68, 450–456.

Collins, L.S., and Dorshkind, K. (1987). A stromal cell line from myeloid long-term bone marrow cultures can support myelopoiesis and B lymphopoiesis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 138, 1082–1087.

- Conrad, S., Ritter, S., Fournier, C., and Nixdorff, K. (2009). Differential Effects of Irradiation with Carbon Ions and X-Rays on Macrophage Function. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* *50*, 223–231.
- Coppin, E., Florentin, J., Vasamsetti, S.B., Arunkumar, A., Sembrat, J., Rojas, M., and Dutta, P. (2018). Splenic hematopoietic stem cells display a pre-activated phenotype. *Immunol. Cell Biol.*
- Cory, S., and Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 647–656.
- Cossío, I., Lucas, D., and Hidalgo, A. (2019). Neutrophils as regulators of the hematopoietic niche. *Blood* *133*, 2140–2148.
- Costa, S., and Reagan, M.R. (2019). Therapeutic Irradiation: Consequences for Bone and Bone Marrow Adipose Tissue. *Front. Endocrinol.* *10*.
- Coutu, D.L., Kokkaliaris, K.D., Kunz, L., and Schroeder, T. (2017). Three-dimensional map of nonhematopoietic bone and bone-marrow cells and molecules. *Nat. Biotechnol.* *35*, 1202–1210.
- Crisan, M., and Dzierzak, E. (2016). The many faces of hematopoietic stem cell heterogeneity. *Dev. Camb. Engl.* *143*, 4571–4581.
- Cui, Y., Narasimhulu, C.A., Liu, L., Zhang, Q., Liu, P.Z., Li, X., Xiao, Y., Zhang, J., Hao, H., Xie, X., et al. (2015). N-acetylcysteine inhibits in vivo oxidation of native low-density lipoprotein. *Sci. Rep.* *5*, 16339.
- Cuminetti, V., and Arranz, L. (2019). Bone Marrow Adipocytes: The Enigmatic Components of the Hematopoietic Stem Cell Niche. *J. Clin. Med.* *8*, 707.
- Darici, S., Alkhalidi, H., Horne, G., Jørgensen, H.G., Marmioli, S., and Huang, X. (2020). Targeting PI3K/Akt/mTOR in AML: Rationale and Clinical Evidence. *J. Clin. Med.* *9*.
- Dayal, D., Martin, S.M., Owens, K.M., Aykin-Burns, N., Zhu, Y., Boominathan, A., Pain, D., Limoli, C.L., Goswami, P.C., Domann, F.E., et al. (2009). Mitochondrial Complex II Dysfunction Can Contribute Significantly to Genomic Instability after Exposure to Ionizing Radiation. *Radiat. Res.* *172*, 737–745.
- Decker, M., Leslie, J., Liu, Q., and Ding, L. (2018). Hepatic thrombopoietin is required for bone marrow hematopoietic stem cell maintenance. *Science* *360*, 106–110.
- Dejean, L.M., Martinez-Caballero, S., Manon, S., and Kinnally, K.W. (2006). Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1762*, 191–201.
- Denicola, A., Souza, J.M., and Radi, R. (1998). Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 3566–3571.

Desai, A., Qing, Y., and Gerson, S.L. (2014). Exonuclease 1 is a critical mediator of survival during DNA double strand break repair in nonquiescent hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 32, 582–593.

Desouky, O., Ding, N., and Zhou, G. (2015). Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 8, 247–254.

Dexter, T.M., Allen, T.D., and Lajtha, L.G. (1977). Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J. Cell. Physiol.* 91, 335–344.

DiMascio, L., Voermans, C., Uqoezwa, M., Duncan, A., Lu, D., Wu, J., Sankar, U., and Reya, T. (2007). Identification of Adiponectin as a Novel Hemopoietic Stem Cell Growth Factor. *J. Immunol.* 178, 3511–3520.

Ding, L., and Morrison, S.J. (2013). Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* 495, 231–235.

Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G., and Morrison, S.J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 481, 457–462.

Dinkova-Kostova, A.T., Kostov, R.V., and Canning, P. (2017). Keap1, the cysteine-based mammalian intracellular sensor for electrophiles and oxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* 617, 84–93.

Döerr, W. (2009). *Pathogenesis of normal-tissue side-effects* (CRC Press).

Domen, J., Gandy, K.L., and Weissman, I.L. (1998). Systemic overexpression of BCL-2 in the hematopoietic system protects transgenic mice from the consequences of lethal irradiation. *Blood* 91, 2272–2282.

Doyle, S.E., O'Connell, R.M., Miranda, G.A., Vaidya, S.A., Chow, E.K., Liu, P.T., Suzuki, S., Suzuki, N., Modlin, R.L., Yeh, W.-C., et al. (2004). Toll-like Receptors Induce a Phagocytic Gene Program through p38. *J. Exp. Med.* 199, 81–90.

Du, J., Chen, Y., Li, Q., Han, X., Cheng, C., Wang, Z., Danielpour, D., Dunwoodie, S.L., Bunting, K.D., and Yang, Y.-C. (2012). HIF-1 α deletion partially rescues defects of hematopoietic stem cell quiescence caused by Cited2 deficiency. *Blood* 119, 2789–2798.

Duffield, J.S., Forbes, S.J., Constandinou, C.M., Clay, S., Partolina, M., Vuthoori, S., Wu, S., Lang, R., and Iredale, J.P. (2005). Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J. Clin. Invest.* 115, 56–65.

Dutta, P., Hoyer, F.F., Grigoryeva, L.S., Sager, H.B., Leuschner, F., Courties, G., Borodovsky, A., Novobrantseva, T., Ruda, V.M., Fitzgerald, K., et al. (2015). Macrophages retain hematopoietic stem cells in the spleen via VCAM-1. *J. Exp. Med.* 212, 497–512.

Ekmekcioglu, S., Ellerhorst, J.A., Prieto, V.G., Johnson, M.M., Broemeling, L.D., and Grimm, E.A. (2006). Tumor iNOS predicts poor survival for stage III melanoma patients. *Int. J. Cancer* 119, 861–866.

El-Badri, N.S., Wang, B.Y., Cherry, null, and Good, R.A. (1998). Osteoblasts promote engraftment of allogeneic hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* *26*, 110–116.

Ensan, S., Li, A., Besla, R., Degousee, N., Cosme, J., Roufaiel, M., Shikatani, E.A., El-Maklizi, M., Williams, J.W., Robins, L., et al. (2016). Self-renewing resident arterial macrophages arise from embryonic CX3CR1+ precursors and circulating monocytes immediately after birth. *Nat. Immunol.* *17*, 13.

Epelman, S., Lavine, K.J., Beaudin, A.E., Sojka, D.K., Carrero, J.A., Calderon, B., Brija, T., Gautier, E.L., Ivanov, S., Satpathy, A.T., et al. (2014). Embryonic and Adult-Derived Resident Cardiac Macrophages Are Maintained through Distinct Mechanisms at Steady State and during Inflammation. *Immunity* *40*, 91–104.

Fabbrizi, M.R., Meyer, B., Misri, S., Raj, S., Zobel, C.L., Hallahan, D.E., and Sharma, G.G. (2018). Transient PP2A inhibition alleviates normal tissue stem cell susceptibility to cell death during radiotherapy. *Cell Death Dis.* *9*, 492.

Farhood, B., Ashrafizadeh, M., khodamoradi, E., Hoseini-Ghahfarokhi, M., Afrashi, S., Musa, A.E., and Najafi, M. (2020). Targeting of cellular redox metabolism for mitigation of radiation injury. *Life Sci.* *250*, 117570.

Farrés, J., Martín-Caballero, J., Martínez, C., Lozano, J.J., Llacuna, L., Ampurdanés, C., Ruiz-Herguido, C., Dantzer, F., Schreiber, V., Villunger, A., et al. (2013). Parp-2 is required to maintain hematopoiesis following sublethal γ -irradiation in mice. *Blood* *122*, 44–54.

Feinendegen, L.E., Pollycove, M., and Sondhaus, C.A. (2004). Responses to low doses of ionizing radiation in biological systems. *Nonlinearity Biol. Toxicol. Med.* *2*, 143–171.

Ferenbach, D.A., Sheldrake, T.A., Dhaliwal, K., Kipari, T.M.J., Marson, L.P., Kluth, D.C., and Hughes, J. (2012). Macrophage/monocyte depletion by clodronate, but not diphtheria toxin, improves renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Kidney Int.* *82*, 928–933.

Ferrand, M., Kirsh, O., Griveau, A., Vindrieux, D., Martin, N., Defossez, P.-A., and Bernard, D. (2015). Screening of a kinase library reveals novel pro-senescence kinases and their common NF- κ B-dependent transcriptional program. *Aging* *7*, 986–1003.

Ficara, F., Murphy, M.J., Lin, M., and Cleary, M.L. (2008). Pbx1 Regulates Self-Renewal of Long-Term Hematopoietic Stem Cells by Maintaining Their Quiescence. *Cell Stem Cell* *2*, 484–496.

Fischer-Riepe, L., Daber, N., Schulte-Schrepping, J., Véras De Carvalho, B.C., Russo, A., Pohlen, M., Fischer, J., Chasan, A.I., Wolf, M., Ulas, T., et al. (2020). CD163 expression defines specific, IRF8-dependent, immune-modulatory macrophages in the bone marrow. *J. Allergy Clin. Immunol.* *146*, 1137–1151.

Fitch, S.R., Kimber, G.M., Wilson, N.K., Parker, A., Mirshekar-Syahkal, B., Göttgens, B., Medvinsky, A., Dzierzak, E., and Ottersbach, K. (2012). Signaling from the sympathetic nervous system regulates hematopoietic stem cell emergence during embryogenesis. *Cell Stem Cell* *11*, 554–566.

Ford, E., Hamerton, L., Barnes, D.W.H., and Loutit, F. (1956). CYTOLOGICAL IDENTIFICATION OF RADIATION-CHIM/ERAS. 3.

Forristal, C.E., Winkler, I.G., Nowlan, B., Barbier, V., Walkinshaw, G., and Levesque, J.-P. (2013). Pharmacologic stabilization of HIF-1 α increases hematopoietic stem cell quiescence in vivo and accelerates blood recovery after severe irradiation. *Blood* 121, 759–769.

Forsberg, E.C., Serwold, T., Kogan, S., Weissman, I.L., and Passegué, E. (2006). New evidence supporting megakaryocyte-erythrocyte potential of flk2/flt3+ multipotent hematopoietic progenitors. *Cell* 126, 415–426.

Frenette, P.S., Pinho, S., Lucas, D., and Scheiermann, C. (2013). Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 285–316.

Frisch, B.J., and Calvi, L.M. (2014). Hematopoietic Stem Cell Cultures and Assays. In *Skeletal Development and Repair*, M.J. Hilton, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 315–324.

Frischholz, B., Wunderlich, R., Rühle, P.-F., Schorn, C., Rödel, F., Keilholz, L., Fietkau, R., Gaip, U.S., and Frey, B. (2013). Reduced secretion of the inflammatory cytokine IL-1 β by stimulated peritoneal macrophages of radiosensitive Balb/c mice after exposure to 0.5 or 0.7Gy of ionizing radiation. *Autoimmunity* 46, 323–328.

Fujisaki, J., Wu, J., Carlson, A.L., Silberstein, L., Putheti, P., Larocca, R., Gao, W., Saito, T.I., Celso, C.L., Tsuyuzaki, H., et al. (2011). In vivo imaging of Treg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche. *Nature* 474, 216–219.

Gan, B., Sahin, E., Jiang, S., Sanchez-Aguilera, A., Scott, K.L., Chin, L., Williams, D.A., Kwiatkowski, D.J., and DePinho, R.A. (2008). mTORC1-dependent and -independent regulation of stem cell renewal, differentiation, and mobilization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 19384–19389.

Gan, B., Hu, J., Jiang, S., Liu, Y., Sahin, E., Zhuang, L., Fletcher-Sananikone, E., Colla, S., Wang, Y.A., Chin, L., et al. (2010). Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells. *Nature* 468, 701–704.

Gao, X., Xu, C., Asada, N., and Frenette, P.S. (2018). The hematopoietic stem cell niche: from embryo to adult. *Dev. Camb. Engl.* 145.

Garcia, M.D., and Larina, I.V. (2014). Vascular development and hemodynamic force in the mouse yolk sac. *Front. Physiol.* 5, 308.

García-García, A., Korn, C., García-Fernández, M., Domingues, O., Villadiego, J., Martín-Pérez, D., Isern, J., Bejarano-García, J.A., Zimmer, J., Pérez-Simón, J.A., et al. (2019). Dual cholinergic signals regulate daily migration of hematopoietic stem cells and leukocytes. *Blood* 133, 224–236.

Garvey, E.P., Oplinger, J.A., Furfine, E.S., Kiff, R.J., Laszlo, F., Whittle, B.J., and Knowles, R.G. (1997). 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* *272*, 4959–4963.

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* *330*, 841–845.

Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., and Huber, T. (2013). Origin and differentiation of microglia. *Front. Cell. Neurosci.* *7*, 45.

Gire, V., and Dulić, V. (2015). Senescence from G2 arrest, revisited. *Cell Cycle* *14*, 297–304.

Glatman Zaretsky, A., Konradt, C., Dépis, F., Wing, J.B., Goenka, R., Atria, D.G., Silver, J.S., Cho, S., Wolf, A.I., Quinn, W.J., et al. (2017). T Regulatory Cells Support Plasma Cell Populations in the Bone Marrow. *Cell Rep.* *18*, 1906–1916.

Glowacki, S., Synowiec, E., and Blasiak, J. (2013). The Role of Mitochondrial DNA Damage and Repair in the Resistance of BCR/ABL-Expressing Cells to Tyrosine Kinase Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 16348–16364.

Glynn, S.A., Boersma, B.J., Dorsey, T.H., Yi, M., Yfantis, H.G., Ridnour, L.A., Martin, D.N., Switzer, C.H., Hudson, R.S., Wink, D.A., et al. (2010). Increased NOS2 predicts poor survival in estrogen receptor-negative breast cancer patients. *J. Clin. Invest.* *120*, 3843–3854.

Golan, K., Vagima, Y., Ludin, A., Itkin, T., Cohen-Gur, S., Kalinkovich, A., Kollet, O., Kim, C., Schajnovitz, A., Ovadya, Y., et al. (2012). S1P promotes murine progenitor cell egress and mobilization via S1P1-mediated ROS signaling and SDF-1 release. *Blood* *119*, 2478–2488.

Golan, K., Kumari, A., Kollet, O., Khatib-Massalha, E., Subramaniam, M.D., Ferreira, Z.S., Avemaria, F., Rzeszotek, S., García-García, A., Xie, S., et al. (2018). Daily Onset of Light and Darkness Differentially Controls Hematopoietic Stem Cell Differentiation and Maintenance. *Cell Stem Cell* *23*, 572-585.e7.

Goldman, D.C., Bailey, A.S., Pfaffle, D.L., Al Masri, A., Christian, J.L., and Fleming, W.H. (2009). BMP4 regulates the hematopoietic stem cell niche. *Blood* *114*, 4393–4401.

