



HAL
open science

Rôle des cellules stromales périostéales dans la régénération de la niche hématopoïétique

Tony Marchand

► **To cite this version:**

Tony Marchand. Rôle des cellules stromales périostéales dans la régénération de la niche hématopoïétique. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2021. Français. NNT : 2021REN1B062 . tel-04050993

HAL Id: tel-04050993

<https://theses.hal.science/tel-04050993v1>

Submitted on 29 Mar 2023

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : *Cancérologie*

Par

Tony MARCHAND

Rôle des cellules stromales périostéales dans la régénération de la niche hématopoïétique

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 17 décembre 2021

Unités de recherche : UMR U1236, Rennes, France

**Laboratoire du Pr Paul Frenette, Albert Einstein College of Medicine, New York,
Etats-Unis d'Amérique**

Rapporteurs avant soutenance :

Céline COLNOT

DR INSERM, Université Paris Est Créteil, INSERM, IMRB

Françoise PFLUMIO

DR INSERM, UMR E008, U1274 INSERM, Université Paris-Saclay, CEA

Composition du Jury :

Président : Karin TARTE

PU-PH, INSERM UMR1236, Université Rennes1, CHU de Rennes

Examineurs : Gérard SOCIE

PU-PH, INSERM U976, Université de Paris, Hôpital Saint Louis, Paris

Cyril BROCCARDO

DR INSERM, UMR1037, Centre de recherche en cancérologie de Toulouse

Céline COLNOT

DR INSERM, Université Paris Est Créteil, INSERM IMRB

Françoise PFLUMIO

DR INSERM, UMR E008, U 1274, Université Paris-Saclay, CEA

Dir. de thèse : Thierry LAMY

PU-PH, INSERM UMR1236, Université Rennes1, CHU de Rennes

Remerciements

J'ai eu la chance, ou plutôt l'immense privilège de conduire mes travaux de recherche dans le laboratoire du Professeur Paul Sylvain Frenette. Il est impossible de résumer en quelques lignes l'incroyable expérience représentée par ces 3 années à New-York. Difficile également de retranscrire les sentiments qui m'ont parcouru à l'annonce de son décès. Paul aimait partager sa passion et son expertise avec ses post-doc, ses « frenocytes » comme nous nous surnommions. Je garde en mémoire son excellence sur le plan scientifique, son humour incisif et son exigence sans équivalence lors des labmeetings tant redoutés. Je me rappelle également des sorties barbecue, des beer sessions, des matchs de basket, des discussions en français dans son bureau sur la France, sa gastronomie et ses vins qu'il appréciait tant. Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien et les nombreux conseils de ce brillantissime chercheur.

Je remercie le Professeur Thierry Lamy sans qui cette mobilité n'aurait pas été possible. Votre soutien sans faille depuis le premier jour de mon internat d'hématologie, il y a 12 ans déjà, m'aide chaque jour à progresser dans ma carrière hospitalo-universitaire. Plus qu'un mentor, vous êtes pour moi un modèle de rigueur, d'efficacité mais surtout d'humanité. Merci pour vos nombreux conseils, coups de téléphone aux US pour prendre des nouvelles sur les projets mais aussi sur ma famille et la vie quotidienne dans cet immense pays. Merci pour vos petits mots dans les moments importants qui ont marqué ma vie. Enfin, merci pour ce que vous êtes et ce que vous faites au quotidien pour notre équipe et service.

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail et de partager leur expertise.

Je remercie le Docteur Céline Colnot d'avoir accepté avec enthousiasme de participer au jury en tant que rapporteur. Vos travaux ont largement contribué à l'avancé de mon projet et c'est pour moi un immense honneur de pouvoir vous présenter mon travail et d'échanger avec vous.

Je remercie le Docteur Françoise Pflumio d'avoir accepté d'être rapporteur de mon travail. C'est toujours un plaisir d'échanger avec vous sur le microenvironnement et je suis certain que nous aurons des projets en commun dans l'avenir autour de ce qui nous passionne : le stroma et la LAL.

Je remercie le Professeur Gérard Socié d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Je garde un souvenir incroyable de mon passage dans votre service en tant qu'interne. Tant de choses apprises en l'espace de 6 mois, tant de bons moments partagés au sein de votre excellente équipe. Je suis vraiment très honoré de vous compter parmi les membres de mon jury.

Je remercie le Docteur Cyril Broccardo d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Partageant désormais le bureau avec Stéphane, votre réputation vous a précédée et je suis impatient de pouvoir échanger avec vous.

Enfin je remercie le Professeur Karin Tarte. Merci de m'accueillir dans ton équipe, de m'accorder ta confiance et de nous donner la possibilité avec Stéphane de développer des projets de recherche sur la leucémie aigüe. Je réalise chaque jour la chance que j'ai de pouvoir travailler dans ces conditions très favorables. Merci pour ton soutien, tes conseils dans la

préparation du papier et plus largement dans la concrétisation d'un projet HU autour d'une thématique qui me passionne.

Un grand merci à tous ceux qui m'ont soutenu durant ces années :

A Sandra Pinho et Maria Maryanovich, mes 2 post-docs adorées. Merci pour vos conseils tout au long de ma thèse, de la préhension des souris à mon arrivée au design d'expériences sur l'autophagie à la fin. Merci surtout pour les nombreux moments de bonheurs partagés autour d'un café ou d'une bière. Merci pour votre amitié qui reste intacte malgré la distance.

A l'ensemble de l'équipe du labo de Paul Frenette, les post-doc, lab-manager... Merci pour votre bonne humeur, ce sentiment d'appartenir à une famille qui rendait la science encore plus fun.

Aux Docteurs Frédéric Mourcin et Stéphane Mancini pour avoir accepté de sacrifier un weekend pour se consacrer à la relecture de ce manuscrit. Merci surtout pour votre bonne humeur, votre soutien au quotidien malgré mes aller-retours entre l'unité, l'université et le CHU. Bref, merci d'accepter un clinicien au sein de votre duo de choc !

A mes collègues cliniciens en particulier les Docteurs Faustine Lhomme et Jean-Baptiste Méar de m'avoir remplacé à plusieurs reprises ces dernières semaines pour me permettre de finaliser ce travail. Quel bonheur de travailler au quotidien avec vous ! Un grand merci au Professeur Houot de m'accorder le temps nécessaire à la poursuite de projets de recherche au sein du laboratoire INSERM au prix d'une présence clinique plus limitée.

Aux organismes et associations qui ont permis le financement de cette mobilité, en particulier l'ADHO, la Société Française d'Hématologie, la fondation ARC, le CHU de Rennes et la fondation Philippe.

A ma famille de m'avoir encouragé à aller au bout de ce projet malgré l'éloignement que cela entraîne. Que de sessions Skype, de photos et vidéos WhatsApp partagées en 3 ans ! Que de bons souvenirs également de moments partagés à Angers ou New York autour d'un bon verre d'Aubance ou d'un énorme burger...

Cette mobilité représentait un projet scientifique mais également un projet de vie. Merci à toi Amandine de m'avoir encouragé et suivi avec notre petit bout alors âgé de 5 mois seulement de l'autre côté de l'Atlantique. Trois années qui resteront à jamais marquées dans nos mémoires. Trois années inoubliables faites de petites galères mais surtout de découvertes et de grands moments de bonheurs. Merci d'avoir pardonné mes longues journées au labo, d'avoir assuré tant de choses pour que ce projet soit une réussite. Nous garderons un lien particulier avec les Etats-Unis par notre petit newyorkais...

Je dédie ce travail à mon père parti trop tôt. Je sais à quel point tu étais heureux de nous voir vivre cette aventure et fier de mon parcours. Ce parcours je le dois en grande partie à toi. Tu as été et reste un modèle dans ma vie chaque jour.

Table des matières

Remerciements	2
Liste des abréviations	7
Résumé	11
I. Introduction	14
A. Le tissu osseux	14
1. Anatomie	14
2. Développement osseux	18
B. Le périoste : généralités	21
1. Anatomie	21
2. Le périoste en médecine régénérative	22
C. La niche hématopoïétique	23
1. La niche endostéale	24
2. Niches vasculaires : localisation des cellules souches hématopoïétiques et rôle des cellules endothéliales dans l'hématopoïèse	25
3. Innervation du tissu osseux et de la moelle osseuse	27
4. Adipocytes et hématopoïèse	32
5. Régulation de l'hématopoïèse par les cellules hématopoïétiques	34
6. Altération de la niche médullaire par les radiations ionisantes et chimiothérapies	36
D. Les cellules stromales mésenchymateuses	37
1. Historique	37
2. Définition	39
3. Les cellules stromales au sein de la moelle osseuse (BM-MSc)	40
4. Les cellules stromales du périoste	45
II. Objectifs de la thèse	52
A. Objectif n°1 : Caractérisation du modèle	53

B.	Objectif n°2 : Etude de la contribution des P-SSC dans la régénération médullaire	53
C.	Objectif n°3 : Comparaison des P-SSC et des BM-MSC.....	53
III.	Principaux résultats	55
A.	Caractérisation d'un modèle d'étude de la régénération médullaire	55
1.	Après transplantation : le greffon est le site d'une régénération du microenvironnement médullaire et d'une reprise de l'hématopoïèse.....	55
2.	Origine des cellules au sein du greffon	58
3.	Au sein du greffon, les cellules stromales sont fonctionnelles	59
B.	Le stress lié à la transplantation induit une nécrose des BM-MSC et une expansion des P-SSC	60
1.	Les cellules stromales du périoste présentent une résistance au stress induit par la greffe supérieure à la résistance des cellules stromales médullaires.	60
C.	Les cellules du périoste ont la capacité de migrer dans la cavité médullaire et de contribuer à la reconstitution hématopoïétique	62
D.	Les cellules du périoste ont un profil de résistance au stress différent des BM-MSC les protégeant du stress induit par la transplantation.	65
IV.	Conclusion et discussion	69
A.	Différences et similitudes entre la niche normale et notre modèle.....	70
B.	Avantages et limites du modèle pour l'étude de la régénération médullaire.....	72
C.	Caractérisation des P-SSC impliquées dans la régénération de la niche hématopoïétique: choix du modèle et prise en compte de l'hétérogénéité stromale.	73
D.	CONCLUSION	75
V.	REFERENCES	76
VI.	ANNEXES - ARTICLES.....	87
	Article 1. Periosteal skeletal stem cells represent a source of bone marrow mesenchymal stem cells contributing to the bone marrow regeneration after injury.....	88
	Article 2. Lineage-Biased Hematopoietic Stem Cells Are Regulated by Distinct Niches.....	119
	Article 3. Leukemic Stem Cells: From Leukemic Niche Biology to Treatment Opportunities...140	

Table des Figures

Figure 1. Anatomie des os longs	15
Figure 2. Innervation du périoste.....	16
Figure 3. Vascularisation de la moelle osseuse	17
Figure 4. L'ossification endochondrale	20
Figure 5. Anatomie du périoste.....	22
Figure 6. La niche hématopoïétique.....	24
Figure 7. Rôle du système nerveux sur le tissu osseux	29
Figure 8. Régulation des oscillations circadiennes de CSH chez la souris.....	31
Figure 9. A. Maximov dans son laboratoire de culture cellulaire à Saint Petersburg.....	38
Figure 10. Effets d'une délétion de Scf et Cxcl12 au sein des différentes populations stromales péri-vasculaires.	44
Figure 11. Isolation de cellules du périoste par une technique de migration	47
Figure 12. Comparaison des CFU-F de la moelle osseuse, de l'os et du périoste murin	49
Figure 13. Recrutement des cellules stromales périostéales dans les suite d'une fracture....	50
Figure 14. Caractérisation d'un modèle d'étude de la régénération médullaire	56
Figure 15. Analyse du compartiment hématopoïétique à 5 mois de la greffe	57
Figure 16. Analyse de l'origine des cellules au sein du greffon	58
Figure 17. Les cellules stromales au sein du greffon sont fonctionnelles	60
Figure 18. La greffe est suivie d'une expansion des cellules stromales périostéales	62
Figure 19. Les P-SSC migrent dans la cavité médullaire où elles expriment les cytokines de soutien à l'hématopoïèse.....	64
Figure 20. Les P-SSC ont un profil métabolique différent des BM-MSC	66
Figure 21. Les BM-MSC sont plus sensibles au stress que les P-SSC.....	67

Liste des abréviations

ADN: Acide Désoxyribonucléique

Angpt1: Angiopoietin 1

ANOVA: analysis of variance

ASC: Adipose-derived Stromal Cells

BM-MSC: Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell

Bmp4: Bone Morphogenic Protein 4

BMX: Bone marrow x

CAR Cells: CXCL12-Abundant Reticular Cells

CCL: Chemokine (C-C motif) ligand

CD: Cluster of Differentiation

CE: Cellules Hématopoïétiques

CEA: Cellule Endothéliale Artériolaire

CES: Cellule Endothéliale Sinusoïdale

CFU-E: Colony Forming Unit Erythroblast

CFU-F: Colony Forming Unit Fibroblast

CGRP: Calcitonin Gene-Related Peptide

Csf-1: colony-stimulating factor 1

CSH: Cellule Souche Hématopoïétique

CSM: Cellule Stromale Mésoenchymateuse

CTSK: Cathepsine K

CXCL: Chemokine (CXC motif) Ligand

CXCR4: C-X-C Motif Chemokine Receptor 4

DLL4: Delta-like protein 4

DP: Diaphyse

Emcn: Endomucine

EP: Epiphyse

EPO: Erythropoïétine

FGF: Fibroblast Growth Factor

Gapdh: glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor

GFP: Green Fluorescent Protein

Gls: Glutaminase

GMP: granulocyte macrophage progenitor cells

GP: Plaque de croissance (Growth Plate)

Gpx1: glutathione peroxydase

HSPC: Hematopoietic Stem Cell and Progenitors Cells

iDTR: inducible Diphtheria Toxin Receptor

IL: Interleukin

ISCT: International Society for Cell & Gene Therapy

LepR: Leptin Receptor

Lin: Lineage (marqueurs de lignée)

LSK: lineage negative, Sca1 positive, c-kit negative

LT-HSC: Long Term Hematopoietic Stem Cell

MEC: Matrice Extra-Cellulaire

MO: Moelle Osseuse

MP: Métaphyse

MPP: Multipotent Progenitor

mT/mG: membrane-localized tdTomato/membrane-localized EGFP

MYH11: Myosin Heavy chain 11

NEG: Négatif

Ng2: Neural/Glial Antigen 2

Ngf: Nerve Growth Factor

OB: ostéoblastes

Opn: Osteopontin

P: Périoste

PDGFR α : platelet-derived growth factor receptor A

POS: Positif

Postn: Periostin

PRX1: Paired-Related Homeobox Protein 1

P-SSC: Periosteal Skeletal Stem Cell

ROS: Reactive Oxygen Species

RANKL: Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand

RNA: Ribonucleic acid

Runx 2: Runt-related transcription factor 2

Sca-1: Stem Cells Antigen-1

Scf: Stem Cell Factor

sc-RNAseq: Single Cell RNA sequencing

SEM: standard error of mean

SLAM: Signaling lymphocyte Activation Molecule

Sod1: superoxyde dismutase

SSC: Skeletal Stem Cell

TGF β : Transforming Growth Factor β

TH: Tyrosine Hydroxylase

Tmt: Tomato

UBC: Ubiquitin C

Vcam: Vascular cell adhesion protein 1

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

vWF: Von Willebrand Factor

WT: Wild Type

Résumé

La moelle osseuse assure le renouvellement quotidien des cellules sanguines : globules rouges, leucocytes et plaquettes. On estime à 10^{11} le nombre de cellules produites quotidiennement. Situées au sommet de la hiérarchie, les cellules souches hématopoïétiques sont des cellules pluripotentes douées de propriétés d'autorenouveaulement et de différenciation. Ces propriétés sont très finement régulées au sein d'un microenvironnement complexe, appelé niche, constitué notamment de vaisseaux sanguins, nerfs et cellules stromales.

Les cellules stromales mésenchymateuses constituent une population hétérogène de cellules non hématopoïétiques. Initialement considérées comme de simples cellules de soutien assurant l'architecture de la moelle osseuse, les cellules stromales mésenchymateuses suscitent un intérêt croissant compte tenu de leur rôle dans le contrôle de l'hématopoïèse et leurs propriétés immunomodulatrices et régénératives. En dehors de la moelle osseuse, des populations stromales ont été décrites dans de nombreux tissus comme le périoste, fine membrane innervée et vascularisée entourant les os et impliquée dans le remodelage du tissu osseux.

L'origine des cellules stromales mésenchymateuses médullaires et l'existence d'une éventuelle hiérarchie entre les différentes populations restent à ce jour des sujets débattus. Dans ce travail, nous avons développé un modèle d'étude de la régénération de la niche hématopoïétique reposant sur la greffe sous cutanée d'un fémur entier. Après une phase de nécrose induite par l'anoxie et une disparition totale des cellules présentes dans la cavité médullaire, le greffon est le siège d'une néo vascularisation et d'une colonisation par les cellules souches hématopoïétiques de l'hôte avec la reconstitution d'un microenvironnement et d'une hématopoïèse fonctionnelle. De manière intéressante, alors que les cellules stromales médullaires sont rapidement détruites après la greffe, nous avons observé une expansion des cellules stromales au sein du périoste. Ces cellules stromales sont capables de migrer dans la moelle osseuse et de soutenir l'hématopoïèse. Nos données préliminaires suggèrent une signature métabolique de quiescence qui pourrait expliquer la plus forte

résistance au stress des cellules stromales du périoste en comparaison à celles de la moelle osseuse.

En conclusion, le périoste apparaît comme une source de cellules souches stromales mésenchymateuses médullaires et pourrait être impliqué dans la régénération de la niche hématopoïétique après agression.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

I. Introduction

A. Le tissu osseux

1. Anatomie

Le corps humain est composé de 206 os chez l'adulte. Les os constituent la charpente du corps, représentant un composant majeur de l'appareil locomoteur et une réserve en minéraux. Ils protègent également les organes vulnérables comme le cœur, le foie ou la rate. On distingue les os plats (sternum...), les os courts (tarse...), les os intermédiaires (vertèbres...) et les os long (fémurs).

Les os longs sont anatomiquement divisés en 3 parties (**Figure 1**) :

- Les épiphyses : extrémités comprenant le cartilage articulaire, une couche superficielle d'os cortical dense résistante aux pressions et un tissu osseux spongieux organisé en travées réparties selon les lignes de force.
- La diaphyse : partie centrale de l'os constituée d'un os cortical compact et de la cavité médullaire au centre. Cette cavité contient la moelle hématopoïétique ou un tissu adipeux (moelle « jaune ») chez l'Homme adulte.
- Les métaphyses : jonction entre la diaphyse et les épiphyses.