Goldmann, T., Wieghofer, P., Jordão, M.J.C., Prutek, F., Hagemeyer, N., Frenzel, K., Amann, L., Staszewski, O., Kierdorf, K., Krueger, M., et al. (2016). Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nat. Immunol.* *17*, 797–805.

Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., et al. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* *518*, 547–551.

Goncharova, V., Serobyan, N., Iizuka, S., Schraufstatter, I., de Ridder, A., Povaliy, T., Wacker, V., Itano, N., Kimata, K., Orlovskaja, I.A., et al. (2012). Hyaluronan Expressed by the Hematopoietic Microenvironment Is Required for Bone Marrow Hematopoiesis. *J. Biol. Chem.* *287*, 25419–25433.

- Gong, J.K. (1978). Endosteal marrow: a rich source of hematopoietic stem cells. *Science* *199*, 1443–1445.
- Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S., and Mulligan, R.C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med.* *183*, 1797–1806.
- Grabowska, J., Lopez-Venegas, M.A., and Affandi, A.J. (2018). CD169+ Macrophages Capture and Dendritic Cells Instruct: The Interplay of the Gatekeeper and the General of the Immune System. *Front. Immunol.* *9*, 14.
- Green, D.E., and Rubin, C.T. (2014). Consequences of irradiation on bone and marrow phenotypes, and its relation to disruption of hematopoietic precursors. *Bone* *63*, 87–94.
- Greenbaum, A., Hsu, Y.-M.S., Day, R.B., Schuettepelz, L.G., Christopher, M.J., Borgerding, J.N., Nagasawa, T., and Link, D.C. (2013). CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* *495*, 227–230.
- Guéguen, Y., Bontemps, A., and Ebrahimian, T.G. (2019). Adaptive responses to low doses of radiation or chemicals: their cellular and molecular mechanisms. *Cell. Mol. Life Sci.* *76*, 1255–1273.
- Guihard, P., Boutet, M.-A., Brounais-Le Royer, B., Gamblin, A.-L., Amiaud, J., Renaud, A., Berreur, M., Rédini, F., Heymann, D., Layrolle, P., et al. (2015). Oncostatin m, an inflammatory cytokine produced by macrophages, supports intramembranous bone healing in a mouse model of tibia injury. *Am. J. Pathol.* *185*, 765–775.
- Guo, C.-Y., Luo, L., Urata, Y., Goto, S., Huang, W.-J., Takamura, S., Hayashi, F., Doi, H., Kitajima, Y., Ono, Y., et al. (2015). Sensitivity and dose dependency of radiation-induced injury in hematopoietic stem/progenitor cells in mice. *Sci. Rep.* *5*, 8055.
- Guo, P., Poulos, M.G., Palikuqi, B., Badwe, C.R., Lis, R., Kunar, B., Ding, B.-S., Rabbany, S.Y., Shido, K., Butler, J.M., et al. (2017). Endothelial jagged-2 sustains hematopoietic stem and progenitor reconstitution after myelosuppression. *J. Clin. Invest.* *127*, 15.
- Gupta, P., Lai, S.M., Sheng, J., Tetlak, P., Balachander, A., Claser, C., Renia, L., Karjalainen, K., and Ruedl, C. (2016). Tissue-Resident CD169(+) Macrophages Form a Crucial Front Line against Plasmodium Infection. *Cell Rep.* *16*, 1749–1761.
- Gur-Cohen, S., Itkin, T., Chakrabarty, S., Graf, C., Kollet, O., Ludin, A., Golan, K., Kalinkovich, A., Ledergor, G., Wong, E., et al. (2015). PAR1 signaling regulates the retention and recruitment of EPCR-expressing bone marrow hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* *21*, 1307–1317.
- Gurumurthy, S., Xie, S.Z., Alagesan, B., Kim, J., Yusuf, R.Z., Saez, B., Tzatsos, A., Ozsolak, F., Milos, P., Ferrari, F., et al. (2010). The Lkb1 metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival. *Nature* *468*, 659–663.

Haas, S., Trumpp, A., and Milsom, M.D. (2018). Causes and Consequences of Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity. *Cell Stem Cell* 22, 627–638.

Habraken, Y., and Piette, J. (2006). NF- κ B activation by double-strand breaks. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1132–1141.

Haldar, M., Kohyama, M., So, A.Y.-L., Kc, W., Wu, X., Briseño, C.G., Satpathy, A.T., Kretzer, N.M., Arase, H., Rajasekaran, N.S., et al. (2014). Heme-mediated SPI-C induction promotes monocyte differentiation into iron-recycling macrophages. *Cell* 156, 1223–1234.

Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 125–130.

Hamada, N., and Fujimichi, Y. (2014). Classification of radiation effects for dose limitation purposes: history, current situation and future prospects. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 55, 629–640.

Hao, S., Chen, C., and Cheng, T. (2016). Cell cycle regulation of hematopoietic stem or progenitor cells. *Int. J. Hematol.* 103, 487–497.

Harms, K., Nozell, S., and Chen, X. (2004). The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 61, 822–842.

Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., et al. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38, 792–804.

Hatanaka, Y., Fujii, J., Fukutomi, T., Watanabe, T., Che, W., Sanada, Y., Igarashi, Y., and Taniguchi, N. (1998). Reactive oxygen species enhances the induction of inducible nitric oxide synthase by sphingomyelinase in RAW264.7 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1393, 203–210.

Havaki, S., Kotsinas, A., Chronopoulos, E., Kletsas, D., Georgakilas, A., and Gorgoulis, V.G. (2015). The role of oxidative DNA damage in radiation induced bystander effect. *Cancer Lett.* 356, 43–51.

Heckler, M., Osterberg, N., Guenzle, J., Thiede-Stan, N.K., Reichardt, W., Weidensteiner, C., Saavedra, J.E., and Weyerbrock, A. (2017). The nitric oxide donor JS-K sensitizes U87 glioma cells to repetitive irradiation. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 39, 1010428317703922.

Helbling, P.M., Piñeiro-Yáñez, E., Gerosa, R., Boettcher, S., Al-Shahrour, F., Manz, M.G., and Nombela-Arrieta, C. (2019). Global Transcriptomic Profiling of the Bone Marrow Stromal Microenvironment during Postnatal Development, Aging, and Inflammation. *Cell Rep.* 29, 3313-3330.e4.

Hellberg, C.B., Boggs, S.E., and Lapetina, E.G. (1998). Phosphatidylinositol 3-Kinase Is a Target for Protein Tyrosine Nitration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252, 313–317.

Hiemstra, I.H., Beijer, M.R., Veninga, H., Vrijland, K., Borg, E.G.F., Olivier, B.J., Mebius, R.E., Kraal, G., and den Haan, J.M.M. (2014). The identification and developmental requirements of colonic CD169⁺ macrophages. *Immunology* *142*, 269–278.

Hildebrandt, G., Seed, M.P., Freemantle, C.N., Alam, C.A., Colville-Nash, P.R., and Trott, K.R. (1998). Mechanisms of the anti-inflammatory activity of low-dose radiation therapy. *Int. J. Radiat. Biol.* *74*, 367–378.

Hildebrandt, G., Loppnow, G., Jahns, J., Hindemith, M., Anderegg, U., Saalbach, A., and Kamprad, F. (2003). Inhibition of the iNOS pathway in inflammatory macrophages by low-dose X-irradiation in vitro. Is there a time dependence? *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Rontgenesellschaft AI* *179*, 158–166.

Himburg, H.A., Termini, C.M., Schluskel, L., Kan, J., Li, M., Zhao, L., Fang, T., Sasine, J.P., Chang, V.Y., and Chute, J.P. (2018). Distinct Bone Marrow Sources of Pleiotrophin Control Hematopoietic Stem Cell Maintenance and Regeneration. *Cell Stem Cell* *23*, 370-381.e5.

Hirata, Y., Furuhashi, K., Ishii, H., Li, H.W., Pinho, S., Ding, L., Robson, S.C., Frenette, P.S., and Fujisaki, J. (2018). CD150^{high} Bone Marrow Tregs Maintain Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Immune Privilege via Adenosine. *Cell Stem Cell* *22*, 445-453.e5.

Hirayama, D., Iida, T., and Nakase, H. (2017). The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* *19*.

Hirotsu, Y., Katsuoka, F., Funayama, R., Nagashima, T., Nishida, Y., Nakayama, K., Douglas Engel, J., and Yamamoto, M. (2012). Nrf2–MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks. *Nucleic Acids Res.* *40*, 10228–10239.

Ho, T.T., Warr, M.R., Adelman, E.R., Lansinger, O.M., Flach, J., Verovskaya, E.V., Figueroa, M.E., and Passequé, E. (2017). Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. *Nature* *543*, 205–210.

Hoeffel, G., and Ginhoux, F. (2018). Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. *Cell. Immunol.* *330*, 5–15.

Hoeffel, G., Chen, J., Lavin, Y., Low, D., Almeida, F.F., See, P., Beaudin, A.E., Lum, J., Low, I., Forsberg, E.C., et al. (2015). C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity* *42*, 665–678.

Hoggatt, J., Mohammad, K.S., Singh, P., Hoggatt, A.F., Chitteti, B.R., Speth, J.M., Hu, P., Poteat, B.A., Stilger, K.N., Ferraro, F., et al. (2013). Differential stem- and progenitor-cell trafficking by prostaglandin E2. *Nature* *495*, 365–369.

Holley, A.K., Miao, L., St Clair, D.K., and St Clair, W.H. (2014). Redox-modulated phenomena and radiation therapy: the central role of superoxide dismutases. *Antioxid. Redox Signal.* *20*, 1567–1589.

- Hosoi, Y., Miyachi, H., Matsumoto, Y., Enomoto, A., Nakagawa, K., Suzuki, N., and Ono, T. (2001). Induction of interleukin-1beta and interleukin-6 mRNA by low doses of ionizing radiation in macrophages. *Int. J. Cancer* *96*, 270–276.
- Hoyes, K.P., Cai, W.B., Potten, C.S., and Hendry, J.H. (2000). Effect of bcl-2 deficiency on the radiation response of clonogenic cells in small and large intestine, bone marrow and testis. *Int. J. Radiat. Biol.* *76*, 1435–1442.
- Hu, M., and Wang, J. (2019). Mitochondrial metabolism and the maintenance of hematopoietic stem cell quiescence. *Curr. Opin. Hematol.* *26*, 228–234.
- Hu, L., Zhang, Y., Miao, W., and Cheng, T. (2019). Reactive Oxygen Species and Nrf2: Functional and Transcriptional Regulators of Hematopoiesis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2019*, 1–11.
- Hu, M., Zeng, H., Chen, S., Xu, Y., Wang, S., Tang, Y., Wang, X., Du, C., Shen, M., Chen, F., et al. (2018). SRC-3 is involved in maintaining hematopoietic stem cell quiescence by regulation of mitochondrial metabolism in mice. *Blood* *132*, 911–923.
- Hu, M., Lu, Y., Zeng, H., Zhang, Z., Chen, S., Qi, Y., Xu, Y., Chen, F., Tang, Y., Chen, M., et al. (2020). MicroRNA-21 maintains hematopoietic stem cell homeostasis through sustaining the NF-κB signaling pathway in mice. *Haematologica*.
- Hu, W., Dooley, J., Chung, S.S., Chandramohan, D., Cimmino, L., Mukherjee, S., Mason, C.E., de Strooper, B., Liston, A., and Park, C.Y. (2015). miR-29a maintains mouse hematopoietic stem cell self-renewal by regulating Dnmt3a. *Blood* *125*, 2206–2216.
- Huie, R.E., and Padmaja, S. (1993). The Reaction of NO With Superoxide. *Free Radic. Res. Commun.* *18*, 195–199.
- Hur, J., Choi, J.-I., Lee, H., Nham, P., Kim, T.-W., Chae, C.-W., Yun, J.-Y., Kang, J.-A., Kang, J., Lee, S.E., et al. (2016). CD82/KAI1 Maintains the Dormancy of Long-Term Hematopoietic Stem Cells through Interaction with DARC-Expressing Macrophages. *Cell Stem Cell* *18*, 508–521.
- Ibuki, Y., and Goto, R. (1997). Enhancement of NO production from resident peritoneal macrophages by in vitro gamma-irradiation and its relationship to reactive oxygen intermediates. *Free Radic. Biol. Med.* *22*, 1029–1035.
- Ibuki, Y., and Goto, R. (1999). Contribution of inflammatory cytokine release to activation of resident peritoneal macrophages after in vivo low-dose gamma-irradiation. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* *40*, 253–262.
- Ibuki, Y., Mizuno, S., and Goto, R. (2003). γ-Irradiation-induced DNA damage enhances NO production via NF-κB activation in RAW264.7 cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1593*, 159–167.
- Ikushima, Y.M., Arai, F., Hosokawa, K., Toyama, H., Takubo, K., Furuyashiki, T., Narumiya, S., and Suda, T. (2013). Prostaglandin E(2) regulates murine hematopoietic stem/progenitor

cells directly via EP4 receptor and indirectly through mesenchymal progenitor cells. *Blood* *121*, 1995–2007.

Ikuta, K., Uchida, N., Friedman, J., and Weissman, I.L. (1992). Lymphocyte development from stem cells. *Annu. Rev. Immunol.* *10*, 759–783.

Inpanathan, S., and Botelho, R.J. (2019). The Lysosome Signaling Platform: Adapting With the Times. *Front. Cell Dev. Biol.* *7*, 113.

Insinga, A., Cicalese, A., Faretta, M., Gallo, B., Albano, L., Ronzoni, S., Furia, L., Viale, A., and Pelicci, P.G. (2013). DNA damage in stem cells activates p21, inhibits p53, and induces symmetric self-renewing divisions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 3931–3936.

Itkin, T., Gur-Cohen, S., Spencer, J.A., Schajnovitz, A., Ramasamy, S.K., Kusumbe, A.P., Ledergor, G., Jung, Y., Milo, I., Poulos, M.G., et al. (2016). Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature* *532*, 323–328.

Ito, K., and Suda, T. (2014). Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 243–256.

Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Matsuoka, S., Takubo, K., Hamaguchi, I., Nomiyama, K., Hosokawa, K., Sakurada, K., Nakagata, N., et al. (2004). Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* *431*, 997–1002.

Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., Ohmura, M., Naka, K., Hosokawa, K., Ikeda, Y., et al. (2006). Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* *12*, 446–451.

Ito, K., Carracedo, A., Weiss, D., Arai, F., Ala, U., Avigan, D.E., Schafer, Z.T., Evans, R.M., Suda, T., Lee, C.-H., et al. (2012). A PML–PPAR- δ pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nat. Med.* *18*, 1350–1358.

Ito, K., Turcotte, R., Cui, J., Zimmerman, S.E., Pinho, S., Mizoguchi, T., Arai, F., Runnels, J.M., Alt, C., Teruya-Feldstein, J., et al. (2016). Self-renewal of a purified Tie2⁺ hematopoietic stem cell population relies on mitochondrial clearance. *Science* *354*, 1156–1160.

Itoh, K., Tezuka, H., Sakoda, H., Konno, M., Nagata, K., Uchiyama, T., Uchino, H., and Mori, K.J. (1989). Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow. *Exp. Hematol.* *17*, 145–153.