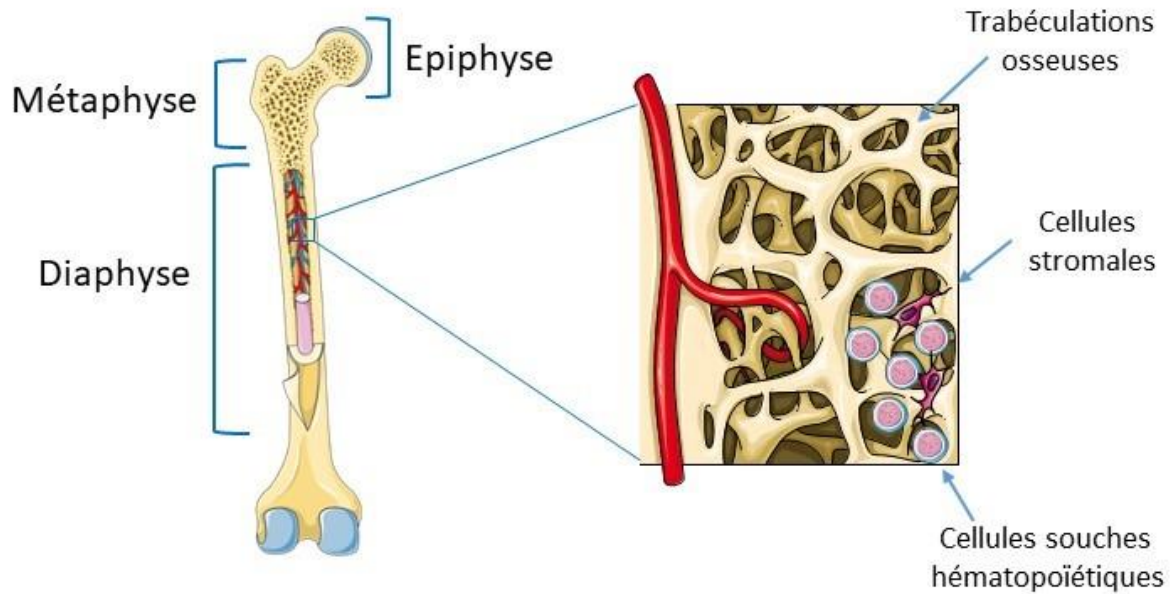


Figure 1

FIGURE 1 : Anatomie des os longs. Les os longs sont constitués de 3 parties : la diaphyse, les épiphyses et les métaphyses. Le tissu hématopoïétique est localisé dans la cavité médullaire, richement vascularisée, entre des travées osseuses. L'hématopoïèse se déroule au sein d'un microenvironnement complexe constitué d'ostéoblastes, de cellules stromales, de vaisseaux sanguins et de nerfs.

La moelle osseuse peut être considérée comme un organe à part entière constitué d'une association de cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques, de structures vasculaires et nerveuses et d'une matrice extracellulaire (1). La moelle osseuse est principalement retrouvée dans les os longs et les os plats. Les os sont recouverts d'une fine membrane très innervée et vascularisée recouvrant leur surface : le périoste (**Figure 2**). Cette fine membrane joue un rôle central dans l'innervation et la vascularisation des os et de la moelle osseuse (2, 3). Le périoste est impliqué dans le remodelage osseux et, en situation pathologique, la formation du cal osseux après fracture (4).

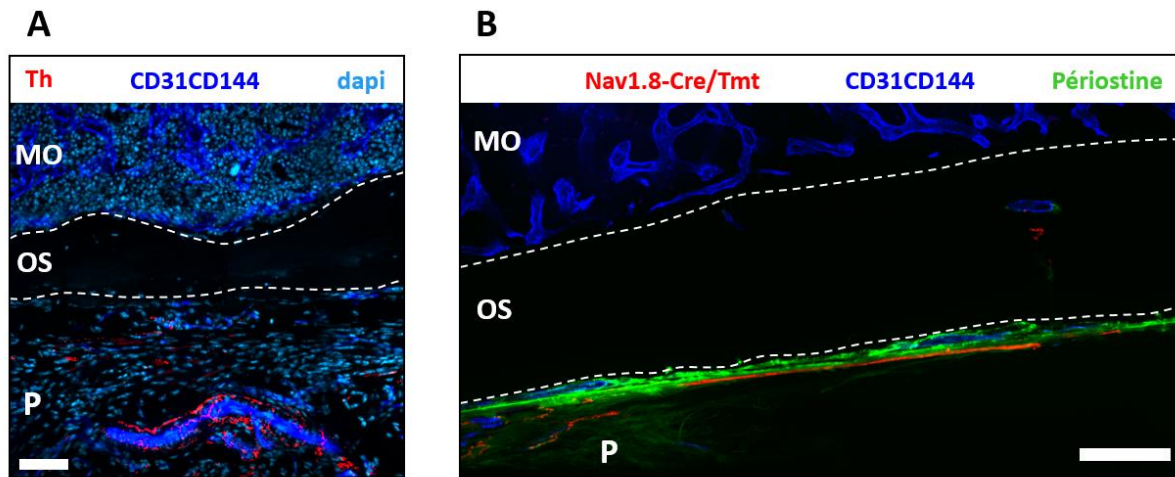


Figure 2

FIGURE 2 : Innervation du périoste. **A** : Image de microscopie confocale objectivant la présence de nerfs sympathiques marqués par un anticorps anti-tyrosine hydroxylase (TH). La vascularisation est marquée par des anticorps anti-CD31 et anti-CD144. **B** : Image de microscopie confocale retrouvant la présence de nerf nociceptifs (souris transgéniques Nav1.8-Cre/tomato). Le périoste est visualisé par un marquage anti-périostine et la vascularisation par un marquage anti-CD31 et anti-CD144. Barres d'échelle : A : 50µM / B : 100µm. MO moelle osseuse. P : périoste. (*Données personnelles non publiées à visée illustrative*)

Recevant 10 à 15% du débit cardiaque, les os sont des organes très vascularisés (5). Les vaisseaux sanguins permettent l'oxygénation de la moelle osseuse, la circulation des cellules hématopoïétiques, des nutriments, cytokines, facteurs de croissance et l'élimination des déchets et du dioxyde de carbone. Les cellules endothéliales ont également un rôle propre dans le contrôle de l'hématopoïèse de part les cytokines et facteurs de croissance qu'elles sécrètent (6-10).

La vascularisation de la moelle osseuse est assurée *via* une artère nourricière principale et par plusieurs centaines de capillaires trans-corticaux. Une récente étude a souligné l'importance de ces capillaires trans-corticaux dont le rôle avait été sous-estimé en évaluant qu'environ 80% du flux artériel et 59% du flux veineux irriguant la moelle osseuse passaient par ce réseau capillaire (**Figure 3A et 3B**) (11).

Au sein de la moelle osseuse, le réseau artériel est constitué de fines artérioles, peu ramifiées, disposées parallèlement à l'axe de la diaphyse et souvent à proximité de l'endoste (**Figure 3C**). Les cellules endothéliales artériolaires sont caractérisées par l'expression du

CD31, une forte expression du marqueur Sca1 et l'absence d'expression de l'endomucine (Emcn) : $CD31^{high}Sca1^{high}Emcn^{neg}$ (10, 12). Ces artérioles communiquent avec le réseau veineux à proximité de l'endoste au niveau des capillaires de type « H » également appelés « capillaires transitionnels » (12). Les cellules endothéliales des capillaires de type H sont caractérisées par l'expression conjointe de marqueurs artériolaires et sinusoidaux : $CD31^{high}Emcn^{high}$. Ces capillaires sont impliqués dans la régulation de l'ostéogénèse *via* la voie de signalisation Notch et leur abondance diminue de manière significative avec l'âge (12-14). La grande majorité des vaisseaux sanguins au niveau de la moelle osseuse sont des capillaires sinusoides, structures extrêmement ramifiées, fenestrées et composées de cellules endothéliales exprimant l'endomucine, la p-sélectine et le VE-cadhérine.

Le sang désoxygéné est évacué *via* le sinus central et une veine nutritive suivant le trajet de l'artère nourricière et traversant l'os au niveau du canal nutritif rejoignant alors la circulation générale. Comme précisé ci-dessus, de nombreux capillaires veineux transcorticaux contribuent également au flux veineux.

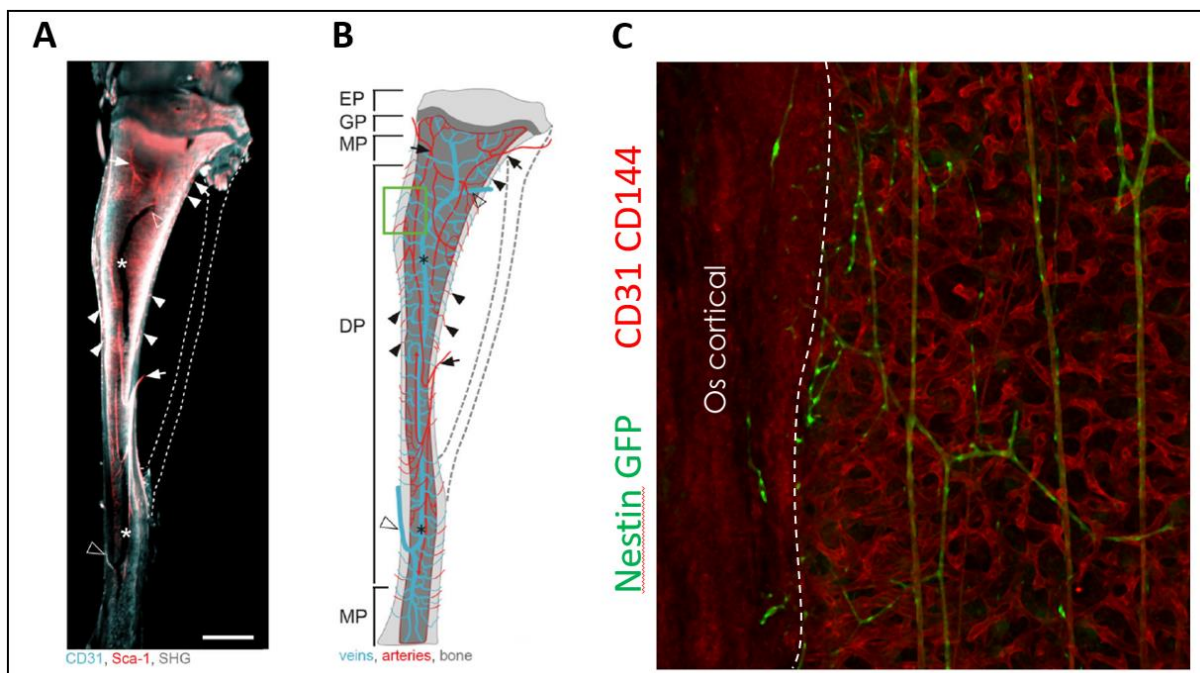


Figure 3

FIGURE 3 : Vascularisation de la moelle osseuse. **A** : Visualisation des vaisseaux sanguin artériolaires (rouge) et veineux (bleu) sur un tibia après clarification. Les capillaires transcorticaux sont indiqués par des flèches pleines et le sinus central par un astérisque. La barre d'échelle représente 1000µm. **B** : schéma représentant la vascularisation du tibia avec l'existence de multiples capillaires transcorticaux. **C** : reconstruction d'une acquisition en Z-

stack d'un fémur de souris Nestin-GFP clarifié. Le réseau dense de capillaires sinusoides tortueux et les fines artérioles dont la plupart courent parallèlement à l'axe de la diaphyse apparaissent en rouge, marqués par des anticorps anti-CD31 et anti-CD144. On notera la présence de cellules péri vasculaires Nestin^{high} le long des artérioles. MP : métaphyse, DP : diaphyse, GP : plaque de croissance, EP : épiphyse (d'après Grüneboom A, *et al.* (11)).

2. Développement osseux

L'ostéogénèse débute par la formation de regroupements (clusters) de cellules mésenchymateuses appelés condensations. L'ossification peut ensuite se dérouler selon deux processus distincts : l'ossification endochondrale et dans une bien moindre mesure, l'ossification intra-membraneuse.

a) L'ossification endochondrale :

La majorité des os se développent *via* un processus appelé « ossification endochondrale » qui comme son nom l'indique est caractérisé par l'ossification d'un tissu cartilagineux (15-18) (**Figure 4**). Il s'agit de l'ossification d'un « modèle » cartilagineux de l'intérieur vers l'extérieur. Durant l'embryogénèse, les cellules mésenchymateuses vont former des condensations et produire du collagène de type 1. Au sein des condensations, les cellules mésenchymateuses expriment le gène *Sox9* (19) et se différencient en chondrocytes, cellules présentes dans le cartilage produisant du collagène de type 2 et de l'aggrécane, un protéoglycane impliqué dans la protection des fibres de collagène vis-à-vis de contraintes mécaniques et la transmission de certaines cytokines majeures comme FGF (17, 20, 21). Contrairement aux cellules situées au centre des condensations, les cellules stromales localisées en périphérie ne se différencient pas en chondrocytes, continuant à produire du collagène de type 1 et sont à l'origine du périchondrium, tissu précurseur du futur périoste. La croissance de ce cartilage primitif est donc assurée par la prolifération des chondrocytes et la production d'une matrice extracellulaire riche en collagène de type II. Les chondrocytes situés au centres du cartilage vont progressivement cesser de se multiplier et augmenter de taille pour former des chondrocytes hypertrophiques. Cette modification phénotypique est

l'un des mécanismes majeurs de la croissance osseuse et se déroule parallèlement à une modification de leur programme génétique. Les chondrocytes hypertrophiques jouent un rôle fondamental dans le processus d'ossification en produisant du collagène de type X, favorisant la minéralisation de la matrice extracellulaire, et en sécrétant des facteurs pro-angiogéniques (VEGF) induisant la vascularisation du cartilage (22). Parallèlement à l'apparition des chondrocytes hypertrophiques, les cellules du péri-chondrium commencent à exprimer le gène *Runx2*, gène central dans la régulation de la différenciation ostéoblastique et forment le « col osseux », structure précurseur de l'os cortical, avec la production d'une matrice spécifique (23). Les chondrocytes situés au centre sont ensuite remplacés par des ostéoblastes qui vont coloniser la zone centrale en suivant les vaisseaux sanguins (24, 25). Certaines études ont également démontrées que les chondrocytes hypertrophiques pouvaient directement se différencier en ostéoblastes (26-28). La poursuite de la croissance osseuse est assurée par les chondrocytes localisés en périphérie avec la formation progressive de plaques de croissances au niveau de ce qui deviendra les régions métaphysaires (18). La vascularisation va permettre une colonisation progressive par les cellules hématopoïétiques et la mise en place d'une hématopoïèse fonctionnelle (18).

b) L'ossification intra membraneuse :

Ce processus concerne un nombre limité d'os parmi lesquels les os de la voûte crânienne et les clavicules. L'ostéogénèse intra membraneuse fait suite au regroupement et à la différenciation directe de cellules mésenchymateuses en ostéoblastes sans formation d'un cartilage intermédiaire comme ce qui est observé dans l'ossification endochondrale (29, 30). Les ostéoblastes assurent la production d'une matrice extracellulaire riche en collagène de type 1 et en cristaux d'hydroxyapatite. La croissance osseuse est permise par l'apposition de couches successives. L'os spongieux est formé au centre des formations osseuses par la colonisation des vaisseaux sanguins et cellules hématopoïétiques.

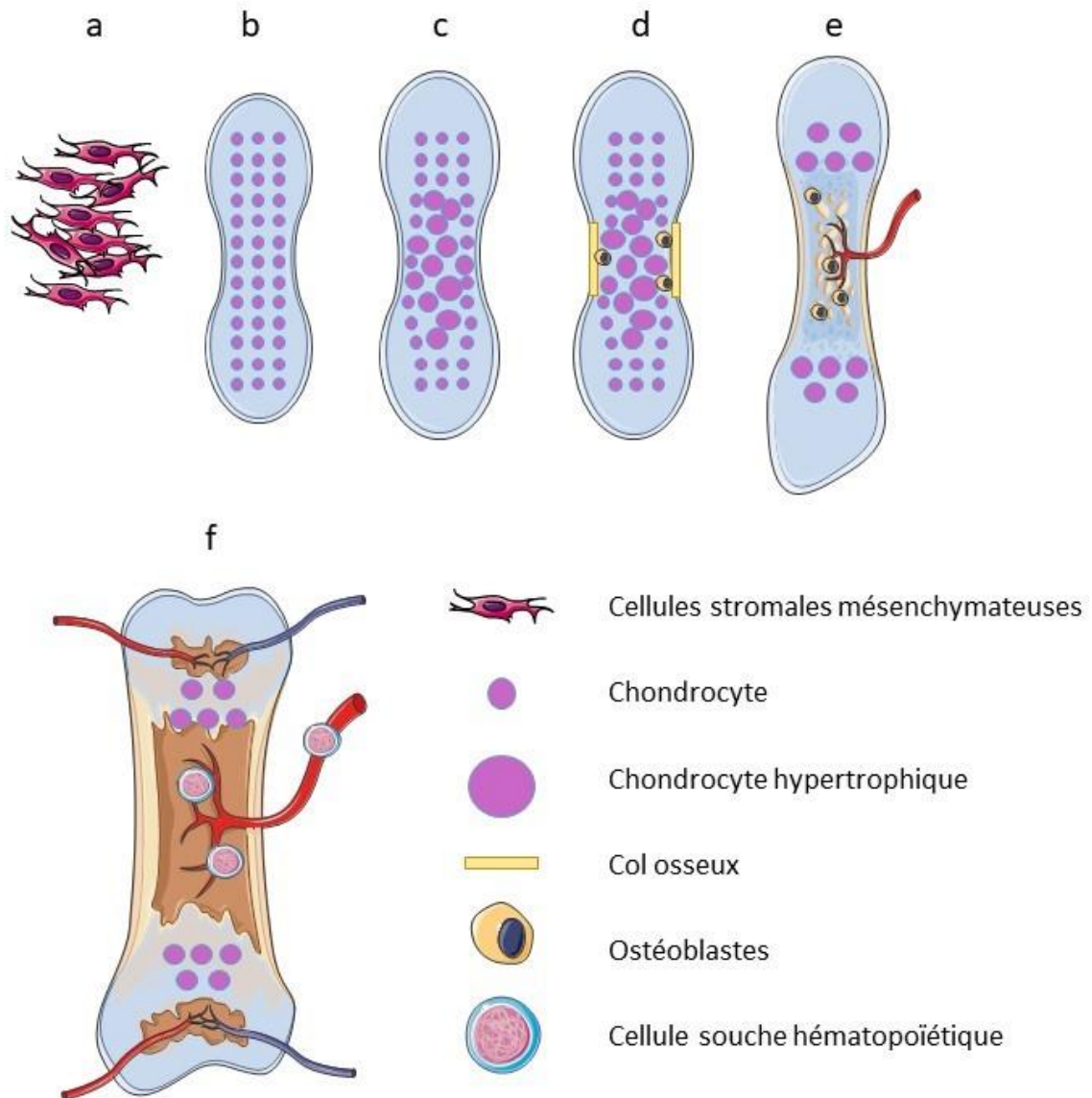


Figure 4

FIGURE 4 : L'ossification endochondrale. Les cellules mésenchymateuses forment des «clusters» (a) puis se différencient en chondrocytes (b). Les chondrocytes centraux deviennent hypertrophiques (c) et les cellules du périchondrium se différencient en ostéoblastes formant le col osseux (d). La production de facteurs pro-angiogéniques par les chondrocytes hypertrophiques favorisent une néovascularisation (e) et la migration de cellules hématopoïétiques (f).

B. Le périoste : généralités

1. Anatomie

Le périoste est une fine membrane vascularisée recouvrant la surface externe des os à l'exception des articulations. Site d'insertion des tendons, ligaments et muscles, le périoste joue un rôle majeur dans le remodelage osseux et la cicatrisation après fracture. La mise en évidence de ses propriétés régénératives importantes a suscité un intérêt croissant pour ce tissu, actuellement l'objet de nombreux travaux de recherche.

Le périoste a été décrit pour la première fois en 1742 par le scientifique Henri-Louis Duhamel du Monceau qui, en insérant un fil d'argent au sein du périoste, observa quelques semaines plus tard l'apparition d'un tissu osseux recouvrant l'implant. Le chirurgien Louis Léopold Ollier (1830-1900) décrivit les capacités d'ossification intrinsèques de ce tissu en pratiquant des greffes de périoste. Les travaux scientifiques ont depuis montré l'existence de cellules souches stromales impliquées dans le développement des os lors de leur croissance, remodelage et la cicatrisation après fracture.

Le périoste est constitué sur le plan anatomique de deux couches distinctes (**Figure 5**). La couche externe fibreuse contient des fibroblastes et des fibres élastiques répartis au sein d'une matrice de collagène (31). La couche interne, également appelée cambium est extrêmement vascularisée et innervée. Cette couche contient des cellules stromales douées de propriétés régénératives impliquées dans la croissance et le remodelage osseux (4, 32, 33).

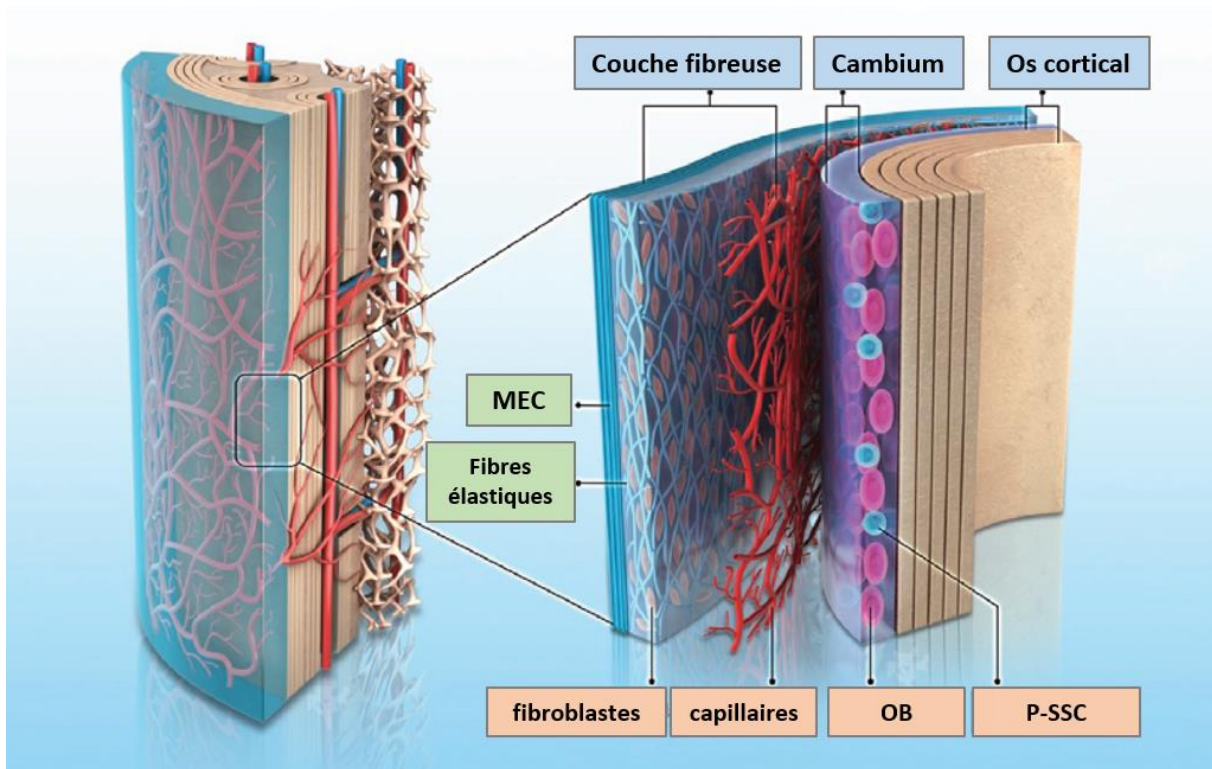


Figure 5

FIGURE 5 : Anatomie du périoste. Le périoste constitue une fine membrane enveloppant les os. La couche fibreuse comprend une matrice extracellulaire (MEC) et des fibres élastiques. Le cambium ou couche interne est très richement vascularisé et innervé et contient des ostéoblastes (OB) et des cellules stromales (P-SSC). D'après Lou Y, et al. (34)

2. Le périoste en médecine régénérative

La possibilité d'utiliser le périoste pour reconstituer du tissu osseux a été suggérée en 1991 par l'équipe du Dr Caplan qui démontra les propriétés ostéo-chondrogéniques du périoste *in-vivo* en greffant des fragments de périoste prélevés sur des cadavres humains à des souris (35). Suite à ces premiers travaux, de nombreuses études ont démontré la capacité des cellules du périoste à reconstituer du tissu osseux *in-vivo* dans des modèles animaux (36-39). Le périoste est également couramment utilisé en chirurgie orthopédique notamment pour faciliter la consolidation de fractures avec importantes pertes de substance osseuse. De nombreuses études sont en cours pour optimiser l'utilisation en clinique des cellules stromales du périoste (34).

C. La niche hématopoïétique

Siège de l'hématopoïèse, la moelle osseuse est un tissu complexe où les cellules hématopoïétiques sont en contact étroit avec des structures vasculaires, nerveuses et des cellules stromales de soutien. Alors que la plupart des os ont une activité hématopoïétique chez la souris, l'hématopoïèse a lieu principalement au niveau du squelette axial chez l'Homme adulte (bassin, vertèbres). Ainsi la moelle osseuse au niveau des os longs est progressivement remplacée par un tissu adipeux (ou moelle jaune) à l'exception des régions proximales. Les cellules souches hématopoïétiques résident au sein d'un microenvironnement très spécialisé couramment appelé « niche » (1). Au sein de la niche, les propriétés d'autorenouveaulement, de prolifération et de différenciation des cellules souches hématopoïétiques sont finement régulées par les interactions qu'elles entretiennent avec les différents constituants cellulaires et moléculaires du microenvironnement (**Figure 6**). Depuis l'exposition du concept de niche par Ray Schofield en 1978, les progrès réalisés dans les techniques d'imageries, de cytométrie et le développement des modèles murins exprimant des rapporteurs au sein de populations cellulaires prédéfinies ont permis de mieux comprendre le rôle des différents acteurs et de préciser la localisation des cellules souches hématopoïétiques (40). Les études ont permis d'identifier de nombreuses populations cellulaires, parfois redondantes, impliquées dans la régulation de l'hématopoïèse homéostatique et pathologique. De manière similaire au système hématopoïétique, les cellules de la niche sont extrêmement hétérogènes (41-45).

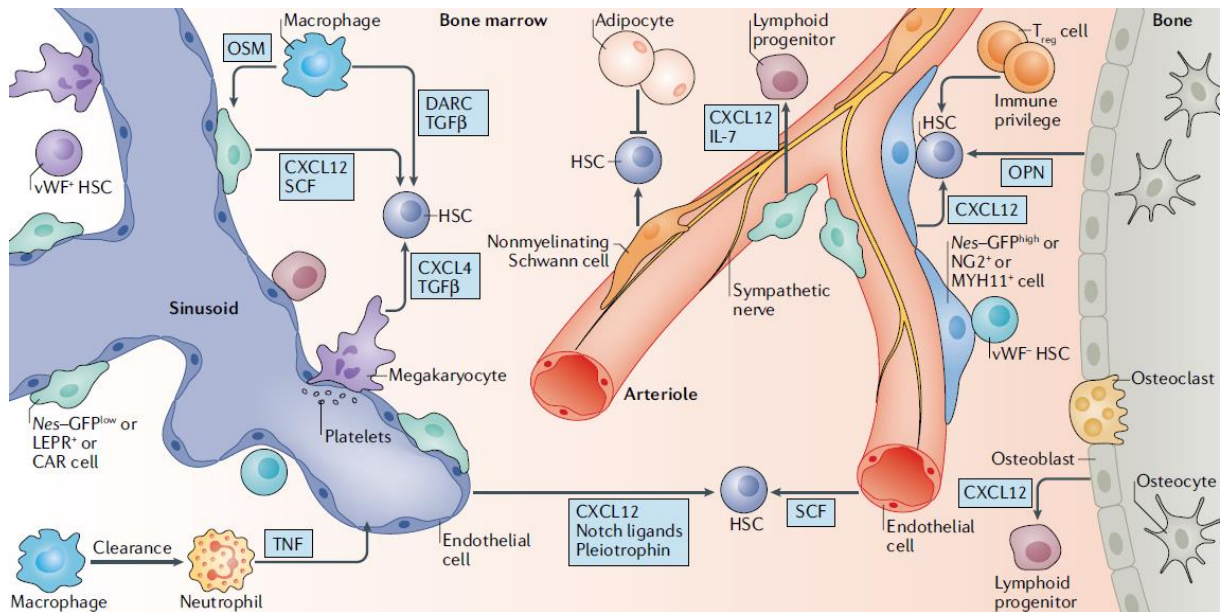


Figure 6

FIGURE 6 : La niche hématopoïétique. Représentation schématique de la niche hématopoïétique en situation physiologique soulignant les nombreuses interactions entre les différents constituants. DARC: *duffy antigen receptor for chemokines*; IL-7: interleukine-7; OPN: ostéopontine; OSM: oncostatine M; SCF: *stem cell factor*; TGFβ : *transforming growth factor- β*; TNF: *tumour necrosis factor*. D'après Pinho S et Frenette PS. (1)

1. La niche endostéale

Les premiers travaux ont initialement suggéré un rôle majeur de l'endoste dans l'hématopoïèse en montrant une proximité entre les cellules souches hématopoïétiques et les cellules osseuses en situation homéostatiques et après transplantation (46-49). Il a également été démontré que les ostéoblastes avaient la capacité de soutenir la croissance des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques (HSPCs) *in-vitro* (50). Par ailleurs, en utilisant les marqueurs SLAM comme approche pour identifier les cellules souches hématopoïétiques, une corrélation entre le nombre d'ostéoblastes et celui de HSPCs définis par le phénotype $Lin^{neg}Sca1^{pos}kit^{pos}$ a été observée (51-53). Néanmoins, les ostéoblastes produisent en très faible quantité les cytokines stem cell factor (Scf) et Cxcl12 dont le rôle est central dans l'hématopoïèse. De plus, la délétion génétique dans les ostéoblastes de ces deux cytokines majeures n'a aucun effet sur les cellules souches hématopoïétiques (7, 54, 55). Par ailleurs, l'étude fine du microenvironnement permise par l'apport des nouvelles techniques d'imagerie

en 3 dimensions a révélé que les cellules souches hématopoïétiques étaient localisées à proximité des structures vasculaires et non au niveau de la surface endostéale (56, 57).

Il semble donc que le tissu osseux ait un rôle mineur dans l'hématopoïèse physiologique. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) expriment néanmoins des récepteurs au calcium présent en concentration importante au niveau de la niche endostéale. Cette sensibilité des CSH au calcium a été impliquée dans le nichage des CSH au niveau de l'endosteum lors de leur migration du foie foetal vers la moelle osseuse durant l'embryogénèse et après greffe (58, 59). De manière intéressante, il a également été récemment démontré que l'expansion des CSH dans les suites d'une chimiothérapie myéloablative se déroulait préférentiellement au niveau de zone en cours de remodelage osseux (60). Cette étude suggère ainsi l'existence de niches distinctes entre les CSH quiescentes et les CSH activées. Les cellules de la lignée osseuse ont également été impliquées dans la différenciation lymphoïde précoce et dans le développement de certaines hémopathies comme les leucémies aiguës (55, 61-64).

2. Niches vasculaires : localisation des cellules souches hématopoïétiques et rôle des cellules endothéliales dans l'hématopoïèse

Comme nous l'avons vu, la moelle osseuse est un organe très richement vascularisé avec de fines artérioles communiquant avec un réseau dense de capillaires sinusoides. Bien que l'importance des cellules endothéliales dans la régulation des cellules souches hématopoïétiques soit unanimement reconnu, la localisation exacte de ces dernières par rapport aux structures vasculaires reste source de débats. En utilisant un modèle murin transgénique dans lequel les CSH sont visualisées grâce à un *knock-in* du rapporteur GFP sous la dépendance du gène *Cttnl1* (α -catuline), l'équipe de Sean J. Morrison a décrit une association entre les CSH et les capillaires sinusoides (65). Ainsi, 85% des CSH α -catuline-GFP^{pos} c-kit^{pos} étaient localisées à moins de 10 μ m d'un capillaire sinusoides et à proximité d'une cellule stromale péri-vasculaire Leptin-R^{pos}. Moins de 10% des CSH étaient situées à moins 20 μ m d'une artériole. La proximité des CSH avec les capillaires sinusoides a été retrouvée dans plusieurs études basées sur différentes stratégies d'identification des CSH (53, 57, 60, 66, 67).

Ces résultats apparaissent en contradiction avec les travaux de l'équipe de Paul Frenette retrouvant une association significative entre les CSH quiescentes et les artérioles notamment localisées à proximité de l'endoste (56, 68, 69). Le vieillissement de la niche hématopoïétique est ainsi caractérisé par une raréfaction des structures artériolaires avec une expansion concomitante des capillaires sinusoides (13). Cette modification profonde du réseau vasculaire est également associée à un éloignement des CSH par rapport aux artérioles favorisant leur activation et expansion (69).

Les CSH représentent une population de cellules hétérogènes. Une sous-population de CSH quiescentes exprimant le facteur von Willebrand (vWF^{pos}) a récemment été identifiée (70). Ces CSH vWF^{pos}, situées au sommet de la hiérarchie, sont caractérisées par un biais de différenciation vers la lignée myéloïde et plus particulièrement mégacaryocytaire à l'inverse des CSH vWF^{neg} orientées vers la différenciation lymphoïde. Durant ma thèse, nous avons étudié les niches respectives des CSH vWF^{neg} et vWF^{pos}. (Article n°2) (70). Alors que les CSH vWF^{pos} (orientées vers la lignée myéloïde) étaient significativement associées aux mégacaryocytes, nous avons retrouvé une association significative entre les CSH vWF^{neg} (orientées vers la lignée lymphoïde) et les artérioles suggérant l'existence de 2 niches distinctes.

Plus récemment, l'équipe de Tsvee Lapidot a suggéré que les cellules souches hématopoïétiques les plus quiescentes étaient localisées à proximité des artérioles, vaisseaux sanguins peu perméables et associés à un faible niveau d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (9). A l'inverse, la « porosité » des capillaires sinusoides favoriserait une augmentation des ROS au sein des CSH entraînant leur activation, différenciation et mobilisation.

Dès 1961, il a été observé que la récupération hématopoïétique après irradiation létale de rats était conditionnée par la régénération d'une vascularisation fonctionnelle (71). Le rôle des cellules endothéliales dans la maintenance des CSH a été suggéré par des modèles de co-cultures *in-vitro* avec (72) ou sans supplémentation en facteur de croissances/cytokines (73). Le rôle de soutien *in-vitro* des cellules endothéliales et leur contribution dans la reconstitution hématopoïétique chez des souris immunodéprimées ont également été démontrés en utilisant des cellules endothéliales humaines (74). *In-vivo*, la délétion de *Scf* dans les cellules endothéliales par l'utilisation du modèle *Tie2-Cre* induit une réduction significative du nombre de CSH alors que les cellularités sanguines et médullaires ne sont pas affectées (7). En utilisant

le modèle *Tie2-cre ; Cxcl12^{fl/fl}*, la même équipe rapporta une diminution de la fréquence des CSH et une altération des capacités de prise de greffe suite à la délétion de *Cxcl12* dans les cellules endothéliales (55). Ces données ont par la suite été confirmées par Greenbaum, *et al* même si la contribution des cellules endothéliales dans la production de *Cxcl12* apparaît secondaire par rapport à celle des cellules stromales périvasculaires (54). L'hétérogénéité des cellules endothéliales rend difficile l'étude de la contribution respective des différentes populations cellulaires dans l'hématopoïèse. En utilisant la combinaison des marqueurs podoplanine et Sca-1, C. Xu *et al*, ont démontré que parmi les cellules endothéliales, les cellules artériolaires étaient la source exclusive de *Scf* et la principale source de *Cxcl12* (10). Alors que la suppression de l'expression de *Scf* par les cellules endothéliales artériolaires était associée à une diminution significative du nombre de CSH et des capacités de reconstitution hématopoïétique, aucun effet n'était retrouvé suite à la délétion de *Scf* dans les cellules endothéliales sinusoidales.

Ces différentes données soulignent la complexité des structures vasculaires. Même si la proximité des CSH vis-à-vis des capillaires sinusoides et artérioles reste source de débats, l'importance des cellules endothéliales et du réseau vasculaire dans la régulation de l'hématopoïèse est indiscutable.

3. Innervation du tissu osseux et de la moelle osseuse

Le tissu osseux et la moelle osseuse sont extrêmement innervés par des fibres du système nerveux autonome et sensitif. La première observation histologique de la présence de nerfs au sein de la moelle osseuse longeant l'artère nourricière a été rapportée par Calvo en 1968 (75). Le système nerveux autonome comprend 2 composantes aux fonctions antagonistes : le système nerveux sympathique (parfois appelé « orthosympathique ») et le système nerveux parasympathique (76).

Le système nerveux sympathique a un effet « stimulateur » favorisant, notamment en situation de stress, l'accélération du rythme cardiaque et la contractilité musculaire. Les neurones sympathiques produisent de la norépinephrine qui se fixe sur des récepteurs α ou β adrénergiques.

Le système nerveux parasympathique a un effet « inhibiteur » entraînant une diminution de la fréquence cardiaque, une vasodilatation et une myorelaxation. L'effet parasympathique est médié par l'acétylcholine qui se fixe sur des récepteurs cholinergiques.

Alors que les fibres parasympathiques innervent uniquement le tissu osseux, les fibres sensitives et sympathiques innervent à la fois l'os et la moelle osseuse (77-81).

a) *Innervation du tissu osseux*

Les fibres nerveuses sympathiques, aisément visualisées par l'utilisation d'un anticorps anti-tyrosine hydroxylase sont présentes en abondance au niveau du périoste et le long de la surface osseuse où elles suivent le trajet des artères vascularisant l'os (82). Les ostéoblastes expriment les récepteurs β 2-adrénergiques, de même, dans une moindre mesure, que les ostéocytes, ostéoclastes et chondrocytes suggérant une sensibilité aux signaux sympathiques de l'ensemble des cellules de la lignée chondro-ostéoblastique (83-86).

Les souris déficientes en récepteurs β 2 adrénergiques présentent une augmentation de la masse osseuse. Ce phénotype est expliqué par l'action du système nerveux sympathique sur les ostéoblastes (**Figure 7**). En effet le système nerveux sympathique stimule la résorption osseuse en augmentant l'expression par les ostéoblastes de la molécule Rankl, favorisant la différenciation des ostéoclastes (86). La délétion spécifique des récepteurs β 2 adrénergiques dans les ostéoblastes en utilisant un modèle murin $\alpha 1Col1-Cre ; Adrb2^{fl/fl}$ a pour conséquence une augmentation de la masse osseuse confirmant le rôle central des ostéoblastes dans la réponse à la stimulation adrénérge (87). Il est important de souligner que les influx sympathiques sont inhibés par la sérotonine produite au niveau du système nerveux central, elle-même négativement régulée par la leptine, hormone produite par le tissu adipeux (85, 88, 89).

Le système nerveux parasympathique inhibe la résorption osseuse *via* l'activation de récepteurs nicotiniens à la surface des ostéoclastes, induisant leur entrée en apoptose (77). Le système nerveux parasympathique a également un effet inhibiteur sur le tonus sympathique contribuant à favoriser l'augmentation de la masse osseuse (77, 90).