Iwasa, H., Han, J., and Ishikawa, F. (2003). Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway: p38 activation in senescence. *Genes Cells* *8*, 131–144.

Jacobsen, R.N., Forristal, C.E., Raggatt, L.J., Nowlan, B., Barbier, V., Kaur, S., van Rooijen, N., Winkler, I.G., Pettit, A.R., and Levesque, J.-P. (2014). Mobilization with granulocyte colony-stimulating factor blocks medullar erythropoiesis by depleting F4/80(+)VCAM1(+)CD169(+)ER-HR3(+)Ly6G(+) erythroid island macrophages in the mouse. *Exp. Hematol.* *42*, 547-561.e4.

- Jacobsen, R.N., Nowlan, B., Brunck, M.E., Barbier, V., Winkler, I.G., and Levesque, J.-P. (2016). Fms-like tyrosine kinase 3 (Flt3) ligand depletes erythroid island macrophages and blocks medullar erythropoiesis in the mouse. *Exp. Hematol.* *44*, 207-212.e4.
- Javan, G.T., Salhotra, A., Finley, S.J., and Soni, S. (2018). Erythroblast macrophage protein (Emp): Past, present, and future. *Eur. J. Haematol.* *100*, 3–9.
- Johmura, Y., Shimada, M., Misaki, T., Naiki-Ito, A., Miyoshi, H., Motoyama, N., Ohtani, N., Hara, E., Nakamura, M., Morita, A., et al. (2014). Necessary and sufficient role for a mitosis skip in senescence induction. *Mol. Cell* *55*, 73–84.
- Johnson, S.M., Torrice, C.D., Bell, J.F., Monahan, K.B., Jiang, Q., Wang, Y., Ramsey, M.R., Jin, J., Wong, K.-K., Su, L., et al. (2010). Mitigation of hematologic radiation toxicity in mice through pharmacological quiescence induced by CDK4/6 inhibition. *J. Clin. Invest.* *120*, 2528–2536.
- Joiner, M.C., Marples, B., Lambin, P., Short, S.C., and Turesson, I. (2001). Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms. *Int. J. Radiat. Oncol.* *49*, 379–389.
- Jordan, B.F., Beghein, N., Aubry, M., Grégoire, V., and Gallez, B. (2003). Potentiation of radiation-induced regrowth delay by isosorbide dinitrate in FSall murine tumors. *Int. J. Cancer* *103*, 138–141.
- Joshi, M.S., Ferguson, T.B., Han, T.H., Hyduke, D.R., Liao, J.C., Rassaf, T., Bryan, N., Feelisch, M., and Lancaster, J.R. (2002). Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 10341–10346.
- Jung, H.E., Shim, Y.R., Oh, J.E., Oh, D.S., and Lee, H.K. (2019). The autophagy Protein Atg5 Plays a Crucial Role in the Maintenance and Reconstitution Ability of Hematopoietic Stem Cells. *Immune Netw.* *19*, e12.
- Jung, Y., Wang, J., Schneider, A., Sun, Y.-X., Koh-Paige, A.J., Osman, N.I., McCauley, L.K., and Taichman, R.S. (2006). Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing. *Bone* *38*, 497–508.
- Juntilla, M.M., Patil, V.D., Calamito, M., Joshi, R.P., Birnbaum, M.J., and Koretzky, G.A. (2010). AKT1 and AKT2 maintain hematopoietic stem cell function by regulating reactive oxygen species. *Blood* *115*, 4030–4038.
- Kadri, Z., Lefevre, C., Goupille, O., Penglong, T., Granger-Locatelli, M., Fucharoen, S., Maouche-Chretien, L., Leboulch, P., and Chretien, S. (2015). Erythropoietin and IGF-1 signaling synchronize cell proliferation and maturation during erythropoiesis. *Genes Dev.* *29*, 2603–2616.
- Kalaitzidis, D., Sykes, S.M., Wang, Z., Punt, N., Tang, Y., Ragu, C., Sinha, A.U., Lane, S.W., Souza, A.L., Clish, C.B., et al. (2012). mTOR Complex 1 Plays Critical Roles in Hematopoiesis and Pten-Loss-Evoked Leukemogenesis. *Cell Stem Cell* *11*, 429–439.

- Kambara, K., Ohashi, W., Tomita, K., Takashina, M., Fujisaka, S., Hayashi, R., Mori, H., Tobe, K., and Hattori, Y. (2015). In vivo depletion of CD206+ M2 macrophages exaggerates lung injury in endotoxemic mice. *Am. J. Pathol.* *185*, 162–171.
- Kambayashi, T., and Laufer, T.M. (2014). Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 719–730.
- Katayama, Y., Battista, M., Kao, W.-M., Hidalgo, A., Peired, A.J., Thomas, S.A., and Frenette, P.S. (2006). Signals from the Sympathetic Nervous System Regulate Hematopoietic Stem Cell Egress from Bone Marrow. *Cell* *124*, 407–421.
- Kaur, S., Raggatt, L.J., Batoon, L., Hume, D.A., Levesque, J.-P., and Pettit, A.R. (2017). Role of bone marrow macrophages in controlling homeostasis and repair in bone and bone marrow niches. *Semin. Cell Dev. Biol.* *61*, 12–21.
- Kaur, S., Raggatt, L.J., Millard, S.M., Wu, A.C., Batoon, L., Jacobsen, R.N., Winkler, I.G., MacDonald, K.P., Perkins, A.C., Hume, D.A., et al. (2018). Self-repopulating recipient bone marrow resident macrophages promote long-term hematopoietic stem cell engraftment. *Blood* *132*, 735–749.
- Kawai, K., Uchiyama, M., Hester, J., Wood, K., and Issa, F. (2018). Regulatory T cells for tolerance. *Hum. Immunol.* *79*, 294–303.
- Kawano, Y., Fukui, C., Shinohara, M., Wakahashi, K., Ishii, S., Suzuki, T., Sato, M., Asada, N., Kawano, H., Minagawa, K., et al. (2017). G-CSF-induced sympathetic tone provokes fever and primes antimobilizing functions of neutrophils via PGE2. *Blood* *129*, 587–597.
- Kehrer, J.P., and Klotz, L.-O. (2015). Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. *Crit. Rev. Toxicol.* *45*, 765–798.
- Khan, J.A., Mendelson, A., Kunisaki, Y., Birbrair, A., Kou, Y., Arnal-Estapé, A., Pinho, S., Ciero, P., Nakahara, F., Ma'ayan, A., et al. (2016). Fetal liver hematopoietic stem cell niches associate with portal vessels. *Science* *351*, 176–180.
- Kharas, M.G., Okabe, R., Ganis, J.J., Gozo, M., Khandan, T., Paktinat, M., Gilliland, D.G., and Gritsman, K. (2010). Constitutively active AKT depletes hematopoietic stem cells and induces leukemia in mice. *Blood* *115*, 1406–1415.
- Khurana, S., Schouteden, S., Manesia, J.K., Santamaria-Martínez, A., Huelsken, J., Lacy-Hulbert, A., and Verfaillie, C.M. (2016). Outside-in integrin signalling regulates haematopoietic stem cell function via Periostin-Itgav axis. *Nat. Commun.* *7*, 13500.
- Kiel, M.J., Yilmaz, Ö.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., Terhorst, C., and Morrison, S.J. (2005). SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells. *Cell* *121*, 1109–1121.
- Kiel, M.J., Radice, G.L., and Morrison, S.J. (2007). Lack of Evidence that Hematopoietic Stem Cells Depend on N-Cadherin-Mediated Adhesion to Osteoblasts for Their Maintenance. *Cell Stem Cell* *1*, 204–217.

Kierdorf, K., Erny, D., Goldmann, T., Sander, V., Schulz, C., Perdiguero, E.G., Wieghofer, P., Heinrich, A., Riemke, P., Hölscher, C., et al. (2013). Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat. Neurosci.* *16*, 273–280.

Kim, A., Shim, S., Kim, M.-J., Myung, J.K., and Park, S. (2018). Mesenchymal stem cell-mediated Notch2 activation overcomes radiation-induced injury of the hematopoietic system. *Sci. Rep.* *8*, 9277.

Kim, J.-H., Thimmulappa, R.K., Kumar, V., Cui, W., Kumar, S., Kombairaju, P., Zhang, H., Margolick, J., Matsui, W., Macvittie, T., et al. (2014). NRF2-mediated Notch pathway activation enhances hematopoietic reconstitution following myelosuppressive radiation. *J. Clin. Invest.* *124*, 730–741.

Klaas, M., and Crocker, P.R. (2012). Sialoadhesin in recognition of self and non-self. *Semin. Immunopathol.* *34*, 353–364.

Kobashigawa, S., Suzuki, K., and Yamashita, S. (2011). Ionizing radiation accelerates Drp1-dependent mitochondrial fission, which involves delayed mitochondrial reactive oxygen species production in normal human fibroblast-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *414*, 795–800.

Kobayashi, A., Kang, M.-I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., and Yamamoto, M. (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 7130–7139.

Kocabas, F., Zheng, J., Thet, S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., DeBerardinis, R.J., Zhang, C., and Sadek, H.A. (2012). Meis1 regulates the metabolic phenotype and oxidant defense of hematopoietic stem cells. *Blood* *120*, 4963–4972.

Kokkaliaris, K.D. (2020). Dissecting the spatial bone marrow microenvironment of hematopoietic stem cells. *Curr. Opin. Oncol.* *32*, 154–161.

Kolb, M., Margetts, P.J., Anthony, D.C., Pitossi, F., and Gauldie, J. (2001). Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* *107*, 1529–1536.

Kollet, O., Dar, A., Shivtiel, S., Kalinkovich, A., Lapid, K., Sztainberg, Y., Tesio, M., Samstein, R.M., Goichberg, P., Spiegel, A., et al. (2006). Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat. Med.* *12*, 657–664.

Kollet, O., Vagima, Y., D’Uva, G., Golan, K., Canaani, J., Itkin, T., Gur-Cohen, S., Kalinkovich, A., Caglio, G., Medaglia, C., et al. (2013). Physiologic corticosterone oscillations regulate murine hematopoietic stem/progenitor cell proliferation and CXCL12 expression by bone marrow stromal progenitors. *Leukemia* *27*, 2006–2015.

Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997). Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow. *Cell* *91*, 661–672.

Krenning, L., Feringa, F.M., Shaltiel, I.A., van den Berg, J., and Medema, R.H. (2014). Transient Activation of p53 in G2 Phase Is Sufficient to Induce Senescence. *Mol. Cell* 55, 59–72.

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

Kunisaki, Y., Bruns, I., Scheiermann, C., Ahmed, J., Pinho, S., Zhang, D., Mizoguchi, T., Wei, Q., Lucas, D., Ito, K., et al. (2013). Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* 502, 637–643.

Kuribayashi, K., Finnberg, N.K., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., and El-Deiry, W.S. (2011). The relative contribution of pro-apoptotic p53-target genes in the triggering of apoptosis following DNA damage in vitro and in vivo. *Cell Cycle* 10, 2380–2389.

Kustikova, O.S., Schwarzer, A., Stahlhut, M., Brugman, M.H., Neumann, T., Yang, M., Li, Z., Schambach, A., Heinz, N., Gerdes, S., et al. (2013). Activation of Evi1 inhibits cell cycle progression and differentiation of hematopoietic progenitor cells. *Leukemia* 27, 1127–1138.

Lacombe, J., Herblot, S., Rojas-Sutterlin, S., Haman, A., Barakat, S., Iscove, N.N., Sauvageau, G., and Hoang, T. (2010). Scl regulates the quiescence and the long-term competence of hematopoietic stem cells. *Blood* 115, 792–803.

Lam, J., van den Bosch, M., Wegrzyn, J., Parker, J., Ibrahim, R., Slowski, K., Chang, L., Martinez-Høyer, S., Condorelli, G., Boldin, M., et al. (2018). miR-143/145 differentially regulate hematopoietic stem and progenitor activity through suppression of canonical TGFβ signaling. *Nat. Commun.* 9, 2418.

Laplanche, M., and Sabatini, D.M. (2013). Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *J. Cell Sci.* 126, 1713–1719.

Lauber, K., Ernst, A., Orth, M., Herrmann, M., and Belka, C. (2012). Dying cell clearance and its impact on the outcome of tumor radiotherapy. *Front. Oncol.* 2, 116.

Laurenti, E., and Göttgens, B. (2018). From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature* 553, 418–426.

Le Caër, S. (2011). Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H₂ Production under Ionizing Radiation. *Water* 3, 235–253.

Lechman, E.R., Gentner, B., van Galen, P., Giustacchini, A., Saini, M., Boccalatte, F.E., Hiramatsu, H., Restuccia, U., Bachi, A., Voisin, V., et al. (2012). Attenuation of miR-126 Activity Expands HSC In Vivo without Exhaustion. *Cell Stem Cell* 11, 799–811.

Lee, G., Lo, A., Short, S.A., Mankelov, T.J., Spring, F., Parsons, S.F., Yazdanbakhsh, K., Mohandas, N., Anstee, D.J., and Chasis, J.A. (2006). Targeted gene deletion demonstrates that the cell adhesion molecule ICAM-4 is critical for erythroblastic island formation. *Blood* 108, 2064–2071.

- Lee, Y.J., Han, J.Y., Lee, C.G., Heo, K., Park, S.I., Park, Y.S., Kim, J.S., Yang, K.M., Lee, K.-J., Kim, T.-H., et al. (2014). Korean Red Ginseng saponin fraction modulates radiation effects on lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in RAW264.7 macrophage cells. *J. Ginseng Res.* *38*, 208–214.
- Lehenkari, P.P., Kellinsalmi, M., Näpänkangas, J.P., Ylitalo, K.V., Mönkkönen, J., Rogers, M.J., Azhaye, A., Väänänen, H.K., and Hassinen, I.E. (2002). Further Insight into Mechanism of Action of Clodronate: Inhibition of Mitochondrial ADP/ATP Translocase by a Nonhydrolyzable, Adenine-Containing Metabolite. *Mol. Pharmacol.* *61*, 1255–1262.
- Lemoine, F.M., Dedhar, S., Lima, G.M., and Eaves, C.J. (1990). Transformation-associated alterations in interactions between pre-B cells and fibronectin. *Blood* *76*, 2311–2320.
- Levrand, S., Pesse, B., Feihl, F., Waeber, B., Pacher, P., Rolli, J., Schaller, M.-D., and Liaudet, L. (2005). Peroxynitrite is a potent inhibitor of NF- κ B activation triggered by inflammatory stimuli in cardiac and endothelial cell lines. *J. Biol. Chem.* *280*, 34878–34887.
- Li, C., Luo, Y., Shao, L., Meng, A., and Zhou, D. (2018a). NOS2 deficiency has no influence on the radiosensitivity of the hematopoietic system. *Cell Biosci.* *8*, 33.
- Li, D., Wang, Y., Wu, H., Lu, L., Zhang, H., Chang, J., Zhai, Z., Zhang, J., Wang, Y., Zhou, D., et al. (2011). Mitigation of Ionizing Radiation-induced Bone Marrow Suppression by p38 Inhibition and G-CSF Administration. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* *52*, 712–716.
- Li, M., You, L., Xue, J., and Lu, Y. (2018b). Ionizing Radiation-Induced Cellular Senescence in Normal, Non-transformed Cells and the Involved DNA Damage Response: A Mini Review. *Front. Pharmacol.* *9*, 522.
- Li, Q., Yang, Z., Zhang, P., Zhao, Y., Yu, X., Xue, P., Shao, Y., Li, Q., Jia, X., Zhang, Q., et al. (2018c). Mercury impact on hematopoietic stem cells is regulated by IFN γ -dependent bone marrow-resident macrophages in mice. *Toxicol. Lett.* *295*, 54–63.
- Li, W., Wang, G., Cui, J., Xue, L., and Cai, L. (2004). Low-dose radiation (LDR) induces hematopoietic hormesis: LDR-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells into peripheral blood circulation. *Exp. Hematol.* *32*, 1088–1096.
- Li, X.H., Ha, C.T., and Xiao, M. (2016). MicroRNA-30 inhibits antiapoptotic factor Mcl-1 in mouse and human hematopoietic cells after radiation exposure. *Apoptosis* *21*, 708–720.
- Liao, C., Prabhu, K.S., and Paulson, R.F. (2018). Monocyte-derived macrophages expand the murine stress erythropoietic niche during the recovery from anemia. *Blood* *132*, 2580–2593.
- Liao, Y., Chu, H.-P., Hu, Z., Merkin, J.J., Chen, J., Liu, Z., Degenhardt, K., White, E., and Ryazanov, A.G. (2016). Paradoxical Roles of Elongation Factor-2 Kinase in Stem Cell Survival. *J. Biol. Chem.* *291*, 19545–19557.
- Lieber, M.R. (2010). The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 181–211.