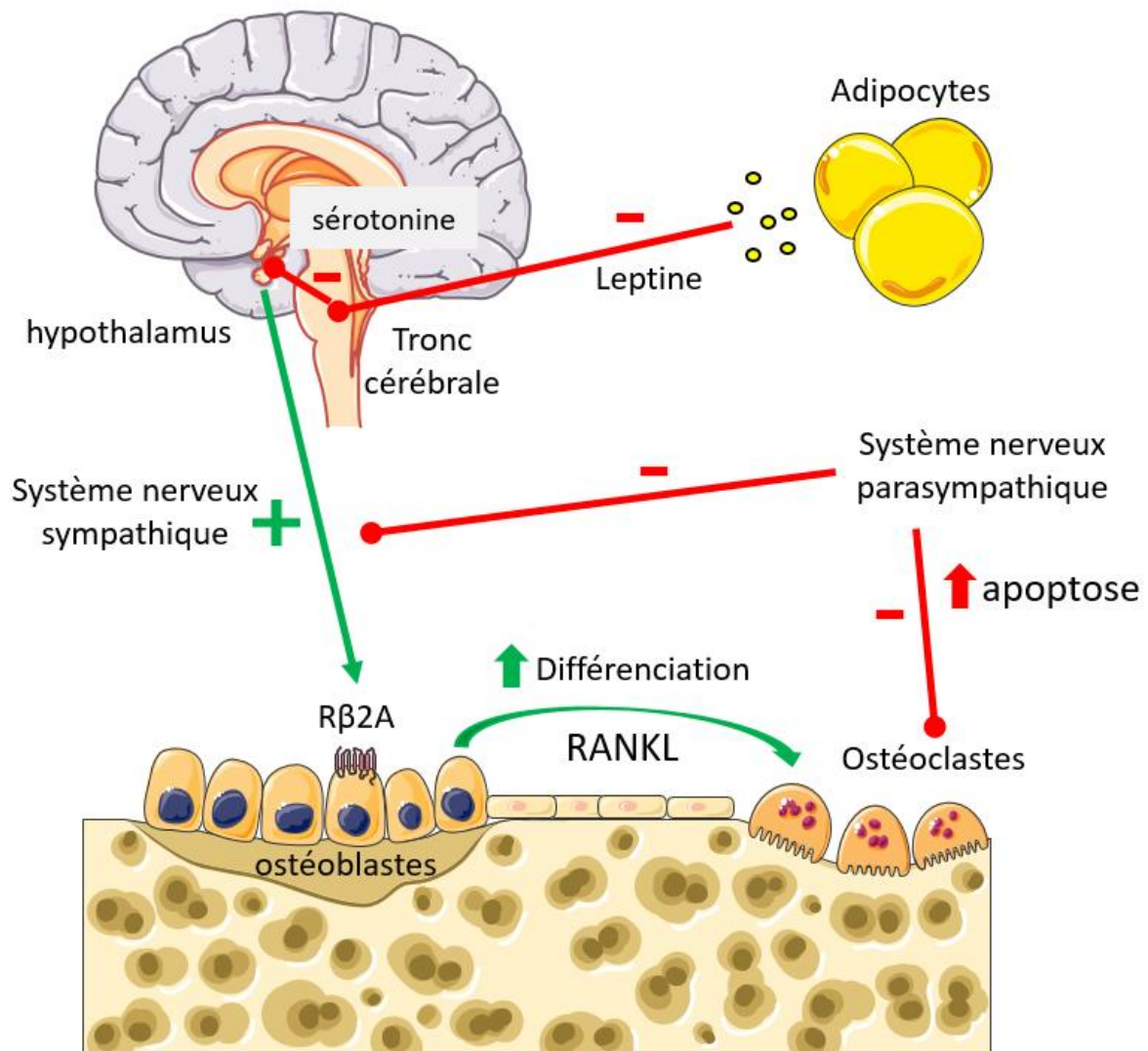


Figure 7

FIGURE 7 : Rôle du système nerveux sur le tissu osseux. Le système nerveux sympathique stimule la résorption osseuse en induisant l'expression de RANKL par les ostéoblastes favorisant la différenciation des ostéoclastes. La leptine produite par les adipocytes inhibe la synthèse de sérotonine dont l'action est inhibitrice sur le système nerveux sympathique. Le système nerveux parasympathique a un effet opposé en inhibant le système nerveux sympathique et en favorisant l'apoptose des ostéoclastes. Rβ2A: récepteur β2-adrénergique. RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

Le tissu osseux est également innervé par des fibres sensibles dont le signal est transmis *via* 2 neurotransmetteurs : la substance-P et la *calcitonin gene-related peptide* (CGRP). Le système nerveux sensitif favorise l'ostéogénèse en inhibant l'activité ostéoclastique et en favorisant (*in-vitro*) la prolifération et différenciation en ostéoblastes de BM-MSc (91-94).

b) Innervation de la moelle osseuse

Les fibres nerveuses sympathiques cheminent le long des artérioles au sein de la moelle osseuse à proximité immédiate des cellules péri-vasculaires issues de la crête neurale exprimant le marqueur Nestin et formant un réseau appelé complexe neuro-réticulaire (56, 95, 96). Le système nerveux sympathique joue un rôle central dans le contrôle de la mobilisation des CSH et leur relargage dans la circulation selon un rythme circadien ainsi que dans la mobilisation induite par le G-CSF (**Figure 8**) (97). Le facteur de croissance *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) favorise la mobilisation des CSH en dehors de la niche en diminuant la concentration médullaire en *Cxcl12* impliqué dans la rétention des CSH. L'oscillation circadienne des CSH et leucocytes en situation physiologique a été démontrée chez la souris et l'Homme avec des cycles inversés (98, 99). Ainsi, le relargage des CSH est maximum peu de temps après le lever du soleil chez la souris et au crépuscule chez l'Homme (98). Les signaux sympathiques sont transmis *via* les récepteurs β adrénergiques aux cellules stromales médullaires (BM-MSK) et cellules endothéliales induisant une diminution d'expression du *Cxcl12* et des molécules d'adhésion (100, 101). La mobilisation circadienne des CSH est dépendante d'une signalisation *via* les récepteurs β_3 adrénergiques principalement exprimés par les BM-MSK Nestin^{pos} (95). En revanche, la mobilisation des CSH induite par le G-CSF est dépendante à la fois de la signalisation β_2 et β_3 adrénergiques (102). En plus d'un effet sur le gradient de *Cxcl12*, le système nerveux sympathique favorise la mobilisation des CSH en affectant négativement l'activité des BM-MSK, macrophages et cellules de la lignée ostéoblastique (97, 103-105). De façon plus globale, le système nerveux sympathique est un composant critique de la niche hématopoïétique. Ainsi, la dénervation sympathique induit un vieillissement accéléré de la niche avec une expansion des BM-MSK, une entrée en cycle des CSH et une altération de leur capacité régénérative ainsi qu'une modification profonde de l'architecture vasculaire (69).

Le système nerveux parasympathique intervient également dans la régulation des oscillations circadiennes et la mobilisation des CSH induite par les G-CSF (106, 107). Chez la souris, en situation physiologique, les signaux cholinergiques centraux inhibent le tonus sympathique (β_3 adrénergique) favorisant le *homing* des CSH dans la moelle. La libération d'agonistes β_2 adrénergiques par voie endocrine contribue au *homing* des CSH *via* une

surexpression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales (107). L'activation du système nerveux sympathique et l'inhibition conjointe du système nerveux parasympathique par la lumière favorise la libération des CSH. Une étude a également démontré l'importance des glucocorticoïdes, libérés par l'axe hypothalamo-hypophysé-surrénalien en réponse à la fixation de l'acétylcholine sur les récepteurs muscariniques de type 1 au niveau central dans la mobilisation induite par le G-CSF (108).

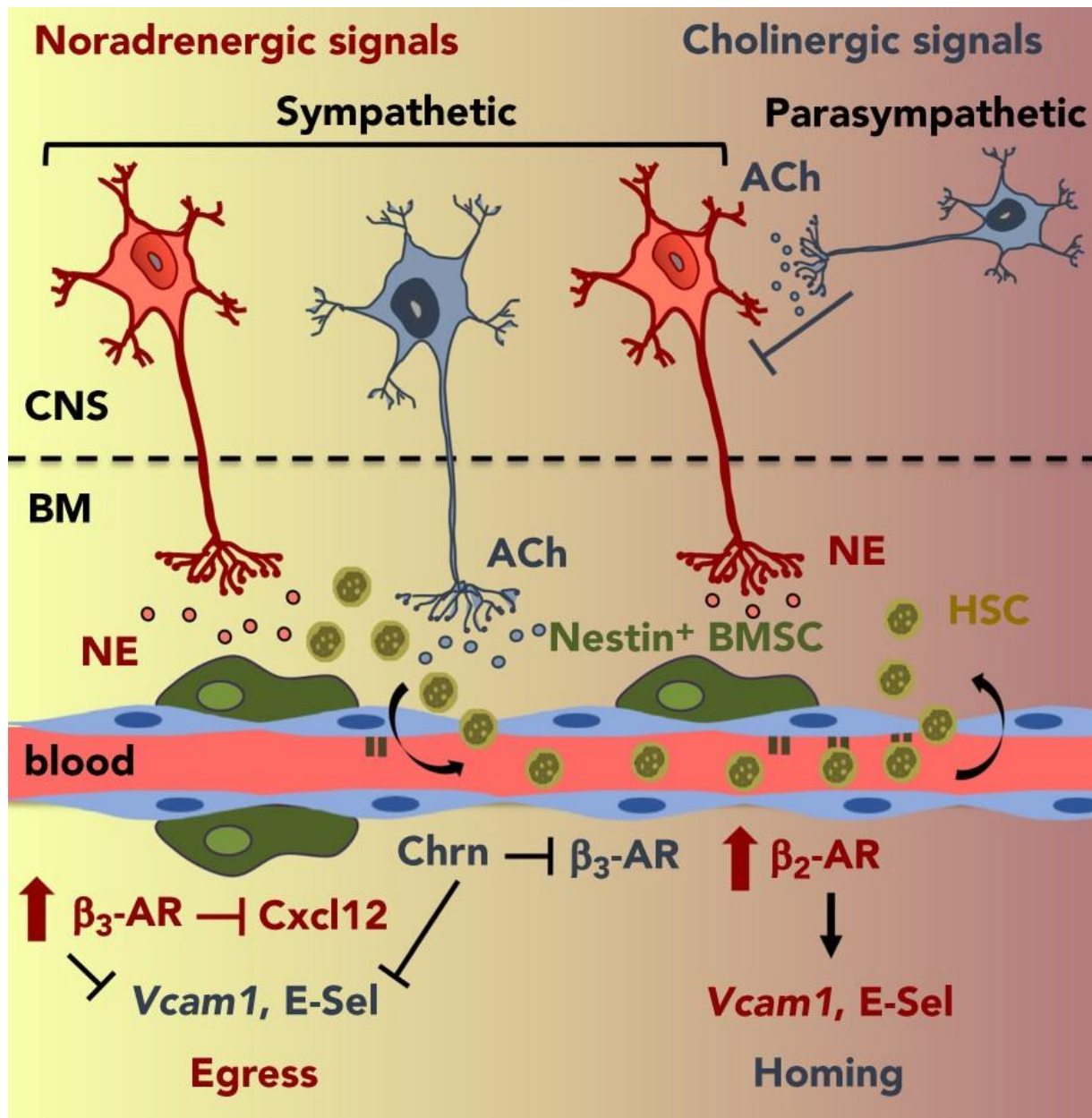


Figure 8

FIGURE 8 : Régulation des oscillations circadiennes de CSH chez la souris. En journée, le tonus sympathique agit via des récepteur adrénérgiques β_3 exprimés par les BM-MSK et induit une diminution d'expression de cxcl12 et des molécules d'adhésion Vcam1 et sélectine-E

favorisant la libération des CSH. La nuit, l'inhibition du système sympathique par le système parasympathique favorise le *homing* des CSH. Ach: acetylcholine; BMSC: BM mesenchymal stem/progenitor cell; Chrn: cholinergic nicotinic; CNS: central nervous system; E-sel: E-selectin; HSC: hematopoietic stem cell; NE: norepinephrine. D'après O'Leary HA. (109)

Le rôle du système nerveux sensitif dans la mobilisation des CSH a plus récemment été mis en évidence (80). Cette élégante étude a démontré une action synergique des systèmes nerveux sympathiques et sensitifs dans l'induction de la mobilisation. Contrairement au système nerveux sympathique dont l'action est médiée indirectement par les BM-MSK, les fibres nociceptives, impliquées dans la transmission de la douleur, induisent la mobilisation par une action directe sur les CSH *via* la libération de CGRP. De manière intéressante en terme d'application clinique, l'administration de CGRP potentialise la mobilisation induite par le G-CSF et le plerixafor, inhibiteur de CXCR4.

c) Implication du système nerveux sympathique dans la régénération médullaire

Le système nerveux sympathique est également impliqué dans la régénération médullaire faisant suite à l'administration de chimiothérapies (110, 111). L'administration d'une chimiothérapie neurotoxique comme le cis-platine induit une neuropathie au sein de la moelle osseuse altérant la régénération médullaire après transplantation de CSH. Une neuroprotection par la délétion de Trp53 au sein des neurones sympathiques ou l'administration de facteurs de croissances neuronaux comme le 4-methylcatechol ou le *glial-derived neurotrophic factor* permettent de favoriser la régénération hématopoïétique (111).

4. Adipocytes et hématopoïèse

La cavité médullaire comprend la moelle hématopoïétique, appelée communément « moelle rouge » et des adipocytes, « la moelle jaune ». Les adipocytes ont longtemps été considérés comme des régulateurs négatifs de l'hématopoïèse mais leur fonction est

actuellement revisitée suite à l'amélioration de nos connaissances sur l'hétérogénéité des cellules adipeuses. Les adipocytes sont peu nombreux chez les souris jeunes mais leur fréquence augmente significativement au cours du vieillissement et après irradiation. L'identité de la cellule précurseur des adipocytes en situation physiologique au sein de la moelle osseuse reste incertaine (112-114). Dans le contexte de la régénération médullaire après irradiation, l'équipe de Sean Morrison a identifié un précurseur exprimant l'adiponectine et représentant 5% des cellules stromales positives pour le récepteur à la leptine (LepR^{pos}) (115).

La fonction inhibitrice des adipocytes sur l'hématopoïèse a initialement été suggérée par la mise en évidence d'une corrélation inverse, lors de l'analyse d'os isolés de différentes parties du corps de la souris, entre la quantité d'adipocytes dans la moelle et la fréquence en CSH et progéniteurs hématopoïétiques (116). L'inhibition de l'adipogénèse est également associée à une amélioration de la régénération médullaire après chimiothérapie (117). De plus, la prise de greffe est améliorée chez les souris transgéniques lipoatrophiques A-ZIP/F1 caractérisées par un déficit en tissu adipeux (116). Il a également été démontré que l'accumulation de tissu adipeux associée au vieillissement et à l'obésité affectait négativement l'hématopoïèse (118).

Ces résultats contrastent avec le fait que le nombre d'adipocytes augmentent significativement après irradiation, en phase de régénération hématopoïétique, pouvant suggérer un rôle dans le soutien de l'hématopoïèse (119). De plus, les adipocytes sécrètent, des facteurs de soutien de l'hématopoïèse, notamment *Scf* et *Cxcl12* (120). Par ailleurs, la co-injection de progéniteurs adipocytaires, Adipose-derived Stromal Cells (ASC) avec des CSH à des souris immunodéficientes favorise la reconstitution hématopoïétique (121).

Cette discordance entre les études est probablement expliquée par la grande hétérogénéité, initialement négligée, des populations cellulaires adipocytaires. Notre compréhension du compartiment adipocytaire a été nettement améliorée grâce aux études reposant sur le *single-Cell RNA-sequencing* (sc-RNAseq) récemment publiées (41, 43, 45). Les progéniteurs adipocytaires exprimant le récepteur à la leptine sans co-expression de l'ostéolectine représentent une source majeure de cytokines de soutien à l'hématopoïèse (122). Baccin, et al., par une approche de sc-RNAseq ont identifié une population de cellules stromales présentant une signature moléculaire de type « adipocyte », appelé « adipoCAR »

importante pour le soutien de l'hématopoïèse (41). Une autre population de progéniteurs adipocytaires ne contenant pas de gouttelettes de lipides et impliquée dans le maintien de la niche vasculaire a été identifiée par une approche similaire (123).

En conclusion, le rôle précis des adipocytes est dépendant du contexte (physiologie ou régénération) et des sous populations cellulaires considérées (124).

5. Régulation de l'hématopoïèse par les cellules hématopoïétiques

a) *Les mégacaryocytes*

Les mégacaryocytes sont de volumineuses cellules multi-nucléées dont la fonction principale est la production des plaquettes, élément central de l'hémostase primaire. Les études récentes suggèrent une proximité sur le plan ontogénique entre les CSH et les mégacaryocytes, remettant en cause le modèle précédemment admis (125). Ainsi les mégacaryocytes pourraient être directement issues de la différenciation des CSH et non d'un progéniteur myéloïde (126-128). L'existence de cette proximité a été renforcée par l'identification de CSH exprimant le facteur Von Willebrand (CSH-vWF^{pos}) (129). Les CSH-vWF^{pos}, présentant un biais de différenciation myéloïde, apparaissent situées en haut de la hiérarchie, capables d'autorenouveau et de donner des CSH-vWF^{neg}, caractérisées par un biais de différenciation lymphoïde. Durant mon travail de thèse, nous avons montré que ces CSH occupaient des niches distinctes au sein de la moelle osseuse, les CSH-vWF^{pos} étant localisées à proximité des mégacaryocytes contrairement aux CSH-vWF^{neg} se trouvant à proximité des artérioles (70).

A côté de la production de plaquettes, les mégacaryocytes sont impliqués dans le maintien des CSH dans un état de quiescence. En effet, la déplétion des mégacaryocytes, par l'utilisation de souris Cxcl4-cre;iDTR, entraîne une expansion des cellules souches hématopoïétiques secondaire à une entrée en cycle objectivée par une augmentation de l'incorporation du BrdU et de l'expression de gènes du cycle cellulaire comme *Cdkn2* (130). Le maintien des CSH dans un état quiescent par les mégacaryocytes est assuré *via* la sécrétion de

cytokines comme le Cxcl4 et le TGF β (130-132). Les mégacaryocytes sont également impliqués dans le contrôle de l'expansion des CSH en situation de stress en permettant un retour des CSH dans un état de quiescence après la phase de régénération par la sécrétion de Cxcl4 et TGF β (133).

b) *Les macrophages*

L'étude de la mobilisation induite par le G-CSF a permis de mettre en évidence le rôle central des cellules monocytaires, exprimant le récepteur au G-CSF (134, 135). Il a ainsi été démontré que des souris transgéniques caractérisées par une expression du récepteur au G-CSF restreinte aux monocytes-macrophages répondaient au G-CSF de manière identique à des souris *wild-type* (WT) contrôles.

En plus d'intervenir dans la mobilisation induite par le G-CSF, les monocytes-macrophages sont également impliqués dans la rétention des CSH au sein de la niche. La déplétion des macrophages dans des modèles murins transgéniques (souris *Mafia*) ou *via* l'utilisation de liposomes contenant du clodronate, induit une mobilisation des CSH (135). Les macrophages CD169^{pos} stimulent l'expression par les cellules stromales Nestin^{pos} de *Cxcl12* et d'autres facteurs de rétention comme *Vcam1* (103). Le traitement par G-CSF induit une diminution du nombre de macrophages au sein de la niche, ce qui associé à une stimulation du système nerveux sympathique, induit la mobilisation des CSH dans la circulation (103). Une population de macrophages exprimant le marqueur DARC a également été impliquée dans le maintien des CSH dans un état de quiescence, prévenant leur expansion et différenciation *via* une interaction avec CD82/KAI₁ exprimé par les CSH (136). En situation de stress, une autre population de macrophages, exprimant fortement le marqueur *alpha-smooth muscle*, protègerait les CSH du stress oxydatif induit par la régénération médullaire *via* la production de prostaglandine E₂ (137).

6. Altération de la niche médullaire par les radiations ionisantes et chimiothérapies

En situation de stress, suite à une infection, une irradiation ou une chimiothérapie, les CSH entrent en division et se différencient majoritairement en cellules de la lignée myéloïde pour rapidement reconstituer le pool de cellules sanguines (150-152). Ce phénomène est transitoire, les cellules souches retrouvant un état de quiescence après l'épisode aigu. En dehors des effets directs sur l'hématopoïèse, les radiations ionisantes et agents cytotoxiques peuvent affecter les composants de la niche médullaire altérant les capacités de reconstitution hématopoïétique (153).