- Lifshitz, L., Tabak, G., Gassmann, M., Mittelman, M., and Neumann, D. (2010). Macrophages as novel target cells for erythropoietin. *Haematologica* *95*, 1823–1831.
- Lim, D., Kim, W., Lee, C., Bae, H., and Kim, J. (2018). Macrophage Depletion Protects against Cigarette Smoke-Induced Inflammatory Response in the Mouse Colon and Lung. *Front. Physiol.* *9*, 47.
- Lin, H.-N., and O'Connor, J.P. (2017). Osteoclast depletion with clodronate liposomes delays fracture healing in mice: OSTEOCLAST DEPLETION IMPAIRS FRACTURE HEALING. *J. Orthop. Res.* *35*, 1699–1706.
- Liu, M., Jin, X., He, X., Pan, L., Zhang, X., and Zhao, Y. (2015). Macrophages support splenic erythropoiesis in 4T1 tumor-bearing mice. *PLoS One* *10*, e0121921.
- Liu, Y., Elf, S.E., Miyata, Y., Sashida, G., Liu, Y., Huang, G., Di Giandomenico, S., Lee, J.M., Deblasio, A., Menendez, S., et al. (2009). p53 Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence. *Cell Stem Cell* *4*, 37–48.
- Lobachevsky, P.N., Ventura, J., Giannakandropoulou, L., Forrester, H., Palazzolo, J.S., Haynes, N.M., Stevenson, A.W., Hall, C.J., Mason, J., Pollakis, G., et al. (2019). A Functional Immune System Is Required for the Systemic Genotoxic Effects of Localized Irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *103*, 1184–1193.
- Lord, B.I., Testa, N.G., and Hendry, J.H. (1975). The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood* *46*, 65–72.
- Lorenz, E., Uphoff, D., Reid, T.R., and Shelton, E. (1951). Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J. Natl. Cancer Inst.* *12*, 197–201.
- Lorimore, S.A., Coates, P.J., Scobie, G.E., Milne, G., and Wright, E.G. (2001). Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: a mechanism for radiation-induced bystander effects? *Oncogene* *20*, 7085–7095.
- Lorimore, S.A., Chrystal, J.A., Robinson, J.I., Coates, P.J., and Wright, E.G. (2008). Chromosomal instability in unirradiated hematopoietic cells induced by macrophages exposed in vivo to ionizing radiation. *Cancer Res.* *68*, 8122–8126.
- Lotem, J., and Sachs, L. (1993). Hematopoietic cells from mice deficient in wild-type p53 are more resistant to induction of apoptosis by some agents. *Blood* *82*, 1092–1096.
- Lu, X.-J., Chen, Q., Rong, Y.-J., Yang, G.-J., Li, C.-H., Xu, N.-Y., Yu, C.-H., Wang, H.-Y., Zhang, S., Shi, Y.-H., et al. (2016). LECT2 drives hematopoietic stem cell expansion and mobilization via regulating the macrophages and osteolineage cells. *Nat. Commun.* *7*, 12719.
- Lucas, D., Scheiermann, C., Chow, A., Kunisaki, Y., Bruns, I., Barrick, C., Tessarollo, L., and Frenette, P.S. (2013). Chemotherapy-induced bone marrow nerve injury impairs hematopoietic regeneration. *Nat. Med.* *19*, 695–703.

- Luchsinger, L.L., de Almeida, M.J., Corrigan, D.J., Mumau, M., and Snoeck, H.-W. (2016). Mitofusin 2 maintains haematopoietic stem cells with extensive lymphoid potential. *Nature* *529*, 528–531.
- Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D., and Xia, B. (2012). CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin. Dev. Immunol.* *2012*, 925135.
- Ludin, A., Itkin, T., Gur-Cohen, S., Mildner, A., Shezen, E., Golan, K., Kollet, O., Kalinkovich, A., Porat, Z., D’Uva, G., et al. (2012). Monocytes-macrophages that express a-smooth muscle actin preserve primitive hematopoietic cells in the bone marrow. *Nat. Immunol.* *13*, 13.
- Lymperi, S., Ersek, A., Ferraro, F., Dazzi, F., and Horwood, N.J. (2011). Inhibition of osteoclast function reduces hematopoietic stem cell numbers in vivo. *Blood* *117*, 1540–1549.
- Ma, Y., Li, Y., Jiang, L., Wang, L., Jiang, Z., Wang, Y., Zhang, Z., and Yang, G.-Y. (2016). Macrophage depletion reduced brain injury following middle cerebral artery occlusion in mice. *J. Neuroinflammation* *13*, 38.
- Mach, D.B., Rogers, S.D., Sabino, M.C., Luger, N.M., Schwei, M.J., Pomonis, J.D., Keyser, C.P., Clohisy, D.R., Adams, D.J., O’Leary, P., et al. (2002). Origins of skeletal pain: sensory and sympathetic innervation of the mouse femur. *Neuroscience* *113*, 155–166.
- Mackarechtschian, K., Hardin, J.D., Moore, K.A., Boast, S., Goff, S.P., and Lemischka, I.R. (1995). Targeted disruption of the *flk2/flt3* gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity* *3*, 147–161.
- MacMillan-Crow, L.A., and Thompson, J.A. (1999). Tyrosine Modifications and Inactivation of Active Site Manganese Superoxide Dismutase Mutant (Y34F) by Peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* *366*, 82–88.
- Magee, J.A., Ikenoue, T., Nakada, D., Lee, J.Y., Guan, K.-L., and Morrison, S.J. (2012). Temporal Changes in PTEN and mTORC2 Regulation of Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Leukemia Suppression. *Cell Stem Cell* *11*, 415–428.
- Maier, P., Hartmann, L., Wenz, F., and Herskind, C. (2016). Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *Int. J. Mol. Sci.* *17*.
- Maioli, N.A., Zarpelon, A.C., Mizokami, S.S., Calixto-Campos, C., Guazelli, C.F.S., Hohmann, M.S.N., Pinho-Ribeiro, F.A., Carvalho, T.T., Manchope, M.F., Ferraz, C.R., et al. (2015). The superoxide anion donor, potassium superoxide, induces pain and inflammation in mice through production of reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. *Braz. J. Med. Biol. Res.* *48*, 321–331.
- Maity, A., McKenna, W.G., and Muschel, R.J. (1994). The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review. *Radiother. Oncol.* *31*, 1–13.
- Mandal, C.C., Das, F., Ganapathy, S., Harris, S.E., Choudhury, G.G., and Ghosh-Choudhury, N. (2016). Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) Activates NFATc1 Transcription Factor via an Autoregulatory Loop Involving Smad/Akt/Ca²⁺ Signaling. *J. Biol. Chem.* *291*, 1148–1161.

- Marshansky, V., and Futai, M. (2008). The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* *20*, 415–426.
- Maryanovich, M., Oberkovitz, G., Niv, H., Vorobiyov, L., Zaltsman, Y., Brenner, O., Lapidot, T., Jung, S., and Gross, A. (2012). The ATM–BID pathway regulates quiescence and survival of haematopoietic stem cells. *Nat. Cell Biol.* *14*, 535–541.
- Maryanovich, M., Zaltsman, Y., Ruggiero, A., Goldman, A., Shachnai, L., Zaidman, S.L., Porat, Z., Golan, K., Lapidot, T., and Gross, A. (2015). An MTCH2 pathway repressing mitochondria metabolism regulates haematopoietic stem cell fate. *Nat. Commun.* *6*, 7901.
- Masamoto, Y., Arai, S., Sato, T., Kubota, N., Takamoto, I., Kadowaki, T., and Kurokawa, M. (2017). Adiponectin Enhances Quiescence Exit of Murine Hematopoietic Stem Cells and Hematopoietic Recovery Through mTORC1 Potentiation. *STEM CELLS* *14*.
- Mass, E., Ballesteros, I., Farlik, M., Halbritter, F., Günther, P., Crozet, L., Jacome-Galarza, C.E., Händler, K., Klughammer, J., Kobayashi, Y., et al. (2016). Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science* *353*.
- Matsumoto, A., Takeishi, S., Kanie, T., Susaki, E., Onoyama, I., Tateishi, Y., Nakayama, K., and Nakayama, K.I. (2011). p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* *9*, 262–271.
- Mayle, A., Luo, M., Jeong, M., and Goodell, M.A. (2013). Mouse Hematopoietic Stem Cell Identification And Analysis. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* *83*, 27–37.
- McCabe, A., Zhang, Y., Thai, V., Jones, M., Jordan, M.B., and MacNamara, K.C. (2015). Macrophage-Lineage Cells Negatively Regulate the Hematopoietic Stem Cell Pool in Response to Interferon Gamma at Steady State and During Infection. *Stem Cells Dayt. Ohio* *33*, 2294–2305.
- McCauley, L.K., Dalli, J., Koh, A.J., Chiang, N., and Serhan, C.N. (2014). Cutting edge: Parathyroid hormone facilitates macrophage efferocytosis in bone marrow via proresolving mediators resolvin D1 and resolvin D2. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *193*, 26–29.
- Mcculloch, E.A., and Till, J.E. (1960). The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat. Res.* *13*, 115–125.
- McDonald, J.T., Kim, K., Norris, A.J., Vlashi, E., Phillips, T.M., Lagadec, C., Della Donna, L., Ratikan, J., Szelag, H., Hlatky, L., et al. (2010). Ionizing Radiation Activates the Nrf2 Antioxidant Response. *Cancer Res.* *70*, 8886–8895.
- McGrath, K.E., Frame, J.M., Fegan, K.H., Bowen, J.R., Catherman, S.C., Kingsley, P.D., Koniski, A.D., and Palis, J. (2015). Distinct sources of hematopoietic progenitors emerge before HSCs and provide functional blood cells in the mammalian embryo. *21*.
- McKinney, L.C., Aquilla, E.M., Coffin, D., Wink, D.A., and Vodovotz, Y. (2000). Ionizing radiation potentiates the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma and/or

- lipopolysaccharide in murine macrophage cell lines. Role of tumor necrosis factor- α . *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *899*, 61–68.
- Mehta, S., Suhag, V., Semwal, M., and Sharma, N. (2010). Radiotherapy: Basic Concepts and Recent Advances. *Med. J. Armed Forces India* *66*, 158–162.
- Mendelson, A., and Frenette, P.S. (2014). Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nat. Med.* *20*, 833–846.
- Mendez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M., and Frenette, P.S. (2008). Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *452*, 7.
- Méndez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M., and Frenette, P.S. (2008). Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* *452*, 442–447.
- Méndez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., Macarthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., and Frenette, P.S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* *466*, 829–834.
- Meng, A., Wang, Y., Van Zant, G., and Zhou, D. (2003a). Ionizing radiation and busulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells. *Cancer Res.* *63*, 5414–5419.
- Meng, A., Wang, Y., Brown, S.A., Van Zant, G., and Zhou, D. (2003b). Ionizing radiation and busulfan inhibit murine bone marrow cell hematopoietic function via apoptosis-dependent and -independent mechanisms. *Exp. Hematol.* *31*, 1348–1356.
- Menzel, H.-G. (2018). The language of radioactivity. *Nat. Phys.* *14*, 768–768.
- Merchant, A.A., Singh, A., Matsui, W., and Biswal, S. (2011). The redox-sensitive transcription factor Nrf2 regulates murine hematopoietic stem cell survival independently of ROS levels. *Blood* *118*, 6572–6579.
- Meziani, L., Deutsch, E., and Mondini, M. (2018a). Macrophages in radiation injury: a new therapeutic target. *Oncoimmunology* *7*, e1494488.
- Meziani, L., Mondini, M., Petit, B., Boissonnas, A., Thomas de Montpreville, V., Mercier, O., Vozenin, M.-C., and Deutsch, E. (2018b). CSF1R inhibition prevents radiation pulmonary fibrosis by depletion of interstitial macrophages. *Eur. Respir. J.* *51*.
- Miller, C.L., and Lai, B. (2005). Human and mouse hematopoietic colony-forming cell assays. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *290*, 71–89.
- Min, I.M., Pietramaggiori, G., Kim, F.S., Passegué, E., Stevenson, K.E., and Wagers, A.J. (2008). The Transcription Factor EGR1 Controls Both the Proliferation and Localization of Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* *2*, 380–391.
- Mirzayans, R., Andrais, B., Scott, A., and Murray, D. (2012). New Insights into p53 Signaling and Cancer Cell Response to DNA Damage: Implications for Cancer Therapy. *J. Biomed. Biotechnol.* *2012*, 1–16.