L'administration d'une irradiation ou d'une chimiothérapie (5 fluoro-uracile dans la plupart des études menées chez la souris) est suivie d'une rapide altération du réseau vasculaire au sein de la moelle osseuse (7, 49, 52, 154). De manière intéressante, des études de « *lineage tracing* » suggèrent que les artérioles et sinusoides se régénèrent à partir de progéniteurs radio-résistants respectivement artériolaires ou sinusoidaux soit de même nature que le vaisseau nouvellement formé (7). La régénération vasculaire est indispensable à la reconstitution hématopoïétique (52). Ces deux processus nécessitent l'expression par les cellules endothéliales de différents facteurs comme *Scf*, *VEGFR2*, *DLL4* et *Jagged1* (7, 154-156). L'expression du *Scf* par les cellules artériolaires, et non sinusoidales, est indispensable à la reconstitution hématopoïétique.

D'autres composants de la niche peuvent être altérés par les radiations ionisantes et chimiothérapies. Ainsi, le cis-platine et la vincristine, molécules connues pour leur neurotoxicité, induisent chez la souris une neuropathie sympathique médullaire affectant négativement la régénération (90).

Bien que les cellules stromales soient majoritairement quiescentes, les chimiothérapies et radiations ionisantes affectent leurs capacités de soutien à l'hématopoïèse. Une diminution de l'activité *colony forming unit-fibroblast* (CFU-F) est observée chez les patients ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques avec des anomalies persistantes de nombreuses années après la greffe (153). L'altération de

l'activité CFU-F a été confirmée après administration de chimiothérapie dans des modèles murins (90, 157).

D. Les cellules stromales mésenchymateuses

Les cellules stromales mésenchymateuses représentent une population hétérogène de cellules stromales caractérisées par leurs capacités à se différencier en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes, leurs facultés d'adhésion aux surfaces plastiques et l'expression de marqueurs de surface caractéristiques (138). Initialement identifiées au sein de la moelle osseuse, les BM-MSC ont depuis été isolées dans de multiples organes et tissus : gelée de Wharton et cordon ombilical, tissu adipeux, peau, organes lymphoïdes secondaires, membranes synoviales, cartilages articulaires, os compact et périoste (33, 139-145). Au sein de la moelle osseuse, les cellules stromales mésenchymateuses sont localisées à proximité des vaisseaux sanguins où elles interagissent étroitement avec les CSH. De nombreux marqueurs ont été identifiés pour isoler les BM-MSC indiquant l'existence d'une importante hétérogénéité (54, 68, 95, 112, 146). Ces cellules sont la source d'intenses travaux de recherche compte tenu notamment de leurs propriétés immunomodulatrices et de leur potentielle utilisation en médecine régénérative.

1. Historique

L'existence de cellules non-hématopoïétiques localisées au sein de la moelle osseuse a été évoqué pour la première fois en 1867 par le biologiste allemand Julius Friedrich Cohnheim (1839-1884). En injectant un colorant chimique en intraveineux, Julius Friedrich Cohnheim étudia l'implication des cellules d'origine sanguine et par extension médullaire, dans la cicatrisation en analysant les cellules « marquées » au sein de plaies provoquées chez l'animal. En plus des cellules hématopoïétiques inflammatoires, Cohnheim décrivit des cellules d'allure fibroblastique associées à de fines fibrilles. Ces travaux suggéraient l'existence de cellules non

hématopoïétiques, originaires de la moelle osseuse, d'allure fibroblastique impliquées dans la cicatrisation (147).

Au début du XXe siècle, le scientifique russe Alexander Maximov (1874-1928) proposa la « théorie unitaire de l'hématopoïèse » (**Figure 9**). Extrêmement novateur, A. Maximov suggéra que les cellules hématopoïétiques différenciées descendaient d'une cellule souche hématopoïétique contrôlée localement par des cellules stromales. Bien qu'Alexander Maximov fût très respecté par la communauté scientifique, sa théorie fut accueillie avec un certain scepticisme (148).



Figure 9

FIGURE 9: A. Maximov dans son laboratoire de culture cellulaire à Saint Petersburg (1915). Image extraite de la publication: Friedenstein, A. J. "Stromal-hematopoietic interrelationships: Maximov's ideas and modern models." (149)

Il faudra attendre plus de 50 ans et les travaux de Alexander Friedenstein (1924-1998) pour confirmer l'hypothèse de A. Maximov. Alexander Friedenstein, à qui l'on attribue habituellement la découverte des cellules stromales mésenchymateuses, a comme A.

Maximov, débuté sa carrière à l'académie militaire médicale de Saint Pétersbourg. Dans les années 1960-1970, Alexander Friedenstein sera le premier scientifique à isoler de la moelle osseuse des cellules de morphologie fibroblastique, adhérentes, avec une importante activité mitotique et capables de former des colonies *in-vitro* (CFU-F) (150, 151). Alexander Friedenstein décrit également la capacité de ces cellules à se différencier en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes *in vitro* et *in vivo*(152, 153) . Ces résultats seront reproduits par d'autres équipes notamment Tavassoli et Crosby qui en greffant des fragments osseux autologues chez le rat, le lapin et le chien, observeront la reconstitution d'un tissu hématopoïétique et la prolifération de cellules fibroblastiques capables de donner des ostéoblastes et de former de nouvelles trabéculations osseuses *in-vivo* (154). Il faudra attendre les années 1980 pour que des cellules stromales médullaires soient isolées chez l'Homme (155, 156). La capacité de différenciation des cellules stromales humaines *in-vitro* en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes sera mis en évidence par MF. Pittenger en 1999 (157).

Le terme de MSC ne sera proposé qu'en 1991 par Arnold I. Caplan (158).

2. Définition

Le fort engouement pour l'étude des cellules stromales et l'utilisation de différentes stratégies d'isolement et définitions phénotypiques a initialement limité la comparaison entre les différentes publications. L'élaboration de critères minimum définissant les MSC est rapidement devenu indispensable. La société internationale de thérapie cellulaire (ISCT) a émis en 2006 des recommandations sur les critères minimums permettant de définir une MSC chez l'Homme (138). L'ISCT insiste également sur la nécessité d'utiliser préférentiellement le terme de « cellules stromales multipotentes » et de réserver celui de « cellules souches mésenchymateuses » aux populations cellulaires dont les propriétés d'autorenouveauement ont pu être démontrées.

Selon l'ISCT, les MSC sont définies par :

- Leur adhérence aux surfaces plastiques
- L'expression d'antigènes de surface spécifiques
- Leur potentiel de différenciation en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes

Ces critères sont présentés dans le **tableau 1**.

1) Adhérence aux surfaces plastiques		
2) Phénotype:	Positive ($\geq 95\%$)	Négatives ($\leq 2\%$)
	CD105	CD45
	CD73	CD34
	CD90	CD14 ou CD11b CD79 α ou CD19 HLA-DR
3) Différenciation in-vitro en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes		

Tableau 1

TABLEAU 1 : Définition des MSC selon les critères minimaux établis par l'ISCT. D'après Dominici, et al. (138)

Chez la souris, les MSC sont habituellement définies par leur capacité de différenciation en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes *in-vitro* et l'absence d'expression du marqueur de surface pan-leucocytaire CD45 et endothélial CD31.

Malgré les recommandations de l'ISCT, il est important de souligner que le terme MSC largement utilisé dans la littérature désigne le plus souvent indifféremment les « cellules stromales mésenchymateuses » et « cellules souches mésenchymateuses » bien que les propriétés d'autorenouveauement soient rarement démontrées *in-vivo*.

3. Les cellules stromales au sein de la moelle osseuse (BM-MSc)

Les BM-MSc représentent un acteur central de la niche hématopoïétique, produisant des facteurs de croissances, transmettant les influx nerveux aux autres cellules de la niche et interagissant directement avec les CSH pour réguler leurs propriétés d'auto-renouveauement, prolifération et différenciation (159). Les BM-MSc sont localisées dans les régions péri-

vasculaires où elles forment un réseau rappelant les structures neuronales. De nombreux marqueurs ont été décrit pour isoler les BM-MSCs et le développement des techniques de sc-RNAseq ouvre de nouvelles perspectives dans la compréhension de l'importante hétérogénéité de ce compartiment médullaire (41, 45, 160).

a) Ontogénèse

Durant l'embryogénèse, les cellules issues de la crête neurale migrent dans les os où elles se localisent le long des vaisseaux sanguins dans la cavité médullaire (161). L'ontogénèse des os et de la moelle osseuse fait intervenir des « vagues » successives de différentes populations stromales (24, 27, 28, 112, 114, 161-163). Les cellules exprimant les marqueurs Osterix, Collagène2 et Hoxa11 se différencient en ostéoblastes, ostéocytes, chondrocytes et cellules stromales dans les os en développement (27, 95, 161). Les cellules Nestin-Cre^{ER}-positives donnent de manière transitoire des ostéoblastes et des cellules stromales médullaires en période post-natale (95). Par ailleurs, une partie des cellules exprimant les marqueurs Osterix et Hoxa11 se différencient en cellules stromales exprimant le récepteur à la leptine (LepR^{pos}) en période périnatale (112, 162, 163). Les cellules LepR^{pos} sont initialement présentes en faible quantité et principalement localisées au niveau des métaphyses. Leur nombre augmente progressivement et elles représentent la majorité des cellules stromales à l'âge adulte où elles se localisent principalement dans les régions péri-sinusoïdales (120, 146). Des travaux récents ont également mis en évidence une origine commune entre les cellules stromales de la moelle osseuse et celles du périoste (33). Ainsi, les cellules stromales du périoste et de la moelle osseuse sont issues de la différenciation locale d'un progéniteur mésenchymateux exprimant le marqueur PRX1 (utilisation de souris Prx1-Cre). La multiplicité des marqueurs utilisés dans les études et, dans de nombreux cas leur redondance, rendent difficile la démonstration d'une hiérarchie entre les différentes populations décrites. Il est néanmoins clair que la formation du réseau de cellules stromales est la conséquence de multiples vagues successives de différents progéniteurs mésenchymateux.

b) Principaux marqueurs

Les cellules stromales conservent un profil d'expression génique dérivé de la crête neurale et notamment une expression du gène *nestin* (161, 164). L'étude de souris transgénique Nestin-GFP a permis la mise en évidence de cellules stromales péri vasculaires Nestin-GFP^{pos} et exprimant fortement les cytokines de soutien des CSH à savoir CXCL12, SCF, Angiopoietin-1 et l'interleukine-7 (95). On distingue, en fonction de l'intensité de fluorescence du rapporteur GFP, deux populations de cellules stromales Nestin-GFP^{pos} (56). Les cellules Nestin-GFP^{bright}, de localisation péri-artériolaires, très largement minoritaires, expriment le plus fortement les gènes impliqués dans le soutien des CSH et peuvent également être identifiées par les marqueurs *Neural/glial antigen 2* (Ng2) et *Myosin Heavy chain 11* (MYH11) (56, 68). A l'inverse, les cellules Nestin-GFP^{low}, ont une localisation péri-sinusoïdale et sont majoritairement LeptinR^{pos}. Les cellules stromales Nestin-GFP^{pos} peuvent également être isolées par l'utilisation de la combinaison des marqueurs CD51 et CD140a (PDGFR α) chez la souris et l'Homme (165). La combinaison CD51 et CD200 est également largement utilisée pour isoler les cellules stromales au sein de la moelle osseuse, de l'os et du périoste chez la souris (166-168). Les marqueurs PDGFR α et Sca-1 ont été proposés pour isoler les cellules stromales (P α S) mais cette population se révèle très hétérogène (169). Une autre population stromale, englobant en grande partie les cellules Nestin-GFP^{pos} a été identifiée par le *Knock-in* du rapporteur GFP sous contrôle du promoteur du gène codant pour Cxcl12. Ces cellules, produisant également du SCF et de l'interleukine 7, appelées CAR-cells pour « *CXCL12 Abundant Reticular stromal cells* » sont intimement associées aux capillaires sinusoides (170, 171). Par une approche similaire, l'équipe de Sean Morrison a identifié les cellules stromales LeptinR^{pos} par le *Knock-in* du rapporteur GFP sous contrôle du promoteur du gène codant pour *scf* (7, 146). Les cellules lepR^{pos} ont une localisation péri-sinusoïdale et constituent des précurseurs ostéo-adipocytaires (172). *Paired-Related Homeobox Protein 1* (PRX1) est un facteur de transcription exprimé tôt durant le développement des membres. En utilisant des souris Prx1-cre, Greenbaum, et al. ont démontré que les cellules stromales exprimant le marqueur PRX1 représentaient la source principale de Cxcl12 (54, 173). Il faut néanmoins garder à l'esprit qu'il existe une importante redondance entre les populations stromales Nestin-GFP^{pos}, LepR^{pos}, CAR et PRX1^{pos} (162, 165, 172, 174, 175). Chez l'Homme, les cellules

péri-vasculaires sont principalement identifiées par l'expression des marqueurs CD146 et CD271 (176-178).

Différents marqueurs ont également été identifiés afin d'isoler les progéniteurs ostéoblastiques tout en gardant à l'esprit que certaines populations précédemment décrites, comme les cellules Nestin-GFP^{pos} participent également à l'ostéogénèse et au remodelage osseux (162). Ainsi, sur le plan phénotypique, on retiendra les combinaisons : CD105^{pos}Thy1^{pos}, CD51^{pos}CD200^{pos} et les cellules positives pour CD51 et Sca-1 (167, 179, 180). Gremlin-1, un antagoniste de la *Bone Morphogenic Protein*, identifie une population stromale principalement localisée au niveau des métaphyses des os long et capable de se différencier en ostéoblastes, chondrocytes et cellules stromales médullaires mais pas en adipocytes la différenciant des cellules Nestin-GFP^{pos} et LepR^{pos} (114). Enfin, l'expression du gène *osterix* permet d'identifier différentes vagues de progéniteurs ostéoblastiques au cours du développement (112).

c) Etude du rôle fonctionnel des populations stromales par la délétion ciblée des cytokines Scf et Cxcl12

Afin d'élucider les rôles respectifs des différentes populations stromales dans l'hématopoïèse, de nombreuses études reposant sur l'utilisation des modèles transgéniques permettant une délétion ciblée de certaines cytokines ont été menées (**Figure 10**). Il est important de souligner que la plupart des modèles murins disponibles pour l'étude du microenvironnement stromale reposent sur un système Cre/loxP actif constitutionnellement et non inductible. Il est donc possible que les résultats obtenus soient, en partie secondaires à un effet de la délétion en cours du développement et ne seraient pas reproduit en cas de délétion induite chez un animal adulte. De même, on ne peut exclure des phénomènes de compensation par d'autres populations cellulaires. Néanmoins, ces études soulignent le rôle central des cellules stromales péri vasculaires dans la maintenance des CSH et le contrôle de leur mobilisation.

La délétion de *Cxcl12* en utilisant le modèle Ng2-Cre permettant de cibler virtuellement la totalité des cellules Nestin-GFP^{pos}, induit une diminution drastique de la cellularité

médullaire. Cette délétion induit également une diminution du nombre de CSH, leur redistribution à distance des artérioles, leur entrée en cycle et une altération de leur capacité de reconstitution hématopoïétique (68). Les cellules LepR^{pos} représentent une source majeure, si ce n'est la principale de Scf et Cxcl12. Ainsi, 95% des cellules Scf-GFP^{high} et 90% des cellules Cxcl12-DsRed^{high} sont marquées par le marqueur Leptine-R (7, 55). La délétion conditionnelle de *Cxcl12* dans les cellules LepR^{pos} induit une mobilisation des CSH mais n'a pas d'effet sur leur localisation ni leur nombre au sein de la moelle osseuse (54, 55, 68). La délétion de *Scf* dans les cellules LeptinR^{pos} induit en revanche une baisse du nombre de CSH au niveau médullaire (7, 181). La délétion de *Cxcl12* au sein de la niche artériolaire en utilisant les modèles inductibles Ng2-Cre^{ERTM2} ou MYH11-Cre^{ER} induit une diminution du nombre de CSH dans la moelle osseuse et leur relocalisation à distance des artérioles (68). A l'inverse, la délétion de *Scf* dans la niche artériolaire en utilisant les modèles précédemment décrit n'a pas d'effet sur le nombre et la localisation des CSH (68).

Ces données soulignent la possibilité d'un effet différentiel des principales cytokines en fonction des niches concernées.

	Perivascular cells marked by Cre		Observed phenotype			
	Sinusoid	Arteriole	Cxcl12 deletion		Scf deletion	
			BM HSC	PB HSPC	BM HSC	PB HSPC
LepR-cre	✓		→	↑	↓	→
NG2-cre	✓	✓	↓	↑	↓	→
NG2-cre ^{ERTM}		✓	↓	→	→	→
Myh11-cre ^{ERT2}		✓	↓	→		

Figure 10

FIGURE 10 : Résumé des effets des délétions sélectives des cytokines Scf et Cxcl12 au sein des différentes populations stromales péri-vasculaires. HSC: hematopoietic stem cell, HSPC: hematopoietic Stem and Progenitor Cell. D'après Asada, *et al.* (68)

d) Apport des nouvelles techniques de sc-RNAseq dans la compréhension de la complexité de la niche hématopoïétique et l'hétérogénéité des populations stromales.

Le développement des nouvelles techniques de sc-RNAseq offre la possibilité de mieux appréhender la complexité du microenvironnement médullaire. Le groupe de Iannis Aifantis a ainsi identifié au sein de la population LeptinR^{pos}, deux sous populations principales caractérisées par une signature transcriptomique adipogénique « adipo-primed » ou ostéogénique « osteo-primed » (43). La population « adipo-primed » est caractérisée par une forte expression du gène Leptine et apparaît, située au-dessus des progéniteurs « osteo-primed » sur un plan phylogénique. De façon intéressante, les auteurs ont localisé ces sous populations au sein de la niche hématopoïétique. Les cellules « adipo-primed » sont situées en péri-sinusoïdales alors que les cellules « osteo-primed » se localisent à proximité des artérioles. Les cellules LepR^{pos} « adipo-primed » expriment en plus de *Cxcl12*, *Scf* et IL-7, les cytokines IL-15, IL-34, *Csf-1*, *Bmp4*, *Ccl19* et *Ccl2*. L'existence de deux populations cellulaires de BM-MSC avec des profils « osteo-primed » ou « adipo-primed » a été confirmée par une étude indépendante publiée quelques mois plus tard dans laquelle ces deux populations sont respectivement nommées « osteo-CAR » et « adipo-CAR » (41). Sur le plan fonctionnel, les BM-MSC « adipo-primed » sont fortement enrichies en activité CFU-F. De manière intéressante, la signature moléculaire des BM-MSC « adipo-primed » est particulièrement proche de celles des BM-MSC humaines isolées sur le phénotype CD45^{neg}CD271^{pos} (178).

4. Les cellules stromales du périoste

Le périoste est un tissu particulièrement riche en cellules stromales qui assurent un rôle central dans le remodelage osseux et la cicatrisation de l'os (formation du cal osseux) après fracture. La caractérisation des cellules stromales du périoste (P-SSC) est rendu difficile par l'absence de marqueur spécifique permettant leur isolement. L'étude des P-SSC repose sur l'utilisation de plusieurs marqueurs stromaux et de leurs propriétés d'adhésion.

a) *Isolement*

Différentes techniques ont été développées afin d'isoler physiquement les cellules stromales du périoste. La dissection du périoste humain est relativement simple et repose sur l'utilisation d'outils de chirurgie spécifiques permettant de séparer le périoste de la surface osseuse sous-jacente. Cette technique est utilisée couramment en chirurgie dentaire et orthopédique. Une fois le périoste séparé de l'os, les cellules stromales sont isolées par dissociation enzymatique ou par la mise en culture de fragments de périoste entraînant une migration et une expansion spontanée des cellules stromales.

La dissection et l'isolement des P-SSC chez la souris est plus difficile en raison de l'extrême finesse du périoste, de sa forte adhérence à l'os et de la limite parfois floue avec le tissu musculaire. Chez la souris jeune où le périoste est peu adhérent à l'os, il est possible d'isoler le périoste par une dissection soignée après avoir retiré le tissu musculaire. Chez la souris plus âgée, en plus de la dissociation physique simple, plusieurs techniques ont été développées pour isoler les cellules stromales. La première consiste à déposer les fémurs directement dans des plaques de culture dans un milieu nutritif (**Figure 11**). Les cellules stromales, du fait de leurs propriétés de migration et d'adhésion aux surfaces plastiques vont migrer et pourront aisément être isolées après un traitement par trypsine (33, 182). Afin de limiter ce risque de contamination, l'équipe de Geert Carmeliet a développé une technique reposant sur une dissociation enzymatique du fémur « entier » après avoir recouvert les régions distales (diaphyses et épiphyses) d'un gel d'agarose (183). Enfin, l'équipe de Xinping Zhang a utilisé l'importante capacité de prolifération des cellules du périoste après soumission à un stress pour les isoler. Leur technique consiste à créer une perte de substance osseuse au niveau du fémur de souris et de combler celle-ci par un greffon de périoste autologue. Le périoste greffé, siège d'une expansion des cellules stromales est isolé 5 jours après la greffe par dissociation physique et chimique (184).

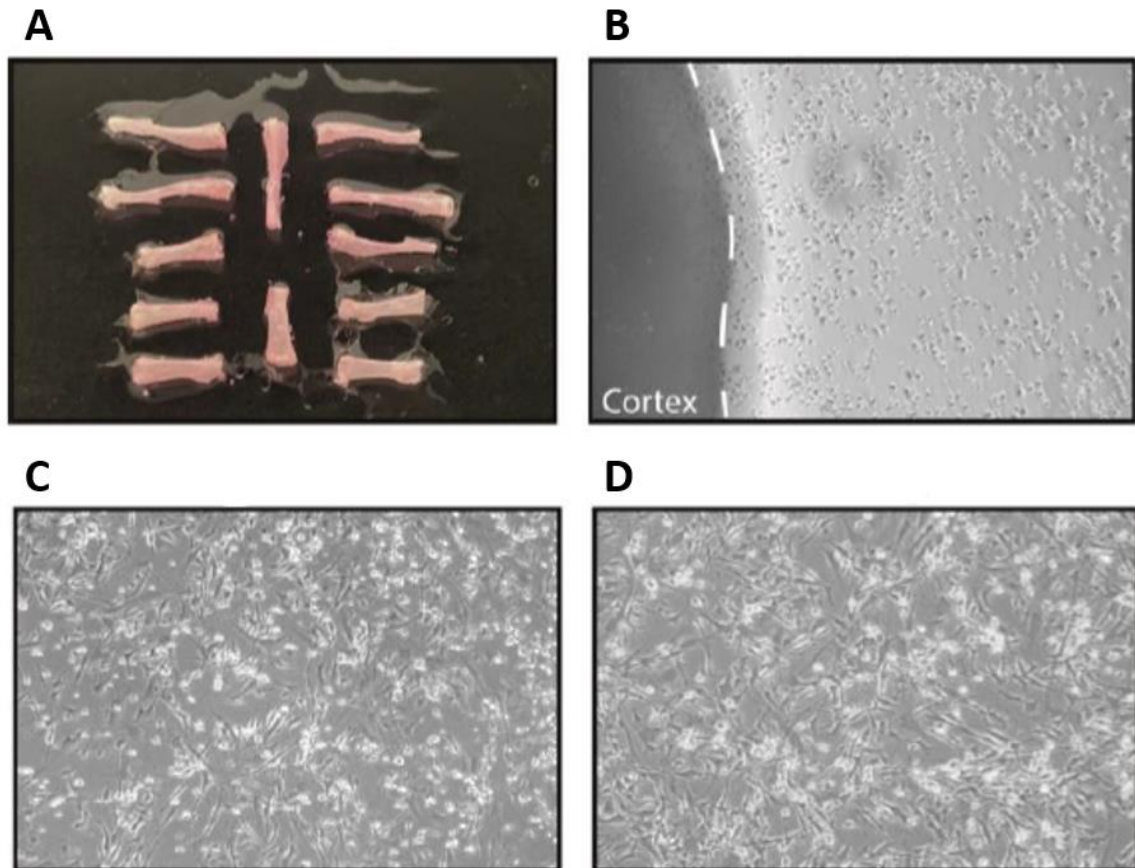


Figure 11

FIGURE 11: Isolation de cellules du périoste par une technique de migration. Issue de Perrin S, et al (182). **A** : après excision des épiphyses et élimination de la moelle osseuse, les fragments osseux sont déposés dans un milieu de culture. **B** : Les cellules du périoste migrent après quelques jours de cultures. **C-D** : Cellules du périoste à P0 et P1.

Bien que ces différentes approches permettent d'isoler des P-SSC, il est clair que leur nature, état d'activation et les caractéristiques des populations isolées diffèrent entre ces différentes techniques.

b) Caractérisation phénotypique

Comme discuté précédemment, la principale difficulté pour étudier les P-SSC est l'absence de marqueur de surface spécifique. La plupart des études ont par ailleurs été menées sur des cellules en culture, pouvant être source de modifications phénotypiques.

Les P-SSC sont caractérisées par l'absence d'expression de marqueurs hématopoïétiques et endothéliaux (CD45, CD31...) et l'expression de marqueurs de cellules stromales mésenchymateuses: CD51, CD73, CD105, CD200 et Sca-1 chez la souris, CD73, CD90, CD105, CD146 et CD166 chez l'Homme (183, 185). Les cellules stromales du périoste expriment par ailleurs le gène *postn* (également appelé *Osf2* pour *osteoblast specific factor*) codant pour la protéine périostine, composant de la matrice extracellulaire (186). Du fait de sa localisation au niveau de la matrice extracellulaire, ce marqueur ne peut être utilisé pour marquer les P-SSC. La surexpression du gène *postn* induite par l'activation des P-SSC (33) peut néanmoins être mise à profit pour marquer les P-SSC dans un modèle murin où la recombinaise Cre est placée sous le contrôle du promoteur du gène *postn* (souris $Postn^{tm2.1(cre/Esr1^*)Jmol/J}$) (187).

c) *Propriété en culture*

En culture, les cellules stromales du périoste sont caractérisées par une importante activité clonogénique avec une expansion rapide. On observe ainsi une activité CFU-F très nettement supérieure à celle des MSC isolées à partir de la moelle osseuse. Cette importante activité CFU-F a été observée chez la souris et chez l'Homme (**Figure 12**) (188). En culture, les cellules stromales adoptent une morphologie fibroblastique avec une forte adhésion aux revêtements plastiques. Avec l'utilisation de milieu de différenciation, les cellules stromales du périoste se différencient dans les lignées ostéoblastiques, adipocytaires et chondroblastiques (35, 183, 185, 189, 190). Il ne semble pas exister de différence notable entre les cellules stromales du périoste et les cellules stromales isolées à partir de la moelle osseuse en termes de différenciation ostéoblastique et chondroblastique. La différenciation adipocytaire est en revanche moins marquée pour les cellules issues du périoste suggérant un biais de différenciation ostéo-chondrogénique (188).

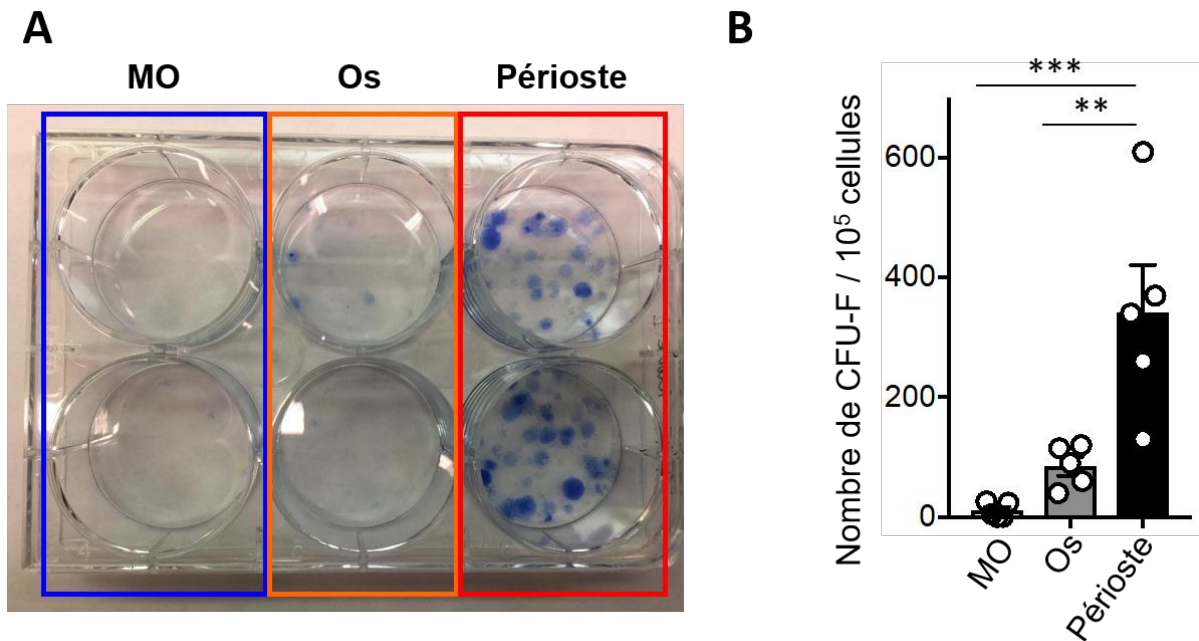


Figure 12

FIGURE 12 : Comparaison de l'activité CFU-F de la moelle osseuse (MO), de l'os et du périoste murin. **A** : photographie illustrant les différences de CFU-F entre la moelle osseuse, l'os compact et le périoste. **B** : Nombre absolu de CFU-F pour 10^5 cellules. Les cellules stromales triées sur le phénotype $CD45^{neg}Ter119^{neg}CD31^{neg}CD51^{pos}CD200^{pos}$ ont été mises en culture en densité clonale en milieu adapté. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant la méthode one-way ANOVA. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$. (Données personnelles non publiées à visée illustrative)

d) *Rôle dans la cicatrisation et la formation du calus après fracture osseuse*

La cicatrisation osseuse peut être divisée en quatre phases récapitulant peu ou prou l'ostéogénèse: une phase précoce inflammatoire avec le recrutement des cellules stromales du périoste, la formation d'un cal cartilagineux, le remplacement de ce cal cartilagineux par un tissu osseux spongieux puis enfin son remodelage en un tissu osseux mature.

La survenue d'une fracture est suivie d'une phase inflammatoire avec une rupture des vaisseaux sanguins, la formation d'un hématome et le recrutement de cellules inflammatoires indispensables au processus de cicatrisation par l'expression de nombreuses cytokines comme l'interleukine 1 et l'interleukine 6. L'hypoxie induite par l'arrêt de la microcirculation entraîne

la production de VEGF et la stimulation d'une néo angiogénèse. La production de nombreux facteurs de croissance par les cellules inflammatoires s'accompagne d'un recrutement et d'une expansion majeure des cellules stromales du périoste situées au sein de la couche interne (cambium) (191-194) (**Figure 13**).

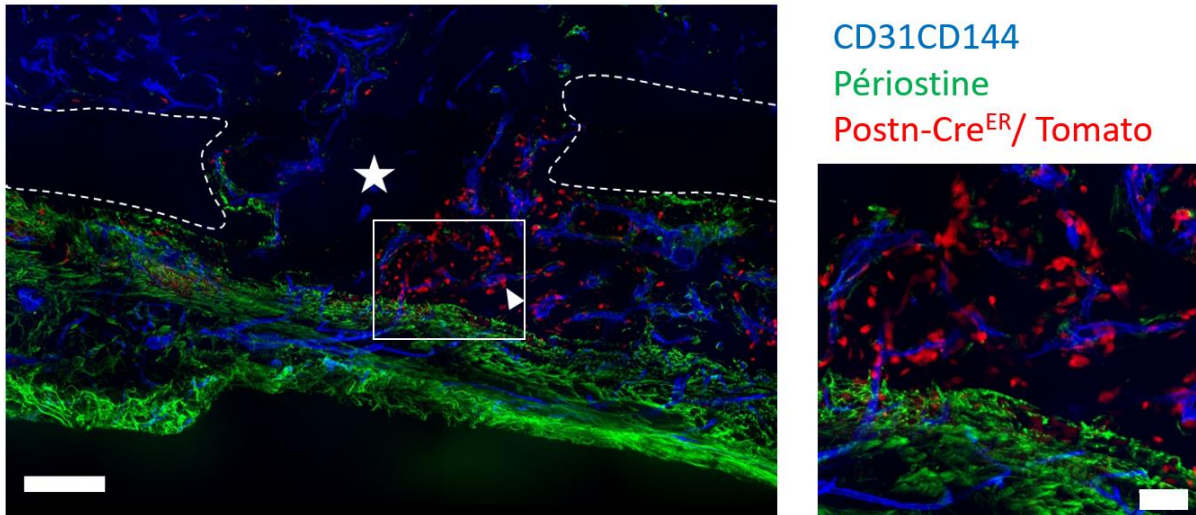


Figure 13

FIGURE 13 : Recrutement des cellules stromales du périoste (P-SSC) dans les suites d'une fracture. Images de microscopie confocale réalisées 15 jours après la réalisation d'une fracture (*étoile*) de la diaphyse fémorale d'une souris transgénique PostnCre^{ER}-Tomato. Les cellules stromales surexprimant le gène périostine et marquées en rouge (*triangle*) sont recrutées au niveau de la zone de fracture. L'image en zoom (à droite) objective de nombreuses cellules tomato^{pos} disposées le long des vaisseaux sanguins. La vascularisation est marquée en bleu par des anticorps anti-CD31 et anti-CD144 et le périoste en vert par un anticorps anti-périostine. Barre d'échelle correspondant à 200µm sur l'image de gauche et 50µm sur l'image en zoom. (*Données personnelles non publiées à visée illustrative*).

Ces progéniteurs mésenchymateux se différencient en chondrocytes et dans une moindre mesure en ostéoblastes formant un cal cartilagineux. Ce cal va secondairement être remodelé et s'ossifier pour rendre à l'os son aspect originel.

CHAPITRE II

OBJECTIFS DE LA THESE

II. Objectifs de la thèse

Les cellules souches hématopoïétiques sont localisées au sein d'un microenvironnement spécialisé appelé niche où leurs fonctions d'autorenouveaulement, de différenciation et de prolifération sont finement régulées (1).

Les cellules stromales mésenchymateuses constituent une rare population de cellules non hématopoïétiques capables de se différencier en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes (138, 158, 195). Au sein de la moelle osseuse, les cellules stromales mésenchymateuses sont localisées principalement autour des vaisseaux sanguins et interagissent étroitement avec les cellules souches hématopoïétiques. De nombreux marqueurs ont été identifiés afin d'isoler les cellules stromales mésenchymateuses chez la souris et l'Homme avec une certaine redondance entre les différentes populations décrites (6, 7, 65, 68, 95, 146, 165).

Les cellules stromales sont majoritairement dans un état de quiescence et sous l'effet de divers *stimuli*, peuvent entrer en cycle et acquérir des propriétés régénératives source d'un intérêt croissant en raison des possibles applications thérapeutiques. Les cellules stromales mésenchymateuses constituent des acteurs centraux de la niche hématopoïétique et l'existence d'un compartiment stromal fonctionnel est indispensable pour permettre une hématopoïèse physiologique. Les chimiothérapies et radiations ionisantes induisent des modifications profondes de la niche avec des altérations de la vascularisation, des fonctions stromales et une expansion des adipocytes (10, 44, 118, 120). Les différents processus impliqués dans la régénération médullaire restent à ce jour mal compris. En dehors de la moelle osseuse, des cellules stromales ont été isolées dans différents tissus comme l'os compact (167) et le périoste (33). Dans quelle mesure ces populations stromales interagissent entre elles et peuvent être impliquées dans la régénération de la niche hématopoïétique après agression reste inconnu.

Durant ma thèse, nous avons étudié les phénomènes de régénération médullaire en tirant parti d'un modèle murin basé sur la greffe sous cutanée d'un fémur intact.

A. Objectif n°1 : Caractérisation du modèle

Dans un premier temps, nous avons caractérisé le modèle de greffe sous cutané. Nous avons étudié la régénération des différents composants de la niche au cours du temps après greffe. Nous avons ainsi analysé les compartiments hématopoïétiques, vasculaires et le compartiment stromal. Après avoir défini un délai de 5 mois après greffe comme correspondant à une phase d'équilibre, nous avons caractérisé la niche au sein du greffon en la comparant à la niche physiologique.

B. Objectif n°2 : Etude de la contribution des cellules stromales du périoste dans la régénération médullaire

De manière inattendue, nous avons observé une expansion des cellules stromales du périoste (P-SSC) dans les suites immédiates de la greffe parallèlement à une destruction des cellules stromales médullaires (BM-MSC). Nous avons donc émis l'hypothèse d'une contribution des P-SSC dans la régénération de la niche hématopoïétique. En utilisant des techniques de *lineage-tracing*, nous avons confirmé la migration des P-SSC au sein de la cavité médullaire et évalué leur capacité à soutenir l'hématopoïèse.

C. Objectif n°3 : Comparaison des P-SSC et des BM-MSC

La résistance des P-SSC au stress induit par la procédure de greffe nous a amené à émettre l'hypothèse d'un profil métabolique différent de celui des BM-MSC. Nous avons donc comparé en situation physiologique les P-SSC et BM-MSC sur le plan de leurs propriétés de quiescence et leur résistance à l'hypoxie et au stress oxydatif.

CHAPITRE III

PRINCIPAUX RESULTATS

III. Principaux résultats

Ce chapitre a pour objectif de présenter les principaux résultats obtenus lors du travail de thèse. Pour le détail des résultats et des méthodes, le lecteur est invité à se référer au manuscrit joint (article n°1)

A. Développement et caractérisation d'un modèle d'étude de la régénération médullaire

Afin d'étudier les processus impliqués dans la régénération médullaire, nous avons développé un modèle murin reposant sur la greffe sous cutanée d'un fémur intact (**Figure 14A**). Après une phase de nécrose initiale, une régénération des compartiments hématopoïétiques et non hématopoïétiques est observée avec la reprise d'une hématopoïèse fonctionnelle.

1. Après transplantation : le greffon est le site d'une régénération du microenvironnement médullaire et d'une reprise de l'hématopoïèse.

La transplantation du fémur en sous cutanée est suivie d'une nécrose des cellules présentes au sein de la cavité médullaire du greffon avec une viabilité inférieure à 10% seulement 24 heures après greffe (**Figure 14B**). Cette nécrose est associée à une destruction complète de l'architecture médullaire avec le remplacement des cellules de la cavité médullaire par des adipocytes (**Figure 14C**). La nécrose initiale est suivie d'une phase de régénération avec l'apparition d'une néo vascularisation, la régénération des cellules stromales et la reprise d'une hématopoïèse.

L'analyse du greffon à différents points de cinétique montre une augmentation progressive du nombre de cellules stromales, hématopoïétiques et endothéliales au cours des 5 mois suivant la greffe (**Figure 14D**). La cellularité totale du greffon rejoint celle de l'hôte 5 mois après la greffe. De même, il n'existe pas de différence statistiquement significative entre

le greffon et l'hôte en terme de nombre de BM-MSc cinq mois après la greffe. Concernant le compartiment vasculaire, la néo vascularisation est caractérisée par un important réseau de vaisseaux sinusoides (**Figure 14E**) dont la régénération débute environ 15 jours après la greffe. Cinq mois après la greffe, l'analyse par cytométrie en flux montre un nombre significativement plus élevé de cellules endothéliales sinusoidales mais plus faible de cellules endothéliales artériolaires au sein du greffon par rapport à l'hôte (**Figure 14E**).