- Miyake, Y., Asano, K., Kaise, H., Uemura, M., Nakayama, M., and Tanaka, M. (2007). Critical role of macrophages in the marginal zone in the suppression of immune responses to apoptotic cell-associated antigens. *J. Clin. Invest.* *117*, 2268–2278.
- Miyamoto, K., Araki, K.Y., Naka, K., Arai, F., Takubo, K., Yamazaki, S., Matsuoka, S., Miyamoto, T., Ito, K., Ohmura, M., et al. (2007). Foxo3a Is Essential for Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool. *Cell Stem Cell* *1*, 101–112.
- Mohrin, M., Bourke, E., Alexander, D., Warr, M.R., Barry-Holson, K., Le Beau, M.M., Morrison, C.G., and Passegué, E. (2010). Hematopoietic Stem Cell Quiescence Promotes Error-Prone DNA Repair and Mutagenesis. *Cell Stem Cell* *7*, 174–185.
- Mohrin, M., Widjaja, A., Liu, Y., Luo, H., and Chen, D. (2018). The mitochondrial unfolded protein response is activated upon hematopoietic stem cell exit from quiescence. *Aging Cell* *17*, e12756.
- Molawi, K., Wolf, Y., Kandalla, P.K., Favret, J., Hagemeyer, N., Frenzel, K., Pinto, A.R., Klapproth, K., Henri, S., Malissen, B., et al. (2014). Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. *J. Exp. Med.* *211*, 2151–2158.
- Moore, K.A., Ema, H., and Lemischka, I.R. (1997). In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells. *Blood* *89*, 4337–4347.
- Moreno, S.G. (2018). Depleting Macrophages In Vivo with Clodronate-Liposomes. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1784*, 259–262.
- Morikawa, S., Mabuchi, Y., Kubota, Y., Nagai, Y., Niibe, K., Hiratsu, E., Suzuki, S., Miyauchi-Hara, C., Nagoshi, N., Sunabori, T., et al. (2009). Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J. Exp. Med.* *206*, 2483–2496.
- Morrison, S.J., and Weissman, I.L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* *1*, 661–673.
- Morrison, S.J., Wandycz, A.M., Hemmati, H.D., Wright, D.E., and Weissman, I.L. (1997). Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Dev. Camb. Engl.* *124*, 1929–1939.
- Mortensen, M., Soilleux, E.J., Djordjevic, G., Tripp, R., Lutteropp, M., Sadighi-Akha, E., Stranks, A.J., Glanville, J., Knight, S., W. Jacobsen, S.-E., et al. (2011). The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *J. Exp. Med.* *208*, 455–467.
- Mossadegh-Keller, N., Gentek, R., Gimenez, G., Bigot, S., Mailfert, S., and Sieweke, M.H. (2017). Developmental origin and maintenance of distinct testicular macrophage populations. *J. Exp. Med.* *214*, 2829–2841.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 958–969.

- Mukherjee, D., Coates, P.J., Lorimore, S.A., and Wright, E.G. (2014). Responses to ionizing radiation mediated by inflammatory mechanisms. *J. Pathol.* *232*, 289–299.
- Mungrue, I.N., and Bredt, D.S. (2004). nNOS at a glance: implications for brain and brawn. *J. Cell Sci.* *117*, 2627–2629.
- Munro, D.A.D., and Hughes, J. (2017). The Origins and Functions of Tissue-Resident Macrophages in Kidney Development. *Front. Physiol.* *8*, 837.
- Murakami, S., Suzuki, T., Harigae, H., Romeo, P.-H., Yamamoto, M., and Motohashi, H. (2017). NRF2 Activation Impairs Quiescence and Bone Marrow Reconstitution Capacity of Hematopoietic Stem Cells. *Mol. Cell. Biol.* *37*, e00086-17, e00086-17.
- Nabeyrat, E., Jones, G.E., Fenwick, P.S., Barnes, P.J., and Donnelly, L.E. (2003). Mitogen-activated protein kinases mediate peroxynitrite-induced cell death in human bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* *284*, L1112–L1120.
- Najafi, M., Motevaseli, E., Shirazi, A., Geraily, G., Rezaeyan, A., Norouzi, F., Rezapoor, S., and Abdollahi, H. (2018). Mechanisms of inflammatory responses to radiation and normal tissues toxicity: clinical implications. *Int. J. Radiat. Biol.* *94*, 335–356.
- Nakada, D., Saunders, T.L., and Morrison, S.J. (2010). Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. *Nature* *468*, 653–658.
- Nakahara, H., Song, J., Sugimoto, M., Hagihara, K., Kishimoto, T., Yoshizaki, K., and Nishimoto, N. (2003). Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *48*, 1521–1529.
- Nakamura-Ishizu, A., Okuno, Y., Omatsu, Y., Okabe, K., Morimoto, J., Uede, T., Nagasawa, T., Suda, T., and Kubota, Y. (2012). Extracellular matrix protein tenascin-C is required in the bone marrow microenvironment primed for hematopoietic regeneration. *Blood* *119*, 5429–5437.
- Nakamura-Ishizu, A., Takizawa, H., and Suda, T. (2014a). The analysis, roles and regulation of quiescence in hematopoietic stem cells. *Development* *141*, 4656–4666.
- Nakamura-Ishizu, A., Takubo, K., Fujioka, M., and Suda, T. (2014b). Megakaryocytes are essential for HSC quiescence through the production of thrombopoietin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *454*, 353–357.
- Narang, H., and Krishna, M. (2005). Inhibition of radiation induced nitration by curcumin and nicotinamide in mouse macrophages. *Mol. Cell. Biochem.* *276*, 7–13.
- Narang, H., and Krishna, M. (2008). Effect of nitric oxide donor and gamma irradiation on MAPK signaling in murine peritoneal macrophages. *J. Cell. Biochem.* *103*, 576–587.
- Narang, H., Bhat, N., Gupta, S.K., Santra, S., Choudhary, R.K., Kailash, S., and Krishna, M. (2009). Differential activation of mitogen-activated protein kinases following high and low LET radiation in murine macrophage cell line. *Mol. Cell. Biochem.* *324*, 85–91.

Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, P.L., Hauschka, P.V., Fahey, F., and Daley, G.Q. (2009). Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* *460*, 259–263.

Nestorowa, S., Hamey, F.K., Pijuan Sala, B., Diamanti, E., Shepherd, M., Laurenti, E., Wilson, N.K., Kent, D.G., and Göttgens, B. (2016). A single-cell resolution map of mouse hematopoietic stem and progenitor cell differentiation. *Blood* *128*, e20–e31.

Niles, J.C., Wishnok, J.S., and Tannenbaum, S.R. (2006). Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: Structures and mechanisms of product formation. *Nitric Oxide* *14*, 109–121.

Nilsson, S.K., Johnston, H.M., and Coverdale, J.A. (2001). Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood* *97*, 2293–2299.

Nilsson, S.K., Johnston, H.M., Whitty, G.A., Williams, B., Webb, R.J., Denhardt, D.T., Bertoncello, I., Bendall, L.J., Simmons, P.J., and Haylock, D.N. (2005). Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* *106*, 1232–1239.

Ning, S., Bednarski, M., Oronsky, B., Scicinski, J., and Knox, S.J. (2014). Novel nitric oxide generating compound glycidyl nitrate enhances the therapeutic efficacy of chemotherapy and radiotherapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *447*, 537–542.

Nunes, P., Cornut, D., Bochet, V., Hasler, U., Oh-Hora, M., Waldburger, J.-M., and Demareux, N. (2012). STIM1 Juxtaposes ER to Phagosomes, Generating Ca²⁺ Hotspots that Boost Phagocytosis. *Curr. Biol.* *22*, 1990–1997.

O'Brien, C.A., Plotkin, L.I., Galli, C., Goellner, J.J., Gortazar, A.R., Allen, M.R., Robling, A.G., Boussein, M., Schipani, E., Turner, C.H., et al. (2008). Control of bone mass and remodeling by PTH receptor signaling in osteocytes. *PLoS One* *3*, e2942.

Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* *288*, 1053–1058.

Ogawa, K., Tsurutani, M., Hashimoto, A., and Soeda, M. (2019). Simple propagation method for resident macrophages by co-culture and subculture, and their isolation from various organs. *BMC Immunol.* *20*, 34.

Ogura, A., Oowada, S., Kon, Y., Hirayama, A., Yasui, H., Meike, S., Kobayashi, S., Kuwabara, M., and Inanami, O. (2009). Redox regulation in radiation-induced cytochrome c release from mitochondria of human lung carcinoma A549 cells. *Cancer Lett.* *277*, 64–71.

Oguro, H., Iwama, A., Morita, Y., Kamijo, T., van Lohuizen, M., and Nakauchi, H. (2006). Differential impact of Ink4a and Arf on hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment in Bmi1-deficient mice. *J. Exp. Med.* *203*, 2247–2253.

Olson, T.S., Caselli, A., Otsuru, S., Hofmann, T.J., Williams, R., Paolucci, P., Dominici, M., and Horwitz, E.M. (2013). Megakaryocytes promote murine osteoblastic HSC niche expansion and stem cell engraftment after radioablative conditioning. *Blood* 121, 5238–5249.

Omatsu, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Kondoh, G., Fujii, N., Kohno, K., and Nagasawa, T. (2010). The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* 33, 387–399.

Oostendorp, R.A.J., Medvinsky, A.J., Kusadasi, N., Nakayama, N., Harvey, K., Orelia, C., Ottersbach, K., Covey, T., Ploemacher, R.E., Saris, C., et al. (2002). Embryonal subregion-derived stromal cell lines from novel temperature-sensitive SV40 T antigen transgenic mice support hematopoiesis. *J. Cell Sci.* 115, 2099–2108.

O'Rourke, S.A., Dunne, A., and Monaghan, M.G. (2019). The Role of Macrophages in the Infarcted Myocardium: Orchestrators of ECM Remodeling. *Front. Cardiovasc. Med.* 6, 101.

Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., and Nakauchi, H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273, 242–245.

Pacher, P., Beckman, J.S., and Liaudet, L. (2007). Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 87, 315–424.

Palis, J. (2014). Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Front. Physiol.* 5, 3.

Papayannopoulou, T., Priestley, G.V., Nakamoto, B., Zafiroopoulos, V., and Scott, L.M. (2001). Molecular pathways in bone marrow homing: dominant role of alpha(4)beta(1) over beta(2)-integrins and selectins. *Blood* 98, 2403–2411.

Park, M.H., Jin, H.K., Min, W.-K., Lee, W.W., Lee, J.E., Akiyama, H., Herzog, H., Enikolopov, G.N., Schuchman, E.H., and Bae, J. (2015). Neuropeptide Y regulates the hematopoietic stem cell microenvironment and prevents nerve injury in the bone marrow. *EMBO J.* 34, 1648–1660.

Park, M.H., Lee, J.K., Kim, N., Min, W.-K., Lee, J.E., Kim, K.-T., Akiyama, H., Herzog, H., Schuchman, E.H., Jin, H.K., et al. (2016). Neuropeptide Y Induces Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Mobilization by Regulating Matrix Metalloproteinase-9 Activity Through Y1 Receptor in Osteoblasts. *Stem Cells Dayt. Ohio* 34, 2145–2156.

Patterson, A.M., Liu, L., Sampson, C.H., Plett, P.A., Li, H., Singh, P., Mohammad, K.S., Hoggatt, J., Capitano, M.L., Orschell, C.M., et al. (2020). A Single Radioprotective Dose of Prostaglandin E2 Blocks Irradiation-Induced Apoptotic Signaling and Early Cycling of Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cell Rep.* 15, 358–373.

Paull, T.T. (2015). Mechanisms of ATM Activation. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 711–738.

Pazhanisamy, S.K., Li, H., Wang, Y., Batinic-Haberle, I., and Zhou, D. (2011). NADPH oxidase inhibition attenuates total body irradiation-induced haematopoietic genomic instability. *Mutagenesis* 26, 431–435.

- Pearce, L.L., Epperly, M.W., Greenberger, J.S., Pitt, B.R., and Peterson, J. (2001). Identification of Respiratory Complexes I and III as Mitochondrial Sites of Damage Following Exposure to Ionizing Radiation and Nitric Oxide. *Nitric Oxide* 5, 128–136.
- Pereira, P.M.R., Edwards, K.J., Mandleywala, K., Carter, L.M., Escorcia, F.E., Campesato, L.F., Cornejo, M., Abma, L., Mohsen, A.-A., Iacobuzio-Donahue, C.A., et al. (2020). iNOS Regulates the Therapeutic Response of Pancreatic Cancer Cells to Radiotherapy. *Cancer Res.* 80, 1681–1692.
- Pietras, E.M., Warr, M.R., and Passegué, E. (2011). Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *J. Cell Biol.* 195, 709–720.
- Pietras, E.M., Reynaud, D., Kang, Y.-A., Carlin, D., Calero-Nieto, F.J., Leavitt, A.D., Stuart, J.M., Göttgens, B., and Passegué, E. (2015). Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell* 17, 35–46.
- Pinho, S., and Frenette, P.S. (2019). Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 303–320.
- Pinho, S., Lacombe, J., Hanoun, M., Mizoguchi, T., Bruns, I., Kunisaki, Y., and Frenette, P.S. (2013). PDGFR α and CD51 mark human nestin⁺ sphere-forming mesenchymal stem cells capable of hematopoietic progenitor cell expansion. *J. Exp. Med.* 210, 1351–1367.
- Piryani, S.O., Kam, A.Y.F., Vu, U.T., Chao, N.J., and Doan, P.L. (2019a). CCR5 Signaling Promotes Murine and Human Hematopoietic Regeneration following Ionizing Radiation. *Stem Cell Rep.* 13, 76–90.
- Piryani, S.O., Jiao, Y., Kam, A.Y.F., Liu, Y., Vo-Dinh, T., Chen, B.J., Chao, N.J., and Doan, P.L. (2019b). Endothelial Cell-Derived Extracellular Vesicles Mitigate Radiation-Induced Hematopoietic Injury. *Int. J. Radiat. Oncol.* 104, 291–301.
- Ploemacher, R.E., van der Sluijs, J.P., Voerman, J.S., and Brons, N.H. (1989). An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood* 74, 2755–2763.
- Porter, R.L., Georger, M.A., Bromberg, O., McGrath, K.E., Frisch, B.J., Becker, M.W., and Calvi, L.M. (2013). Prostaglandin E2 increases hematopoietic stem cell survival and accelerates hematopoietic recovery after radiation injury. *Stem Cells Dayt. Ohio* 31, 372–383.
- Poulos, M.G., Guo, P., Kofler, N.M., Pinho, S., Gutkin, M.C., Tikhonova, A., Aifantis, I., Frenette, P.S., Kitajewski, J., Rafii, S., et al. (2013). Endothelial Jagged-1 is necessary for homeostatic and regenerative hematopoiesis. *Cell Rep.* 4, 1022–1034.
- Purbey, P.K., Scumpia, P.O., Kim, P.J., Tong, A.-J., Iwamoto, K.S., McBride, W.H., and Smale, S.T. (2017). Defined Sensing Mechanisms and Signaling Pathways Contribute to the Global Inflammatory Gene Expression Output Elicited by Ionizing Radiation. *Immunity* 47, 421–434.e3.

Qian, H., Buza-Vidas, N., Hyland, C.D., Jensen, C.T., Antonchuk, J., Månsson, R., Thoren, L.A., Ekblom, M., Alexander, W.S., and Jacobsen, S.E.W. (2007). Critical Role of Thrombopoietin in Maintaining Adult Quiescent Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* *1*, 671–684.

Qian, P., He, X.C., Paulson, A., Li, Z., Tao, F., Perry, J.M., Guo, F., Zhao, M., Zhi, L., Venkatraman, A., et al. (2016). The *Dlk1-Gtl2* Locus Preserves LT-HSC Function by Inhibiting the PI3K-mTOR Pathway to Restrict Mitochondrial Metabolism. *Cell Stem Cell* *18*, 214–228.