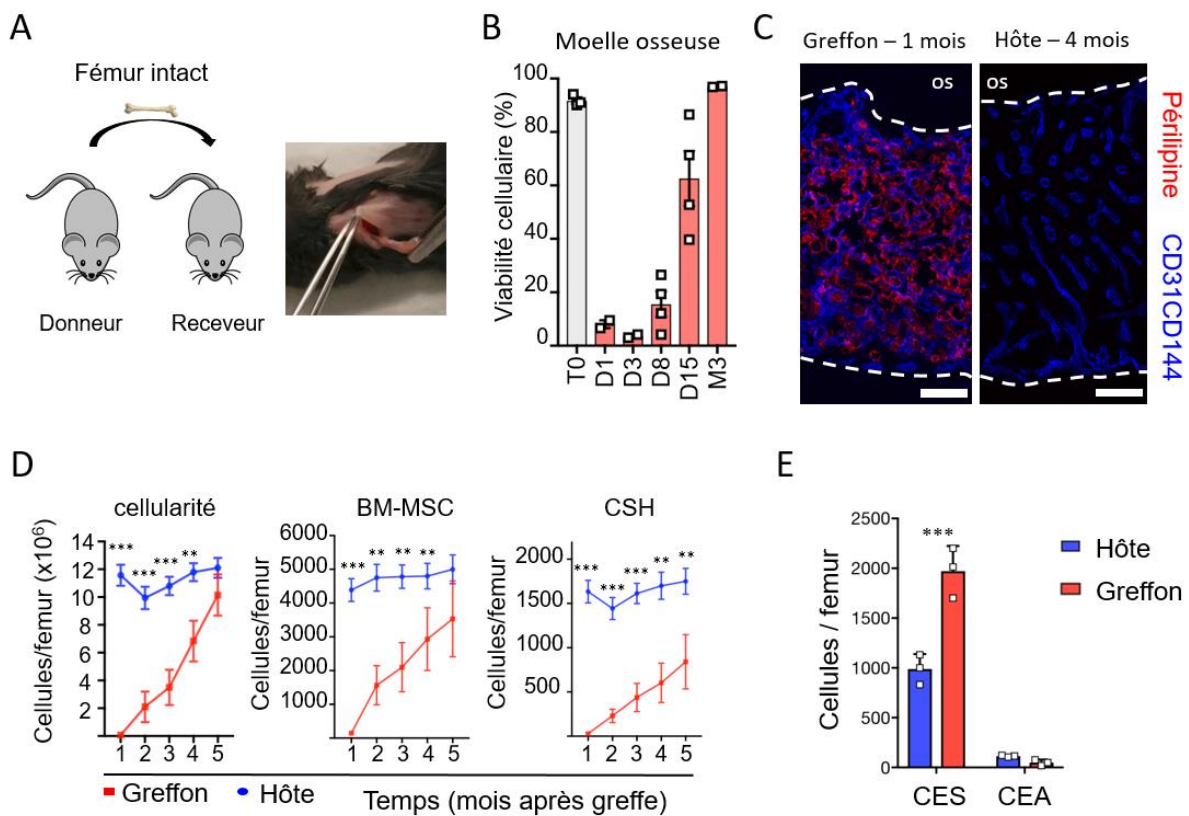


Figure 14

FIGURE 14: Caractérisation d'un modèle d'étude de la régénération médullaire. (A) Illustration de la technique de greffe sous cutanée d'un fémur intact. (B) Pourcentage de cellules médullaire viable à différents temps après greffe (D=jour et M=mois). (C) Image représentative de microscopie confocale en projection d'un fémur greffé à 1 mois de la greffe et un fémur de l'hôte à 4 mois illustrant une architecture médullaire normale. Les adipocytes sont marqués par un anticorps anti-pérlipine et la vascularisation par un marquage anti CD31 et anti CD144. Barre d'échelle = 50µm). (D) Quantification en nombre absolu de la cellularité, des BM-MSc et des CSH à 1, 2, 3, 4 et 5 mois de la greffe. (E) Quantification des cellules endothéliales sinusoidales (CES) et artériolaires (CEA) au sein de la moelle osseuse de l'hôte et du greffon 5 mois après la greffe. Les données sont représentée en mean ± SEM. *p<0,05. ** p<0,01. *** p<0,001

Concernant le compartiment hématopoïétique, le nombre de cellules souches hématopoïétiques (CSH) définies par le phénotype $\text{Lin}^{\text{neg}}\text{Sca-1}^{\text{pos}}\text{c-kit}^{\text{pos}}\text{CD38}^{\text{neg}}\text{CD150}^{\text{pos}}$ reste statistiquement inférieur dans le fémur greffé par rapport au fémur de l'hôte. L'analyse du cycle cellulaire réalisée 5 mois après la greffe montre que les CSH au niveau du greffon ont une activité mitotique plus élevée que les CSH dans le microenvironnement médullaire de l'hôte et que les CSH de souris contrôles âgées de 8 semaines (**Figure 15B**). Nous n'avons en revanche pas observé de différence significative en termes de progéniteurs hématopoïétiques et cellules immunes à l'exception d'une fréquence de lymphocytes T CD8^{pos} légèrement supérieure dans la moelle du greffon par rapport à la moelle de souris contrôles mais sans différence significative avec le nombre de lymphocytes T CD8^{pos} au niveau de l'hôte (**Figure 15A et 15C**).

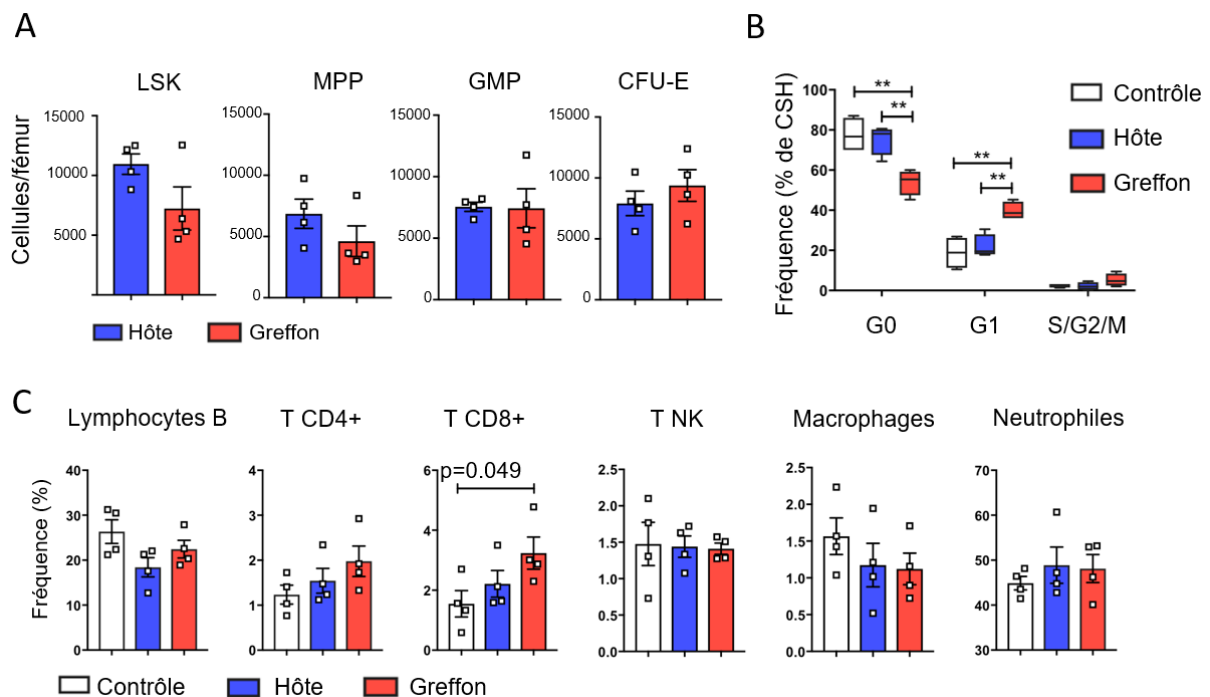


Figure 15

FIGURE 15 : Analyse du compartiment hématopoïétique à 5 mois de la greffe. (A) Comparaison de différentes populations de progéniteurs hématopoïétiques entre le greffon et l'hôte à 5 mois de la greffe. **(B)** Analyse du cycle cellulaire des cellules souches hématopoïétiques dans une souris contrôle, le fémur de l'hôte et le greffon à 5 mois de la greffe. **(C)** Comparaison de différentes cellules immunes entre une souris contrôle, le fémur de l'hôte et le greffon à 5 mois de la greffe. Les données sont représentée en mean \pm SEM. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$

2. Origine des cellules au sein du greffon

Afin de préciser l'origine des cellules stromales au sein du greffon, nous avons transplanté des fémurs prélevés sur des souris Ubc-GFP où l'ensemble des cellules expriment le rapporteur GFP à des souris Rosa26-mT/mG où toutes les cellules expriment le rapporteur Tomato (**Figure 16A**). L'analyse de la moelle osseuse des greffons 5 mois après la greffe montre que toutes les cellules stromales définies par l'expression des marqueurs CD51 et CD140a et l'absence des marqueurs CD45, Ter119 et CD31 expriment le rapporteur GFP démontrant que les cellules stromales mésenchymateuses médullaires ont pour origine le greffon (**Figure 16B et 16C**). A l'inverse, toutes les cellules hématopoïétiques définies par l'expression des marqueurs CD45 et/ou Ter119 expriment le rapporteur Tomato démontrant une colonisation du greffon par des cellules hématopoïétiques provenant de l'hôte. Les cellules endothéliales définies par l'absence d'expression du marqueur CD45 et l'expression des marqueurs CD31 et CD144 (injection intravasculaire des anticorps) ont une origine mixte avec une majorité de cellules originaires du greffon.

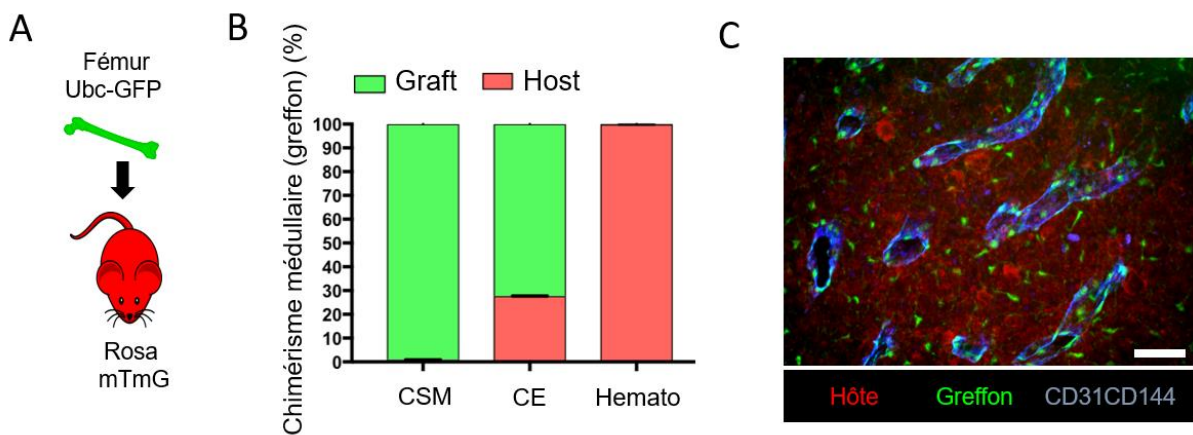


Figure 16

FIGURE 16 : Analyse de l'origine des cellules au sein du greffon à 5 mois de la greffe. (A) représentation schématique de l'expérience. L'origine des cellules est déterminée suite à la greffe du fémur d'une souris ubc-eGFP à une souris Rosa-mT/mG. **(B)** Chimérisme médullaire au sein du greffon déterminé par cytométrie en flux pour les cellules stromales mésenchymateuses (CSM), cellules endothéliales (CE) et cellules hématopoïétiques (Hémato). **(C)** Image de microscopie confocale de la cavité médullaire d'un greffon Ubc-eGFP greffé dans une souris rosa-mT/mG. Barre d'échelle: 50µm. N=3

Nous avons confirmé l'origine des cellules stromales en utilisant les souris transgéniques Nestin-GFP où le rapporteur GFP est sous le contrôle du promoteur du gène *nestin* exprimé par les BM-MSCs. Nous avons transplanté des fémurs prélevés chez des souris Nestin-GFP à des souris WT et inversement des fémurs prélevés chez des souris WT à des souris Nestin-GFP. Lorsque le greffon est Nestin-GFP, les cellules analysées 5 mois après la greffe expriment le rapporteur GFP au sein du greffon. Aucun signal GFP n'est en revanche détecté dans la moelle osseuse de l'hôte. A l'inverse, lorsqu'un fémur prélevé chez une souris WT est transplanté à une souris Nestin-GFP, l'analyse de la moelle osseuse des greffons 5 mois après la greffe ne retrouve pas l'expression du rapporteur GFP par les cellules stromales confirmant que les BM-MSCs sont originaires du greffon dans notre modèle (données non montrées).

3. Au sein du greffon, les cellules stromales sont fonctionnelles

Après avoir déterminé l'origine des BM-MSCs au sein du greffon, nous avons souhaité les caractériser sur un plan fonctionnel. Pour cela nous avons transplanté des fémurs prélevés sur des souris transgéniques Nestin-GFP à des souris Nestin-GFP (**Figure 17A**). Nous avons ensuite trié les BM-MSCs de l'hôte et du greffon définies par le phénotype $CD45^{neg}Ter119^{neg}CD31^{neg}NestinGFP^{pos}$ 15 jours, 1, 3 et 5 mois après la greffe. Nous avons dans un premier temps observé par analyse en qPCR une augmentation progressive de l'expression des gènes *Cxcl12* et *Scf* par les MSC après la greffe (**Figure 17B**). Trois mois après la greffe, l'expression de ces deux gènes par les BM-MSCs du greffon et de l'hôte sont statistiquement comparables. Cinq mois après la greffe, l'analyse par qPCR ne retrouve pas de différences significatives d'expression par les BM-MSCs du greffon, de l'hôte et d'un groupe contrôle des gènes *osteopontin (Opn)*, *angiopoietin 1 (Angpt1)*, *vascular cell adhesion molecule 1 (Vcam1)* et *nerve growth factor (Ngf)* (**Figure 17C**).

Par ailleurs, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative concernant l'activité de CFU-F entre le greffon et l'hôte 5 mois après la greffe (**Figure 17D**).

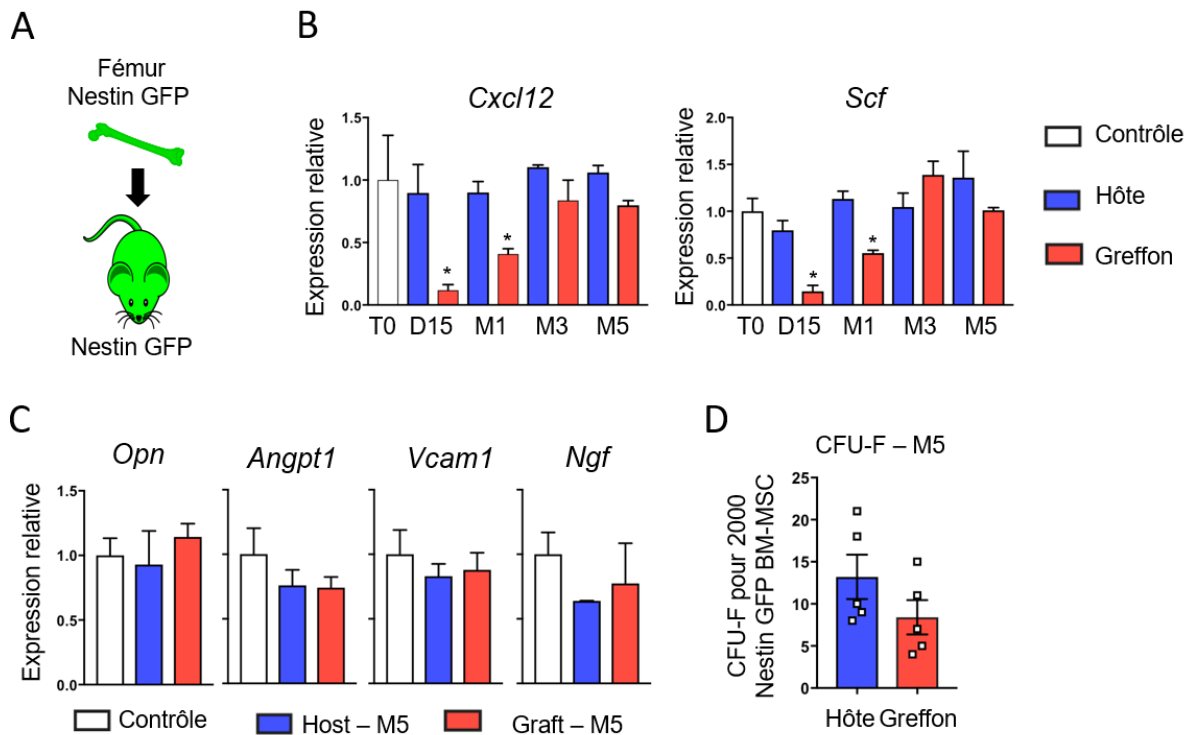


Figure 17

FIGURE 17 : Les cellules stromales au sein du greffon sont fonctionnelles. (A) Représentation schématique de l'expérience. Un fémur prélevé chez une souris Nestin-GFP est greffé dans une souris Nestin-GFP. Les cellules stromales médullaire des fémurs greffés et de l'hôte $CD45^{neg}Ter119^{neg}CD31^{neg}Nestin-GFP^{pos}$ sont ensuite triées pour analyse. (B) Comparaison de l'expression des cytokines *Scf* et *Cxcl12* par les cellules stromales d'un fémur contrôle, du greffon et de l'hôte à différents temps après greffe. (N=3) (C) Comparaison de l'expression des gènes ostéopontine (*Opn*), Angiopoïétine-1 (*Angpt1*), *vascular cell adhesion molecule 1* (*Vcam1*) et *Nerve growth factor* (*Ngf*) par les cellules stromales d'un fémur contrôle, du greffon et de l'hôte 5 mois après la greffe. (N=3) (D) Nombre absolu de CFU-F de BM-MSc définies par le phénotype $CD45^{neg} ter119^{neg}NestinGFP^{pos}$ triées de fémurs greffés et de l'hôte 5 mois après la greffe et mise en culture à densité égale (N=5 par groupe). Les données sont représentée en mean \pm SEM.

B. Le stress lié à la transplantation induit une nécrose des BM-MSc et une expansion des P-SSC

1. Les cellules stromales du périoste présentent une résistance au stress induit par la greffe supérieure à la résistance des cellules stromales médullaires.

Les expériences précédentes nous ont permis de démontrer dans notre modèle que les BM-MSC sont issues du greffon. Nous avons souhaité dans un premier temps déterminer si les BM-MSC résistantes à l'agression induite par la transplantation résidaient dans une localisation particulière au sein du greffon. Nous avons donc dans un premier temps analysé 24 heures après la greffe la viabilité cellulaire des cellules de la moelle osseuse, l'os compacte et du périoste du fémur greffé. Nous avons observé une viabilité supérieure des cellules du périoste par rapport aux cellules de l'os compacte et de la moelle osseuse.

Afin de confirmer la localisation des cellules stromales résistantes à la greffe et la cinétique de régénération dans la phase précoce, nous avons transplanté des fémurs prélevés sur des souris Nestin-GFP à des souris WT et analysé par cytométrie en flux et microscopie confocale les greffons à T0, J1, J3, J8, J15 et 3 mois après la greffe.

L'analyse de la moelle osseuse montre une diminution drastique de la cellularité dans les 24 premières heures suivant la greffe (**Figure 18A**). La cellularité augmente progressivement à partir de J3 et comme nous l'avons vu précédemment est comparable à la cellularité de l'hôte 5 mois après la greffe (**Figure 14D**).

A l'inverse, la phase précoce est marquée par une augmentation majeure de la cellularité du périoste avec une cellularité maximale à J8 suivie d'une diminution progressive (**Figure 18B**). Suivant l'augmentation de la cellularité, le nombre de cellules stromales du périoste (P-SSC) atteint un maximum à J8.