Quesenberry, P.J., Goldberg, L., Aliotta, J., and Dooner, M. (2014). Marrow Hematopoietic Stem Cells Revisited: They Exist in a Continuum and are Not Defined by Standard Purification Approaches; Then There are the Microvesicles. *Front. Oncol.* *4*.

Rabbani, Z.N., Anscher, M.S., Folz, R.J., Archer, E., Huang, H., Chen, L., Golson, M.L., Samulski, T.S., Dewhirst, M.W., and Vujaskovic, Z. (2005). Overexpression of extracellular superoxide dismutase reduces acute radiation induced lung toxicity. *BMC Cancer* *5*, 59.

Rabe, J.L., Hernandez, G., Chavez, J.S., Mills, T.S., Nerlov, C., and Pietras, E.M. (2020). CD34 and EPCR coordinately enrich functional murine hematopoietic stem cells under normal and inflammatory conditions. *Exp. Hematol.* *81*, 1-15.e6.

Radi, R., Cassina, A., Hodara, R., Quijano, C., and Castro, L. (2002). Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* *33*, 1451–1464.

Ramos, P., Casu, C., Gardenghi, S., Breda, L., Crielaard, B.J., Guy, E., Marongiu, M.F., Gupta, R., Levine, R.L., Abdel-Wahab, O., et al. (2013). Macrophages support pathological erythropoiesis in polycythemia vera and β -thalassemia. *Nat. Med.* *19*, 437–445.

Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E.I., and Munder, M. (2014). Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front. Immunol.* *5*, 532.

Ray, D., Shukla, S., Allam, U.S., Helman, A., Ramanand, S.G., Tran, L., Bassetti, M., Krishnamurthy, P.M., Rumschlag, M., Paulsen, M., et al. (2013). Tristetraprolin Mediates Radiation-Induced TNF- α Production in Lung Macrophages. *PLoS ONE* *8*, e57290.

Redza-Dutordoir, M., and Averill-Bates, D.A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1863*, 2977–2992.

Reichard, J.F., Motz, G.T., and Puga, A. (2007). Heme oxygenase-1 induction by NRF2 requires inactivation of the transcriptional repressor BACH1. *Nucleic Acids Res.* *35*, 7074–7086.

Ridnour, L.A., Cheng, R.Y.S., Weiss, J.M., Kaur, S., Soto-Pantoja, D.R., Basudhar, D., Heinecke, J.L., Stewart, C.A., DeGraff, W., Sowers, A.L., et al. (2015). NOS Inhibition Modulates Immune Polarization and Improves Radiation-Induced Tumor Growth Delay. *Cancer Res.* *75*, 2788–2799.

- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., and Zerial, M. (2005). Rab Conversion as a Mechanism of Progression from Early to Late Endosomes. *Cell* *122*, 735–749.
- Robertson, A., Allen, J., Laney, R., and Curnow, A. (2013). The Cellular and Molecular Carcinogenic Effects of Radon Exposure: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 14024–14063.
- Rock, K.L., Reits, E., and Neefjes, J. (2016). Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends Immunol.* *37*, 724–737.
- Rodier, F., Muñoz, D.P., Teachenor, R., Chu, V., Le, O., Bhaumik, D., Coppé, J.-P., Campeau, E., Beauséjour, C.M., Kim, S.-H., et al. (2011). DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J. Cell Sci.* *124*, 68–81.
- Rodrigues-Moreira, S., Moreno, S.G., Ghinatti, G., Lewandowski, D., Hoffschir, F., Ferri, F., Gallouet, A.-S., Gay, D., Motohashi, H., Yamamoto, M., et al. (2017). Low-Dose Irradiation Promotes Persistent Oxidative Stress and Decreases Self-Renewal in Hematopoietic Stem Cells. *Cell Rep.* *20*, 3199–3211.
- Rosales, C., and Uribe-Querol, E. (2017). Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *BioMed Res. Int.* *2017*, 1–18.
- Rossi, L., Lin, K.K., Boles, N.C., Yang, L., King, K.Y., Jeong, M., Mayle, A., and Goodell, M.A. (2012). Less Is More: Unveiling the Functional Core of Hematopoietic Stem Cells through Knockout Mice. *Cell Stem Cell* *11*, 302–317.
- Rubin, P., Finkelstein, J., and Shapiro, D. (1992). Molecular biology mechanisms in the radiation induction of pulmonary injury syndromes: Interrelationship between the alveolar macrophage and the septal fibroblast. *Int. J. Radiat. Oncol.* *24*, 93–101.
- Saito, M., Iwawaki, T., Taya, C., Yonekawa, H., Noda, M., Inui, Y., Mekada, E., Kimata, Y., Tsuru, A., and Kohno, K. (2001). Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nat. Biotechnol.* *19*, 746–750.
- Saito-Reis, C.A., Marjon, K.D., Pascetti, E.M., Floren, M., and Gillette, J.M. (2018). The tetraspanin CD82 regulates bone marrow homing and engraftment of hematopoietic stem and progenitor cells. *Mol. Biol. Cell* *29*, 2946–2958.
- Sakamoto, T., Obara, N., Nishikii, H., Kato, T., Cao-Sy, L., Fujimura, R., Yagita, H., Sakata-Yanagimoto, M., Takahashi, S., and Chiba, S. (2019). Notch Signaling in Nestin-Expressing Cells in the Bone Marrow Maintains Erythropoiesis via Macrophage Integrity. *STEM CELLS* *13*.
- Salter, A.B., Meadows, S.K., Muramoto, G.G., Himburg, H., Doan, P., Daher, P., Russell, L., Chen, B., Chao, N.J., and Chute, J.P. (2009). Endothelial progenitor cell infusion induces hematopoietic stem cell reconstitution in vivo. *Blood* *113*, 2104–2107.

- Sanjuan-Pla, A., Macaulay, I.C., Jensen, C.T., Woll, P.S., Luis, T.C., Mead, A., Moore, S., Carella, C., Matsuoka, S., Jones, T.B., et al. (2013). Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature* *502*, 232–236.
- Santos, G.W., Tutschka, P.J., Brookmeyer, R., Saral, R., Beschorner, W.E., Bias, W.B., Braine, H.G., Burns, W.H., Elfenbein, G.J., and Kaizer, H. (1983). Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *N. Engl. J. Med.* *309*, 1347–1353.
- Sasmono, R.T., O'Ceandly, D., Pollard, J.W., Tong, W., Pavli, P., Wainwright, B.J., Ostrowski, M.C., Himes, S.R., and Hume, D.A. (2003). A macrophage colony-stimulating factor receptor–green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse. *Blood* *101*, 1155–1163.
- Saunderson, S.C., Dunn, A.C., Crocker, P.R., and McLellan, A.D. (2014). CD169 mediates the capture of exosomes in spleen and lymph node. *Blood* *123*, 208–216.
- Scharpfenecker, M., Froot, B., Russell, N.S., and Stewart, F.A. (2012). The TGF- β co-receptor endoglin regulates macrophage infiltration and cytokine production in the irradiated mouse kidney. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* *105*, 313–320.
- Schaue, D., Marples, B., and Trott, K.R. (2002). The effects of low-dose X-irradiation on the oxidative burst in stimulated macrophages. *Int. J. Radiat. Biol.* *78*, 567–576.
- Schulz, C., Gomez Perdiguerro, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E.W., Pollard, J.W., et al. (2012). A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* *336*, 86–90.
- Scott, C.L., Zheng, F., De Baetselier, P., Martens, L., Saeys, Y., De Prijck, S., Lippens, S., Abels, C., Schoonooghe, S., Raes, G., et al. (2016). Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nat. Commun.* *7*, 10321.
- Segawa, K., and Nagata, S. (2015). An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends Cell Biol.* *25*, 639–650.
- Severe, N., Karabacak, N.M., Gustafsson, K., Baryawno, N., Courties, G., Kfoury, Y., Kokkaliaris, K.D., Rhee, C., Lee, D., Scadden, E.W., et al. (2019). Stress-Induced Changes in Bone Marrow Stromal Cell Populations Revealed through Single-Cell Protein Expression Mapping. *Cell Stem Cell* *25*, 570-583.e7.
- Seyfried, A.N., Maloney, J.M., and MacNamara, K.C. (2020). Macrophages Orchestrate Hematopoietic Programs and Regulate HSC Function During Inflammatory Stress. *Front. Immunol.* *11*, 1499.
- Shacka, J.J., Sahawneh, M.A., Gonzalez, J.D., Ye, Y.-Z., D'Alessandro, T.L., and Estévez, A.G. (2006). Two distinct signaling pathways regulate peroxynitrite-induced apoptosis in PC12 cells. *Cell Death Differ.* *13*, 1506–1514.

- Shan, Y.-X., Jin, S.-Z., Liu, X.-D., Liu, Y., and Liu, S.-Z. (2007). Ionizing radiation stimulates secretion of pro-inflammatory cytokines: dose-response relationship, mechanisms and implications. *Radiat. Environ. Biophys.* *46*, 21–29.
- Shao, L., Sun, Y., Zhang, Z., Feng, W., Gao, Y., Cai, Z., Wang, Z.Z., Look, A.T., and Wu, W.-S. (2010). Deletion of proapoptotic Puma selectively protects hematopoietic stem and progenitor cells against high-dose radiation. *Blood* *115*, 4707–4714.
- Shao, L., Luo, Y., and Zhou, D. (2014a). Hematopoietic Stem Cell Injury Induced by Ionizing Radiation. *Antioxid. Redox Signal.* *20*, 1447–1462.
- Shao, L., Feng, W., Li, H., Gardner, D., Luo, Y., Wang, Y., Liu, L., Meng, A., Sharpless, N.E., and Zhou, D. (2014b). Total body irradiation causes long-term mouse BM injury via induction of HSC premature senescence in an *Ink4a*- and *Arf*-independent manner. *Blood* *123*, 3105–3115.
- Sheng, J., Ruedl, C., and Karjalainen, K. (2015). Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. *Immunity* *43*, 382–393.
- Shi, J., Hua, L., Harmer, D., Li, P., and Ren, G. (2018). Cre Driver Mice Targeting Macrophages. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1784*, 263–275.
- Shibata, A., and Jeggo, P.A. (2020). Roles for 53BP1 in the repair of radiation-induced DNA double strand breaks. *DNA Repair* *93*, 102915.
- Siminovitch, L., Mcculloch, E.A., and Till, J.E. (1963). THE DISTRIBUTION OF COLONY-FORMING CELLS AMONG SPLEEN COLONIES. *J. Cell. Comp. Physiol.* *62*, 327–336.
- Simonnet, A.J., Nehmé, J., Vaigot, P., Barroca, V., Leboulch, P., and Tronik-Le Roux, D. (2009). Phenotypic and Functional Changes Induced in Hematopoietic Stem/Progenitor Cells After Gamma-Ray Radiation Exposure. *Stem Cells* *27*, 1400–1409.
- Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., DeBerardinis, R.J., Mahmoud, A.I., Olson, E.N., Schneider, J.W., Zhang, C.C., and Sadek, H.A. (2010). The Distinct Metabolic Profile of Hematopoietic Stem Cells Reflects Their Location in a Hypoxic Niche. *Cell Stem Cell* *7*, 380–390.
- Singh, R.J., Hogg, N., Joseph, J., Konorev, E., and Kalyanaraman, B. (1999). The peroxynitrite generator, SIN-1, becomes a nitric oxide donor in the presence of electron acceptors. *Arch. Biochem. Biophys.* *361*, 331–339.
- Smith, L.E., Nagar, S., Kim, G.J., and Morgan, W.F. (2003). Radiation-induced genomic instability: radiation quality and dose response. *Health Phys.* *85*, 23–29.
- Southgate, T.D., Sheard, V., Milsom, M.D., Ward, T.H., Mairs, R.J., Boyd, M., and Fairbairn, L.J. (2006). Radioprotective gene therapy through retroviral expression of manganese superoxide dismutase. *J. Gene Med.* *8*, 557–565.
- Spangrude, G.J., and Johnson, G.R. (1990). Resting and activated subsets of mouse multipotent hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 7433–7437.

- Spangrude, G.J., Heimfeld, S., and Weissman, I.L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* *241*, 58–62.
- Spindler, T.J., Tseng, A.W., Zhou, X., and Adams, G.B. (2014). 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.
- Staber, P.B., Zhang, P., Ye, M., Welner, R.S., Nombela-Arrieta, C., Bach, C., Kerenyi, M., Bartholdy, B.A., Zhang, H., Alberich-Jordà, M., et al. (2013). Sustained PU.1 Levels Balance Cell-Cycle Regulators to Prevent Exhaustion of Adult Hematopoietic Stem Cells. *Mol. Cell* *49*, 934–946.
- Stier, S., Ko, Y., Forkert, R., Lutz, C., Neuhaus, T., Grünewald, E., Cheng, T., Dombkowski, D., Calvi, L.M., Rittling, S.R., et al. (2005). Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J. Exp. Med.* *201*, 1781–1791.
- Stoecklein, V.M., Osuka, A., Ishikawa, S., Lederer, M.R., Wanke-Jellinek, L., and Lederer, J.A. (2015). Radiation Exposure Induces Inflammasome Pathway Activation in Immune Cells. *J. Immunol.* *194*, 1178–1189.
- Su, Y.-W., Chiou, W.-F., Chao, S.-H., Lee, M.-H., Chen, C.-C., and Tsai, Y.-C. (2011). Ligustilide prevents LPS-induced iNOS expression in RAW 264.7 macrophages by preventing ROS production and down-regulating the MAPK, NF- κ B and AP-1 signaling pathways. *Int. Immunopharmacol.* *11*, 1166–1172.
- Sugimura, R., He, X.C., Venkatraman, A., Arai, F., Box, A., Semerad, C., Haug, J.S., Peng, L., Zhong, X.-B., Suda, T., et al. (2012). Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche. *Cell* *150*, 351–365.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* *25*, 977–988.
- Suman, S., Johnson, M.D., Fornace, A.J., and Datta, K. (2012). Exposure to Ionizing Radiation Causes Long-Term Increase in Serum Estradiol and Activation of PI3K-Akt Signaling Pathway in Mouse Mammary Gland. *Int. J. Radiat. Oncol.* *84*, 500–507.
- Sutherland, H.J., Eaves, C.J., Eaves, A.C., Dragowska, W., and Lansdorp, P.M. (1989). Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* *74*, 1563–1570.
- Suzuki, T., and Yamamoto, M. (2017). Stress-sensing mechanisms and the physiological roles of the Keap1–Nrf2 system during cellular stress. *J. Biol. Chem.* *292*, 16817–16824.
- Szabó, C. (2006). Poly(ADP-ribose) polymerase activation by reactive nitrogen species--relevance for the pathogenesis of inflammation. *Nitric Oxide Biol. Chem.* *14*, 169–179.

- Szade, K., Zukowska, M., Szade, A., Nowak, W., Skulimowska, I., Ciesla, M., Bukowska-Strakova, K., Gulati, G.S., Kachamakova-Trojanowska, N., Kusienicka, A., et al. (2019). Heme oxygenase-1 deficiency triggers exhaustion of hematopoietic stem cells. *EMBO Rep.* 21.
- Szilvassy, S.J., Humphries, R.K., Lansdorp, P.M., Eaves, A.C., and Eaves, C.J. (1990). Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 8736–8740.
- Taichman, R.S., Reilly, M.J., and Emerson, S.G. (1996). Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures. *Blood* 87, 518–524.
- Tajima, F., Sato, T., Laver, J.H., and Ogawa, M. (2000). CD34 expression by murine hematopoietic stem cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 96, 1989–1993.
- Takubo, K., Goda, N., Yamada, W., Iriuchishima, H., Ikeda, E., Kubota, Y., Shima, H., Johnson, R.S., Hirao, A., Suematsu, M., et al. (2010). Regulation of the HIF-1 α level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 391–402.
- Takubo, K., Nagamatsu, G., Kobayashi, C.I., Nakamura-Ishizu, A., Kobayashi, H., Ikeda, E., Goda, N., Rahimi, Y., Johnson, R.S., Soga, T., et al. (2013). Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 12, 49–61.
- Tang, F.R., and Loke, W.K. (2015). Molecular mechanisms of low dose ionizing radiation-induced hormesis, adaptive responses, radioresistance, bystander effects, and genomic instability. *Int. J. Radiat. Biol.* 91, 13–27.
- Tay, J., Bisht, K., McGirr, C., Millard, S.M., Pettit, A.R., Winkler, I.G., and Levesque, J.-P. (2020). Imaging flow cytometry reveals that granulocyte colony-stimulating factor treatment causes loss of erythroblastic islands in the mouse bone marrow. *Exp. Hematol.* 82, 33–42.
- Teitelbaum, S.L. (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289, 1504–1508.
- Terpstra, V., and van Berkel, T.J. (2000). Scavenger receptors on liver Kupffer cells mediate the in vivo uptake of oxidatively damaged red blood cells in mice. *Blood* 95, 2157–2163.
- Tesio, M., Golan, K., Corso, S., Giordano, S., Schajnovitz, A., Vagima, Y., Shivtiel, S., Kalinkovich, A., Caione, L., Gammaitoni, L., et al. (2011). Enhanced c-Met activity promotes G-CSF-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells via ROS signaling. *Blood* 117, 419–428.
- Thapa, B., and Lee, K. (2019). Metabolic influence on macrophage polarization and pathogenesis. *BMB Rep.* 52, 360–372.
- Tikhonova, A.N., Dolgalev, I., Hu, H., Sivaraj, K.K., Hoxha, E., Cuesta-Domínguez, Á., Pinho, S., Akhmetzyanova, I., Gao, J., Witkowski, M., et al. (2019). The bone marrow microenvironment at single-cell resolution. *Nature* 569, 222–228.

- Till, J.E., and McCULLOCH, E.A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* *14*, 213–222.
- Tober, J., Koniski, A., McGrath, K.E., Vemishetti, R., Emerson, R., de Mesy-Bentley, K.K.L., Waugh, R., and Palis, J. (2007). The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis. *Blood* *109*, 1433–1441.
- Toda, S., Segawa, K., and Nagata, S. (2014). MerTK-mediated engulfment of pyrenocytes by central macrophages in erythroblastic islands. *Blood* *123*, 3963–3971.
- Tonelli, C., Chio, I.I.C., and Tuveson, D.A. (2018). Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid. Redox Signal.* *29*, 1727–1745.
- Tonkin, J., Temmerman, L., Sampson, R.D., Gallego-Colon, E., Barberi, L., Bilbao, D., Schneider, M.D., Musarò, A., and Rosenthal, N. (2015). Monocyte/Macrophage-derived IGF-1 Orchestrates Murine Skeletal Muscle Regeneration and Modulates Autocrine Polarization. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *23*, 1189–1200.
- Tothova, Z., Kollipara, R., Huntly, B.J., Lee, B.H., Castrillon, D.H., Cullen, D.E., McDowell, E.P., Lazo-Kallanian, S., Williams, I.R., Sears, C., et al. (2007). FoxOs Are Critical Mediators of Hematopoietic Stem Cell Resistance to Physiologic Oxidative Stress. *Cell* *128*, 325–339.
- Tsai, H.-H., Lee, W.-R., Wang, P.-H., Cheng, K.-T., Chen, Y.-C., and Shen, S.-C. (2013a). Propionibacterium acnes-induced iNOS and COX-2 protein expression via ROS-dependent NF- κ B and AP-1 activation in macrophages. *J. Dermatol. Sci.* *69*, 122–131.
- Tsai, J.J., Dudakov, J.A., Takahashi, K., Shieh, J.-H., Velardi, E., Holland, A.M., Singer, N.V., West, M.L., Smith, O.M., Young, L.F., et al. (2013b). Nrf2 regulates haematopoietic stem cell function. *Nat. Cell Biol.* *15*, 309–316.
- Tsukimoto, M., Homma, T., Mutou, Y., and Kojima, S. (2009). 0.5 Gy gamma radiation suppresses production of TNF- α through up-regulation of MKP-1 in mouse macrophage RAW264.7 cells. *Radiat. Res.* *171*, 219–224.
- Tsukimoto, M., Tamaishi, N., Homma, T., and Kojima, S. (2010). Low-Dose Gamma-Ray Irradiation Induces Translocation of Nrf2 Into Nuclear in Mouse Macrophage RAW264.7 Cells. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* *51*, 349–353.
- Tulard, A., Hoffschir, F., de Boisferon, F.H., Luccioni, C., and Bravard, A. (2003). Persistent oxidative stress after ionizing radiation is involved in inherited radiosensitivity. *Free Radic. Biol. Med.* *35*, 68–77.
- Tur, J., Vico, T., Lloberas, J., Zorzano, A., and Celada, A. (2017). Macrophages and Mitochondria: A Critical Interplay Between Metabolism, Signaling, and the Functional Activity. *Adv. Immunol.* *133*, 1–36.
- Tzeng, Y.-S., Li, H., Kang, Y.-L., Chen, W.-C., Cheng, W.-C., and Lai, D.-M. (2011). Loss of Cxcl12/Sdf-1 in adult mice decreases the quiescent state of hematopoietic stem/progenitor

cells and alters the pattern of hematopoietic regeneration after myelosuppression. *Blood* **117**, 429–439.

Ulum, B., Mammadova, A., Özyüncü, Ö., Uçkan-Çetinkaya, D., Yanık, T., and Aerts-Kaya, F. (2020). Neuropeptide Y is involved in the regulation of quiescence of hematopoietic stem cells. *Neuropeptides* **80**, 102029.

Van Rooijen, N. (1989). The liposome-mediated macrophage “suicide” technique. *J. Immunol. Methods* **124**, 1–6.

Vashi, N., Andrabi, S.B.A., Ghanwat, S., Suar, M., and Kumar, D. (2017). Ca²⁺-dependent Focal Exocytosis of Golgi-derived Vesicles Helps Phagocytic Uptake in Macrophages. *J. Biol. Chem.* **292**, 5144–5165.

Vávrová, J., Šinkorová, Z., Řezáčová, M., Tichý, A., Filip, S., Mokry, J., and Lukášová, E. (2012). Irradiated stem cells and ageing of the haematopoietic system. *Radiat. Environ. Biophys.* **51**, 205–213.

Velten, L., Haas, S.F., Raffel, S., Blaszkiewicz, S., Islam, S., Hennig, B.P., Hirche, C., Lutz, C., Buss, E.C., Nowak, D., et al. (2017). Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. **30**.

Viatour, P., Somerville, T.C., Venkatasubrahmanyam, S., Kogan, S., McLaughlin, M.E., Weissman, I.L., Butte, A.J., Passegué, E., and Sage, J. (2008). Hematopoietic Stem Cell Quiescence Is Maintained by Compound Contributions of the Retinoblastoma Gene Family. *Cell Stem Cell* **3**, 416–428.

Vignjević, S., Budeč, M., Marković, D., Dikić, D., Mitrović, O., Mojsilović, S., Durić, S.V., Koko, V., Cokić, B.B., Cokić, V., et al. (2014). Chronic psychological stress activates BMP4-dependent extramedullary erythropoiesis. *J. Cell. Mol. Med.* **18**, 91–103.

Visnjic, D., Kalajzic, Z., Rowe, D.W., Katavic, V., Lorenzo, J., and Aguila, H.L. (2004). Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* **103**, 3258–3264.

Wahe, A., Kasmampour, B., Schmaderer, C., Liebl, D., Sandhoff, K., Nykjaer, A., Griffiths, G., and Gutierrez, M.G. (2010). Golgi-to-phagosome transport of acid sphingomyelinase and prosaposin is mediated by sortilin. *J. Cell Sci.* **123**, 2502–2511.

Wake, H., Moorhouse, A.J., Miyamoto, A., and Nabekura, J. (2013). Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends Neurosci.* **36**, 209–217.

Wang, H., Peters, T., Sindrilaru, A., and Scharffetter-Kochanek, K. (2009). Key Role of Macrophages in the Pathogenesis of CD18 Hypomorphic Murine Model of Psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 1100–1114.

Wang, J., Sun, Q., Morita, Y., Jiang, H., Groß, A., Lechel, A., Hildner, K., Guachalla, L.M., Gompf, A., Hartmann, D., et al. (2012). A Differentiation Checkpoint Limits Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal in Response to DNA Damage. *Cell* *148*, 1001–1014.

Wang, Q., Wei, S., Zhou, H., Shen, G., Gan, X., Zhou, S., Qiu, J., Shi, C., and Lu, L. (2019). Hyperglycemia exacerbates acetaminophen-induced acute liver injury by promoting liver-resident macrophage proinflammatory response via AMPK/PI3K/AKT-mediated oxidative stress. *Cell Death Discov.* *5*, 119.

Wang, X., Zalcenstein, A., and Oren, M. (2003). Nitric oxide promotes p53 nuclear retention and sensitizes neuroblastoma cells to apoptosis by ionizing radiation. *Cell Death Differ.* *10*, 468–476.

Wang, X., Dong, F., Zhang, S., Yang, W., Yu, W., Wang, Z., Zhang, S., Wang, J., Ma, S., Wu, P., et al. (2018a). TGF- β 1 Negatively Regulates the Number and Function of Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cell Rep.* *11*, 274–287.

Wang, X., Angelis, N., and Thein, S.L. (2018b). MYB - A regulatory factor in hematopoiesis. *Gene* *665*, 6–17.

Wang, Y., Schulte, B.A., LaRue, A.C., Ogawa, M., and Zhou, D. (2006). Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. *Blood* *107*, 358–366.

Wang, Y., Liu, L., Pazhanisamy, S.K., Li, H., Meng, A., and Zhou, D. (2010). Total body irradiation causes residual bone marrow injury by induction of persistent oxidative stress in murine hematopoietic stem cells. *Free Radic. Biol. Med.* *48*, 348–356.

Wang, Y., Liu, L., and Zhou, D. (2011). Inhibition of p38 MAPK Attenuates Ionizing Radiation-Induced Hematopoietic Cell Senescence and Residual Bone Marrow Injury. *Radiat. Res.* *176*, 743–752.

Warr, M.R., Binnewies, M., Flach, J., Reynaud, D., Garg, T., Malhotra, R., Debnath, J., and Passegué, E. (2013). FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells. *Nature* *494*, 323–327.

Waskow, C., Madan, V., Bartels, S., Costa, C., Blasig, R., and Rodewald, H.-R. (2009). Hematopoietic stem cell transplantation without irradiation. *Nat. Methods* *6*, 267–269.

West, J.D., and Marnett, L.J. (2006). Endogenous Reactive Intermediates as Modulators of Cell Signaling and Cell Death. *Chem. Res. Toxicol.* *19*, 173–194.

Westman, J., Grinstein, S., and Marques, P.E. (2020). Phagocytosis of Necrotic Debris at Sites of Injury and Inflammation. *Front. Immunol.* *10*, 3030.

Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R.C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C.F., Eshkind, L., Bockamp, E., et al. (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* *135*, 1118–1129.

Winkler, I.G. (2012). Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nat. Med.* *18*, 9.

Winkler, I.G., Sims, N.A., Pettit, A.R., Barbier, V., Nowlan, B., Helwani, F., Poulton, I.J., van Rooijen, N., Alexander, K.A., Raggatt, L.J., et al. (2010). Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood* *116*, 4815–4828.

Wolf, N.S., Koné, A., Priestley, G.V., and Bartelmez, S.H. (1993). In vivo and in vitro characterization of long-term repopulating primitive hematopoietic cells isolated by sequential Hoechst 33342-rhodamine 123 FACS selection. *Exp. Hematol.* *21*, 614–622.

Wong, J.Y.C., Filippi, A.R., Dabaja, B.S., Yahalom, J., and Specht, L. (2018). Total Body Irradiation: Guidelines from the International Lymphoma Radiation Oncology Group (ILROG). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *101*, 521–529.

Woolthuis, C.M., and Park, C.Y. (2016). Hematopoietic stem/progenitor cell commitment to the megakaryocyte lineage. *Blood* *127*, 1242–1248.

Worton, R.G., McCulloch, E.A., and Till, J.E. (1969). Physical separation of hemopoietic stem cells differing in their capacity for self-renewal. *J. Exp. Med.* *130*, 91–103.

Wu, A.M., Till, J.E., Siminovitch, L., and McCulloch, E.A. (1967). A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells. *J. Cell. Physiol.* *69*, 177–184.

Wu, A.M., Siminovitch, L., Till, J.E., and McCulloch, E.A. (1968). Evidence for a relationship between mouse hemopoietic stem cells and cells forming colonies in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *59*, 1209–1215.

Wu, Q., Allouch, A., Martins, I., Modjtahedi, N., Deutsch, E., and Perfettini, J.-L. (2017). Macrophage biology plays a central role during ionizing radiation-elicited tumor response. *Biomed. J.* *40*, 200–211.

Wunderlich, R., Ernst, A., Rödel, F., Fietkau, R., Ott, O., Lauber, K., Frey, B., and Gaipl, U.S. (2015). Low and moderate doses of ionizing radiation up to 2 Gy modulate transmigration and chemotaxis of activated macrophages, provoke an anti-inflammatory cytokine milieu, but do not impact upon viability and phagocytic function. *Clin. Exp. Immunol.* *179*, 50–61.

Wysoczynski, M., Ratajczak, J., Pedziwiatr, D., Rokosh, G., Bolli, R., and Ratajczak, M.Z. (2015). Identification of heme oxygenase 1 (HO-1) as a novel negative regulator of mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cell Rev. Rep.* *11*, 110–118.

Xu, C., Gao, X., Wei, Q., Nakahara, F., Zimmerman, S.E., Mar, J., and Frenette, P.S. (2018). Stem cell factor is selectively secreted by arterial endothelial cells in bone marrow. *Nat. Commun.* *9*, 2449.

Xu, J., Luo, Y., Yuan, C., Han, L., Wu, Q., Xu, L., Gao, Y., Sun, Y., Ma, S., Tang, G., et al. (2020). Downregulation of Nitric Oxide Collaborated with Radiotherapy to Promote Anti-Tumor Immune Response via Inducing CD8+ T Cell Infiltration. *Int. J. Biol. Sci.* *16*, 1563–1574.

Yalcin, S., Zhang, X., Luciano, J.P., Mungamuri, S.K., Marinkovic, D., Vercherat, C., Sarkar, A., Grisotto, M., Taneja, R., and Ghaffari, S. (2008). Foxo3 Is Essential for the Regulation of Ataxia Telangiectasia Mutated and Oxidative Stress-mediated Homeostasis of Hematopoietic Stem Cells. *J. Biol. Chem.* *283*, 25692–25705.

Yamakura, F., Matsumoto, T., Fujimura, T., Taka, H., Murayama, K., Imai, T., and Uchida, K. (2001). Modification of a single tryptophan residue in human Cu,Zn-superoxide dismutase by peroxynitrite in the presence of bicarbonate. *Biochim. Biophys. Acta* *1548*, 38–46.

Yamamori, T., Yasui, H., Yamazumi, M., Wada, Y., Nakamura, Y., Nakamura, H., and Inanami, O. (2012). Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radic. Biol. Med.* *53*, 260–270.

Yamashita, M., Nitta, E., and Suda, T. (2015). Aspp1 Preserves Hematopoietic Stem Cell Pool Integrity and Prevents Malignant Transformation. *Cell Stem Cell* *17*, 23–34.

Yamazaki, K., and Allen, T.D. (1991). Ultrastructural and morphometric alterations in bone marrow stromal tissue after 7 Gy irradiation. *Blood Cells* *17*, 527–549.

Yamazaki, S., Ema, H., Karlsson, G., Yamaguchi, T., Miyoshi, H., Shioda, S., Taketo, M.M., Karlsson, S., Iwama, A., and Nakauchi, H. (2011). Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell* *147*, 1146–1158.

Yang, L., and Bryder, D. (2005). Identification of Lin⁻Sca1⁺Kit⁺CD34⁺Flt3⁻ short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *105*, 7.

Yang, Y., Wang, J., Guo, S., Pourteymour, S., Xu, Q., Gong, J., Huang, Z., Shen, Z., Diabakte, K., Cao, Z., et al. (2020). Non-lethal sonodynamic therapy facilitates the M1-to-M2 transition in advanced atherosclerotic plaques via activating the ROS–AMPK–mTORC1–autophagy pathway. *Redox Biol.* *32*, 101501.

Yilmaz, O.H., Valdez, R., Theisen, B.K., Guo, W., Ferguson, D.O., Wu, H., and Morrison, S.J. (2006). Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature* *441*, 475–482.

Yoshida, T., Goto, S., Kawakatsu, M., Urata, Y., and Li, T.-S. (2012). Mitochondrial dysfunction, a probable cause of persistent oxidative stress after exposure to ionizing radiation. *Free Radic. Res.* *46*, 147–153.

Yoshihara, H., Arai, F., Hosokawa, K., Hagiwara, T., Takubo, K., Nakamura, Y., Gomei, Y., Iwasaki, H., Matsuoka, S., Miyamoto, K., et al. (2007). Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell* *1*, 685–697.

Yu, H., Yuan, Y., Shen, H., and Cheng, T. (2006). Hematopoietic stem cell exhaustion impacted by p18 INK4C and p21 Cip1/Waf1 in opposite manners. *Blood* *107*, 1200–1206.

Yu, H., Shen, H., Yuan, Y., XuFeng, R., Hu, X., Garrison, S.P., Zhang, L., Yu, J., Zambetti, G.P., and Cheng, T. (2010). Deletion of Puma protects hematopoietic stem cells and confers long-term survival in response to high-dose gamma-irradiation. *Blood* 115, 3472–3480.

Zakariya, N., and Kahn, M.-T. (2014). Review Article Benefits and Biological Effects of Ionizing Radiation.

Zeng, H., Hu, M., Lu, Y., Zhang, Z., Xu, Y., Wang, S., Chen, M., Shen, M., Wang, C., Chen, F., et al. (2019). MicroRNA 34a promotes ionizing radiation-induced DNA damage repair in murine hematopoietic stem cells. *FASEB J.* 33, 8138–8147.

Zhang, J., and Link, D.C. (2016). Targeting of Mesenchymal Stromal Cells by Cre-Recombinase Transgenes Commonly Used to Target Osteoblast Lineage Cells. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 31, 2001–2007.

Zhang, H., Han, G., Liu, H., Chen, J., Ji, X., Zhou, F., Zhou, Y., and Xie, C. (2011). The Development of Classically and Alternatively Activated Macrophages Has Different Effects on The Varied Stages of Radiation-induced Pulmonary Injury in Mice. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 52, 717–726.

Zhang, H., Zhai, Z., Wang, Y., Zhang, J., Wu, H., Wang, Y., Li, C., Li, D., Lu, L., Wang, X., et al. (2013). Resveratrol ameliorates ionizing irradiation-induced long-term hematopoietic stem cell injury in mice. *Free Radic. Biol. Med.* 54, 40–50.

Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.-G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., et al. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425, 836–841.

Zhang, J., Grindley, J.C., Yin, T., Jayasinghe, S., He, X.C., Ross, J.T., Haug, J.S., Rupp, D., Porter-Westpfahl, K.S., Wiedemann, L.M., et al. (2006). PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. *Nature* 441, 518–522.

Zhang, J., Supakorndej, T., Krambs, J.R., Rao, M., Abou-Ezzi, G., Ye, R.Y., Li, S., Trinkaus, K., and Link, D.C. (2019a). Bone marrow dendritic cells regulate hematopoietic stem/progenitor cell trafficking. *J. Clin. Invest.* 129, 2920–2931.

Zhang, Y., Gao, S., Xia, J., and Liu, F. (2018). Hematopoietic Hierarchy – An Updated Roadmap. *Trends Cell Biol.* 28, 976–986.

Zhang, Z., Huang, Z., Ong, B., Sahu, C., Zeng, H., and Ruan, H.-B. (2019b). Bone marrow adipose tissue-derived stem cell factor mediates metabolic regulation of hematopoiesis. *Haematologica* 104, 1731–1743.

Zhao, M., Ross, J.T., Itkin, T., Perry, J.M., Venkatraman, A., Haug, J.S., Hembree, M.J., Deng, C.-X., Lapidot, T., He, X.C., et al. (2012). FGF signaling facilitates postinjury recovery of mouse hematopoietic system. *Blood* 120, 1831–1842.

Zhao, M., Perry, J.M., Marshall, H., Venkatraman, A., Qian, P., He, X.C., Ahamed, J., and Li, L. (2014). Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* *20*, 1321–1326.

Zhao, M., Tao, F., Venkatraman, A., Li, Z., Smith, S.E., Unruh, J., Chen, S., Ward, C., Qian, P., Perry, J.M., et al. (2019). N-Cadherin-Expressing Bone and Marrow Stromal Progenitor Cells Maintain Reserve Hematopoietic Stem Cells. *Cell Rep.* *26*, 652-669.e6.

Zhao, Y., Zhou, J., Liu, D., Dong, F., Cheng, H., Wang, W., Pang, Y., Wang, Y., Mu, X., Ni, Y., et al. (2015). ATF4 plays a pivotal role in the development of functional hematopoietic stem cells in mouse fetal liver. *Blood* *126*, 2383–2391.

Zhao, Y., Tian, P., Han, F., Zheng, J., Xia, X., Xue, W., Ding, X., and Ding, C. (2017). Comparison of the characteristics of macrophages derived from murine spleen, peritoneal cavity, and bone marrow. *J. Zhejiang Univ.-Sci. B* *18*, 1055–1063.

Zhao, Y., Zou, W., Du, J., and Zhao, Y. (2018). The origins and homeostasis of monocytes and tissue-resident macrophages in physiological situation. *J. Cell. Physiol.* *233*, 6425–6439.

Zhou, B.O., Yue, R., Murphy, M.M., Peyer, J.G., and Morrison, S.J. (2014). Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell* *15*, 154–168.

Zhou, B.O., Ding, L., and Morrison, S.J. (2015). Hematopoietic stem and progenitor cells regulate the regeneration of their niche by secreting Angiopoietin-1. *ELife* *4*, e05521.

Zhou, B.O., Yu, H., Yue, R., Zhao, Z., Rios, J.J., Naveiras, O., and Morrison, S.J. (2017). Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF. *Nat. Cell Biol.* *19*, 891–903.

Zhou, Y., Xia, L., He, Z.S., Ouyang, W., Z, H., and Xie, C.H. (2010). Modulation of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in RAW264.7 cells by irradiation. *Mol. Med. Rep.* *3*, 809–813.

Zhu, R.-J., Wu, M.-Q., Li, Z.-J., Zhang, Y., and Liu, K.-Y. (2013). Hematopoietic recovery following chemotherapy is improved by BADGE-induced inhibition of adipogenesis. *Int. J. Hematol.* *97*, 58–72.

Zorov, D.B., Juhaszova, M., and Sollott, S.J. (2006). Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *1757*, 509–517.

Zou, P., Yoshihara, H., Hosokawa, K., Tai, I., Shinmyozu, K., Tsukahara, F., Maru, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.I., and Suda, T. (2011). p57Kip2 and p27Kip1 Cooperate to Maintain Hematopoietic Stem Cell Quiescence through Interactions with Hsc70. *Cell Stem Cell* *9*, 247–261.

Résumé

Avec plus d'un patient sur deux qui en bénéficie, la radiothérapie est l'une des méthodes les plus utilisées dans le traitement des cancers. Malgré son efficacité dans l'éradication des tumeurs, le principal inconvénient de cette technique est la toxicité qu'elle peut entraîner sur les tissus sains environnants. Au niveau de la moelle osseuse, qui contient les cellules souches hématopoïétiques (CSH), cette toxicité peut être très délétère. En effet, les CSH sont responsables de l'hématopoïèse tout au long de la vie d'un individu, d'où l'importance de les préserver. Ces cellules sont localisées dans un microenvironnement cellulaire, appelé niche hématopoïétique, jouant un rôle majeur dans leur protection et le maintien de leur intégrité. Au sein de cette niche, les macrophages résidents de la moelle osseuse, caractérisés par l'expression du marqueur de surface CD169, ont montré un rôle à la fois dans le maintien des CSH dans leur niche, mais aussi dans la protection des cellules vis-à-vis d'un stress oxydatif. Dans ce contexte, mon projet de thèse avait pour but de définir le rôle de ces macrophages résidents de la moelle osseuse dans la réponse des CSH à une irradiation corps entier (TBI) de 2 Gy, dose couramment utilisée en radiothérapie fractionnée.

Afin de répondre à cette question, j'ai utilisé deux modèles de souris déplétées en macrophages CD169⁺ (MΦ CD169⁺) : un modèle pharmacologique (clodronate-liposomes) et un modèle génétique (souris CD169^{DTTR/+}). Dans ces deux modèles, j'ai montré qu'une déplétion des MΦ CD169⁺ avant l'irradiation entraîne à court-terme une diminution moins importante du réservoir de CSH, accompagnée d'une diminution de leur apoptose et d'une absence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) généralement induites par l'irradiation. A plus long-terme, l'absence de MΦ CD169⁺ permet un rétablissement complet d'un réservoir fonctionnel de CSH après irradiation. L'ensemble de ces résultats démontre que la présence des macrophages résidents lors d'une irradiation a un rôle délétère en diminuant la réserve de CSH au sein de la moelle osseuse.

Afin de mettre en évidence le ou les mécanismes provoquant cet effet délétère, je me suis intéressée à la réponse directe des MΦ CD169⁺ à l'irradiation, en ciblant particulièrement les phénomènes liés au stress oxydatif. J'ai observé que la TBI entraîne une augmentation de la proportion de MΦ CD169⁺ qui produisent de l'oxyde nitrique (NO), une des caractéristiques de la réponse de type pro-inflammatoire des MΦ. Cette augmentation est corrélée à une augmentation des CSH ayant des peroxy-nitrites, oxydants extrêmement cytotoxiques issus de la réaction entre les NO et les ROS. L'utilisation de modulateurs négatifs ou positifs des NO a montré qu'après une TBI de 2 Gy, la diminution de la production de NO par les MΦ CD169⁺ permet de limiter l'apoptose des CSH et de restaurer leur nombre, alors que l'augmentation de NO dans l'environnement médullaire entraîne une diminution de leur nombre.

Cette étude démontre que l'irradiation accroît la production de NO par les macrophages résidents de la moelle, entraînant un effet nocif sur la réserve de CSH. Ces nouvelles données identifient le macrophage résident comme un candidat potentiel pour moduler les effets de l'irradiation sur les CSH.

Mots clés : Irradiation corps entier ; macrophages CD169⁺ ; cellules souches hématopoïétiques ; ROS ; oxyde nitrique ; peroxy-nitrites

Abstract

With more than half of patients benefiting from it, radiotherapy is one of the most used method in cancer treatment. Despite its efficiency to eradicate tumors, its main inconvenience is the toxicity it can bring to surrounding healthy tissues. In bone marrow, which contains the hematopoietic stem cells (HSC), this toxicity can be highly harmful. Indeed, HSC are responsible for life-long generation of blood cells emphasizing the importance to preserve them. Those cells are localized in a cellular microenvironment, the hematopoietic niche, which is essential for HSC protection and to maintain their integrity. Within this niche, bone marrow resident macrophages expressing the CD169 surface marker have been shown to play a role in the maintenance of HSC in their niche, but also in their protection toward an oxidative stress. Therefore, the aim of my project was to define the role of resident bone marrow macrophages in HSC response to a 2 Gy total body irradiation (TBI), dose commonly used in fractionate radiation therapy.

To address this question, I have used two models of mice depleted in CD169⁺ macrophages (CD169⁺ MΦ): a pharmacological model (clodronate-liposomes) and a genetic model (CD169^{DTTR/+} mice). In both models, I have shown that CD169⁺ MΦ depletion before irradiation leads, short term after TBI, to a less important diminution of the HSC pool, coupled with a decrease in their apoptotic rate and an absence of reactive oxygen species (ROS) that are generally induced by radiations. Longer term after irradiation, this absence of CD169⁺ MΦ allows a complete recovery of a functional pool of HSC. Taken together, those results demonstrate that the presence of resident macrophages during an irradiation has a deleterious effect by diminishing the HSC pool within the bone marrow.

To highlight the mechanism(s) leading to this deleterious effect, I investigated the direct response of CD169⁺ MΦ to irradiation, focusing on the oxidative stress response. I have observed that TBI induces an increase of the proportion of CD169⁺ MΦ producing nitric oxide (NO), what is characteristic of the macrophage pro-inflammatory response. This increase is correlated with an augmentation of HSC with peroxy-nitrites, highly cytotoxic oxidants derived from the reaction between NO and ROS. The use of positive and negative NO modulators has shown that after a 2 Gy TBI, the diminution of NO production by CD169⁺ MΦ decreases HSC apoptosis and restore their number, whereas a NO augmentation in the medullar microenvironment leads to the decrease of their number.

Thus, this study demonstrates that irradiation increases NO production by bone marrow resident macrophages, leading to a harmful effect toward HSC. Those new data identify the resident macrophage as a promising candidate to modulate irradiation effects on HSC.

Keywords: Total Body irradiation; CD169⁺ macrophages; hematopoietic stem cells; ROS; nitric oxide; peroxy-nitrites