De manière similaire à ce qui est observé dans la moelle osseuse, la cellularité de l'os compacte correspondant à la fraction osseuse après flush de la moelle et élimination du périoste, diminue rapidement après la greffe avec une diminution conjointe du nombre de cellules stromales.

Nous avons confirmé ces résultats en utilisant la microscopie confocale sur coupe épaisse de greffons Nestin-GFP (**Figure 18C**). Après une phase initiale caractérisée par la disparition des CSM Nestin-GFP au sein de la moelle osseuse mais la persistance de ces cellules dans le périoste, on observe une expansion importante des cellules stromales Nestin-GFP^{pos} au sein

du périoste avec un maximum à J8 suivi par l'apparition de cellules Nestin-GFP^{pos} dans l'os et la moelle osseuse périphérique à J15.

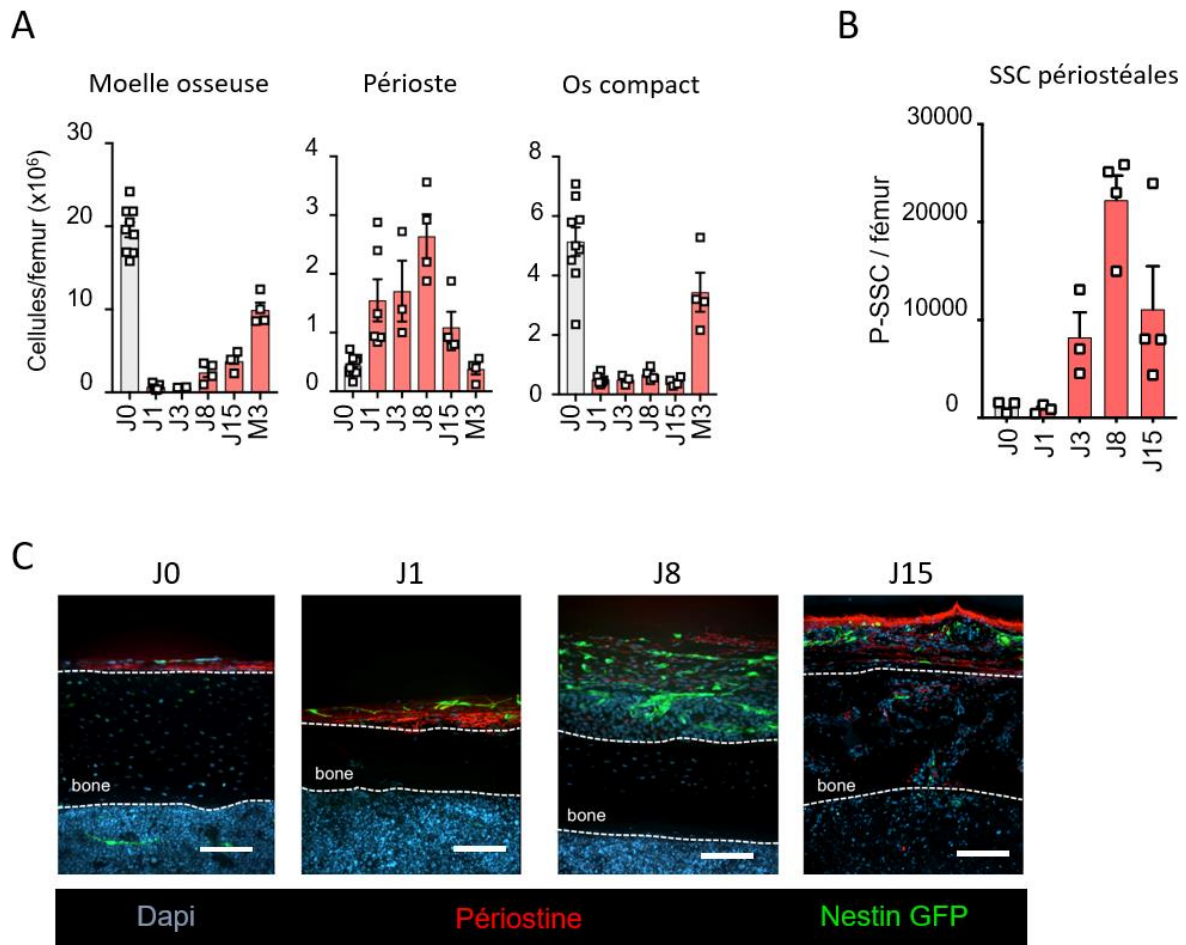


Figure 18

FIGURE 18 : La greffe est suivie d'une expansion des cellules stromales du périoste (P-SSC). (A) Quantification par cytométrie en flux de la cellularité totale de la moelle osseuse, du périoste et de l'os compact à différents temps après la greffe. N= 3 – 9 par temps analysé (B) Quantification des cellules stromales du périoste définies par le phénotype CD45^{neg}Ter119^{neg}CD31^{neg}CD51^{pos}CD200^{pos} à différents temps après la greffe. N= 3 – 4 par temps analysé (C) Images représentatives de microscopie confocale objectivant l'expansion des cellules stromales Nestin-GFP^{pos} au sein du périoste marqué par un anticorps anti-périostine. Barre d'échelle : 100µm. Les données sont représentée en mean ± SEM. N= 3.

C. Les cellules du périoste ont la capacité de migrer dans la cavité médullaire et de contribuer à la reconstitution hématopoïétique

L'expansion des P-SSC parallèlement à la disparition complète des cellules stromales médullaires nous a amené à émettre l'hypothèse d'un possible rôle des cellules du périoste

dans la régénération médullaire. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons tiré avantage des souris *ubc-eGFP* chez lesquelles toutes les cellules expriment le rapporteur GFP. Nous avons transplanté dans une souris WT, un fémur WT sur lequel nous avons préalablement retiré le périoste endogène et greffé un fragment de périoste issu de fémurs de souris *ubc-eGFP* (**Figure 19A**). L'analyse par imagerie confocale du greffon un mois après la greffe révèle la migration de cellules eGFP positives dérivées du périoste exogène au sein de la cavité médullaire (**Figure 19B**). Ces cellules forment un réseau entourant les capillaires sinusoides marqués par un anticorps anti-endomucine. Comme précédemment décrit dans l'introduction en situation de fracture, les cellules eGFP sont également retrouvées au sein du tissu osseux, remplaçant les ostéocytes et ostéoblastes de l'os greffé. Le niveau d'expression des gènes *Cxcl12* et *Scf* par les BM-MSc GFP^{POS} originaires du périoste est comparable à celui des BM-MSc GFP^{NEG} et de BM-MSc Nestin-GFP^{POS} contrôles. Ce résultat contraste avec l'absence complète d'expression de ces cytokines de soutien par les P-SSC en situation physiologique (**Figure 19C**). Nous avons confirmé la migration des cellules P-SSC au sein de la moelle osseuse dans notre système en utilisant le modèle murin B6.129S-*Postn*^{tm2.1(cre/Esr1*)Jmol/J} noté *postn-Cre^{ER}* dans la suite du manuscrit (196). Ces souris transgéniques sont caractérisées par l'insertion du système Cre/loxP sous la dépendance du promoteur du gène *periostin*. Il s'agit d'une induction conditionnelle suite à l'exposition des cellules au tamoxifène. Le gène *periostin* est spécifiquement exprimé par les P-SSC au sein du périoste en situation physiologique et surexprimé dans un contexte de régénération osseuse après fracture (33, 197). Nous avons croisé ces souris avec des souris tdTomato afin de marquer les P-SSC et de conduire des études de *lineage-tracing*. A l'état basal, nous n'avons pas observé d'expression du rapporteur tdTomato au sein de la moelle osseuse à l'exception de quelques rares ostéoblastes. Nous avons greffé des fémurs de souris *postn-Cre^{ER};tdTomato* à des souris WT et exposé ces souris au tamoxifène dans les suites immédiates de la greffe afin d'induire l'expression du rapporteur tdTomato au sein des P-SSC. Cinq mois après la greffe, 80% des BM-MSc au sein du greffon expriment le marqueur tdTomato confirmant la contribution majeure des P-SSC dans la reconstitution du compartiment stromale au sein du greffon (**Figure 19D**).

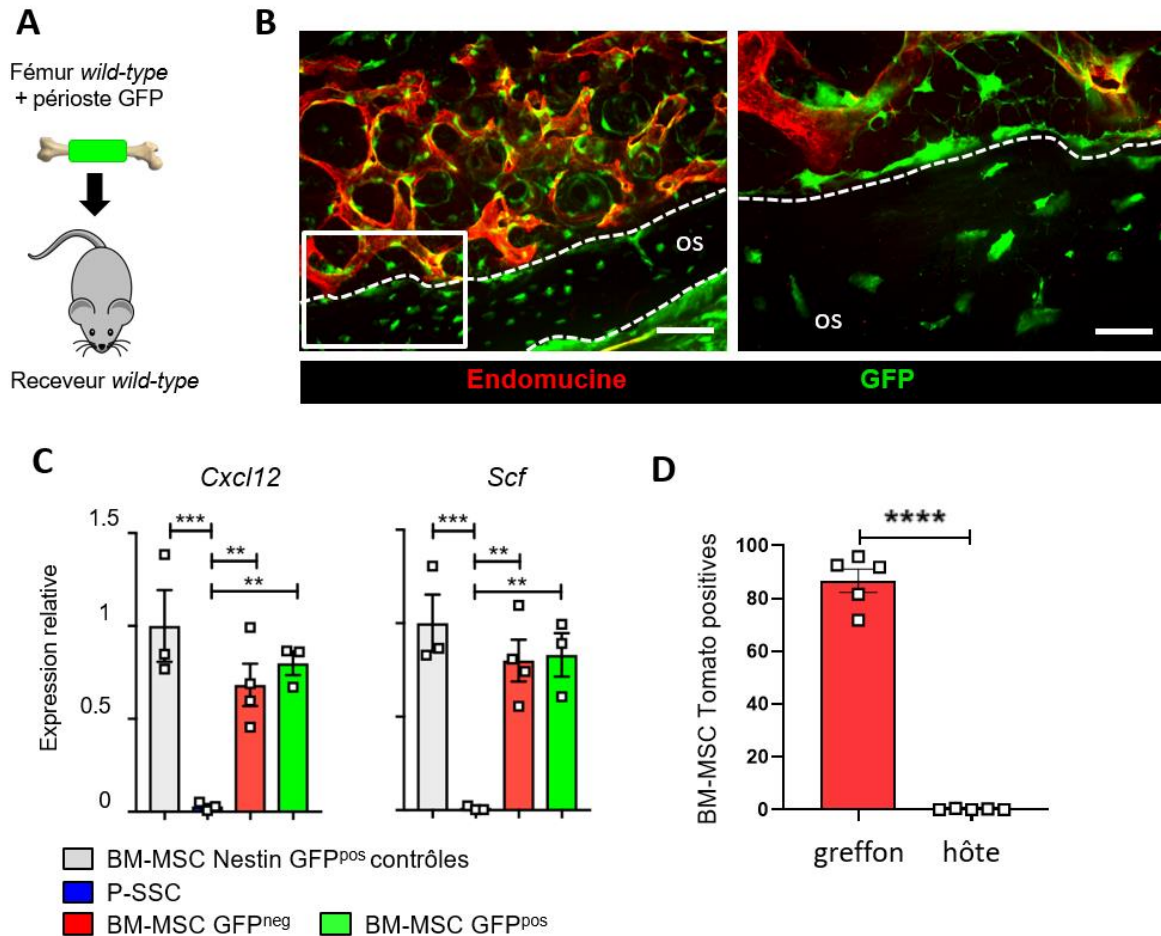


Figure 19

FIGURE 19 : Les P-SSC migrent dans la cavité médullaire où elles expriment les cytokines de soutien à l'hématopoïèse. (A) Illustration schématique de la greffe d'un fémur WT avec un périoste *ubc-eGFP* dans une souris WT. Le périoste prélevé chez une souris *ubc-eGFP* où l'ensemble des cellules expriment le rapporteur *eGFP* est suturé à la surface d'un fémur prélevé chez une souris WT sur lequel le périoste endogène a préalablement été retiré. Le greffon chimérique est ensuite greffé à une souris WT. Dans ce modèle, seules les cellules issues du périoste expriment le rapporteur *eGFP*. (B) Images représentatives de microscopie confocale d'un fémur WT greffé avec un périoste *ubc-eGFP* 5 mois après la greffe. Mise en évidence d'un réseau de cellules stromales intramédullaires *eGFP^{pos}* entourant les vaisseaux marqués par un anticorps anti-endomucine. On note le remplacement des ostéocytes et ostéoblastes par des cellules *eGFP^{pos}* issues du greffon périostéale. Barres d'échelle : 50µm sur image de gauche et 20µm sur l'image de droite. (C) Quantification de l'expression relative des gènes *Cxcl12* et *Scf* par des cellules stromales Nestin-GFP contrôles, des P-SSC et les BM-MSCs du greffon *GFP^{pos}* et *GFP^{neg}* 5 mois après la greffe. (D) Quantification du pourcentage de BM-MSCs exprimant le rapporteur Tomato au sein d'un fémur *postn-Cre^{ER};tdTomato* greffé à une souris WT 5 mois après la greffe. Les données sont représentée en mean ± SEM. **p*<0.05. ** *p*<0,01. *** *p*<0,001

D. Les cellules du périoste ont un profil de résistance au stress différent des BM-MSC les protégeant du stress induit par la transplantation.

Le contraste entre la disparition des BM-MSC et l'expansion des P-SSC nous a amené à émettre l'hypothèse d'un profil métabolique spécifique protégeant les cellules du périoste du stress induit par la greffe. L'inflammation est associée à une augmentation importante des ROS, lesquels jouent un rôle crucial dans la réponse immune (198). De plus, il a été démontré, qu'un niveau élevé de ROS pouvait entraîner une entrée en apoptose et la senescence des MSCs (199). Nous avons donc émis l'hypothèse que les P-SSC étaient plus résistantes aux ROS que les BM-MSCs. Afin d'évaluer les capacités de résistance aux ROS des P-SSC, nous avons quantifié l'expression des principales enzymes anti-oxydantes sur des P-SSC et BM-MSC triées en situation physiologique. Nous avons observé une expression significativement plus importante de la super-oxyde dismutase 1 (*Sod1*), de la glutathione peroxidase (*Gpx1*) et de la glutaminase (*Gls*) par les P-SSC en comparaison avec les BM-MSC (**Figure 20A**). Cette expression augmentée des enzymes anti-oxydantes suggère une capacité augmentée des P-SSC à répondre à un stress oxydatif. Concordant avec ces résultats, les P-SSC ont des niveaux de ROS cellulaires et mitochondriaux plus faibles que les BM-MSC (**Figure 20B**). Sur le plan métabolique, les cellules quiescentes sont habituellement caractérisées par un métabolisme glycolytique, de faibles niveaux de ROS intracellulaires et mitochondriaux. Nous avons émis l'hypothèse que les P-SSC présentaient un niveau de quiescence plus élevé que les BM-MSC en situation physiologique. Les BM-MSC étant majoritairement en phase G0, nous n'avons pas observé de différence significative lors de l'analyse comparative du cycle cellulaire des BM-MC et des P-SSC. Néanmoins, en comparaison avec les BM-MSC, les P-SSC expriment plus faiblement la kinase dépendante de la cycline *Cdk4* associée à une activité de prolifération et plus faiblement les kinases dépendantes des cyclines *Cdkn1a* et *Cdkn1c* associées à une inhibition du cycle cellulaire (**Figure 20C**). La faible activité mitotique est confortée par une consommation de glucose plus faible par les P-SSC en comparaison au BM-MSC (**Figure 20D**).

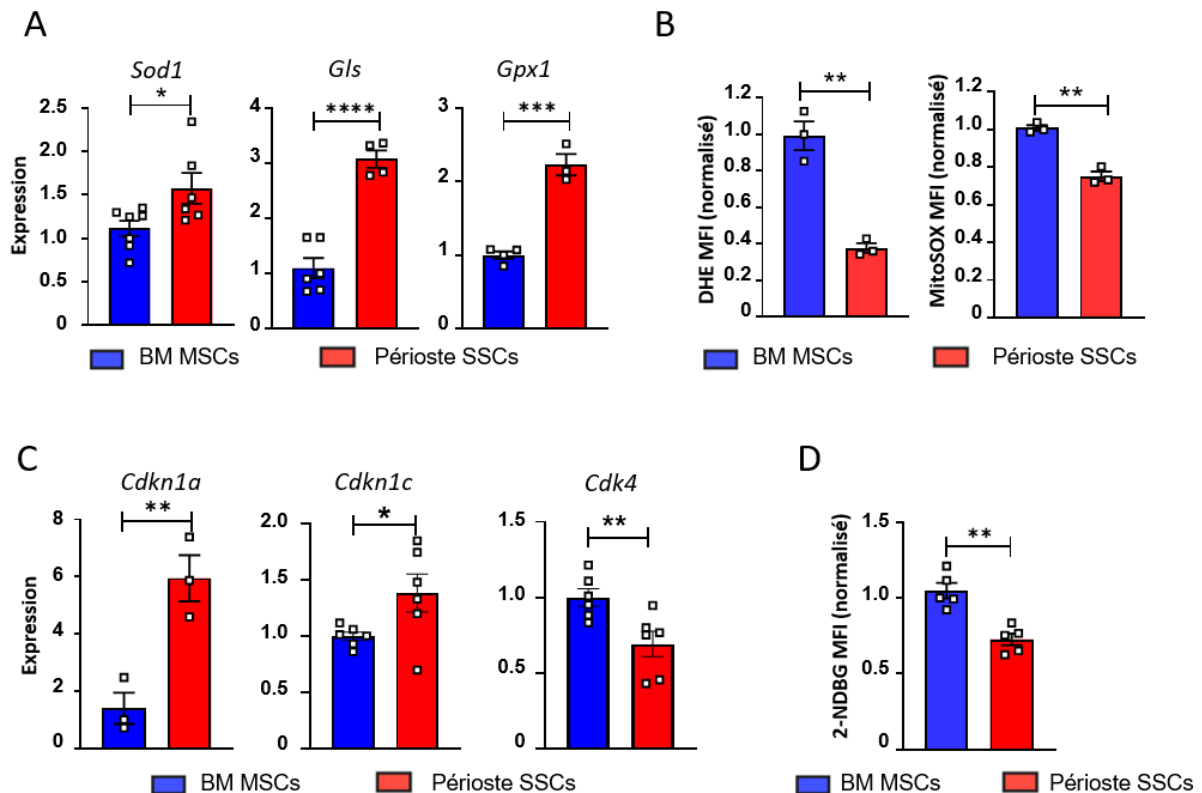


Figure 20

FIGURE 20: Les P-SSC ont un profil métabolique différent des BM-MSC. (A) Comparaison de l'expression relative des enzymes superoxyde dismutase (*Sod1*), glutaminase (*Gls*) et glutathione peroxydase (*Gpx1*) entre les P-SSC et BM-MSC. (N = 3 – 6 par groupe) (B) Quantification des ROS cellulaires (graphique de gauche) et mitochondriaux (graphique de droite) par les P-SSC et BM-MSC. N = 3 (C) Comparaison de l'expression des kinases dépendantes des cyclines *Cdkn1a*, *Cdkn1c* et *Cdk4*. N = 3 - 6 (D) Analyse de la consommation de glucose par les BM-MSC et P-SSC N =5 par groupe. Expression relative par rapport au gène *Gapdh*. Les données sont représentée en mean \pm SEM. * $p < 0.05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$

Afin de comparer la résistance au stress des BM-MSC et P-SSC dans des conditions standardisées, nous les avons mis en culture pendant 12h en hypoxie (1% O₂) dans un milieu sans sérum. Nous avons observé un niveau d'apoptose significativement plus élevé des BM-MSC par rapport aux P-SSC (Figure 21A et 21B).

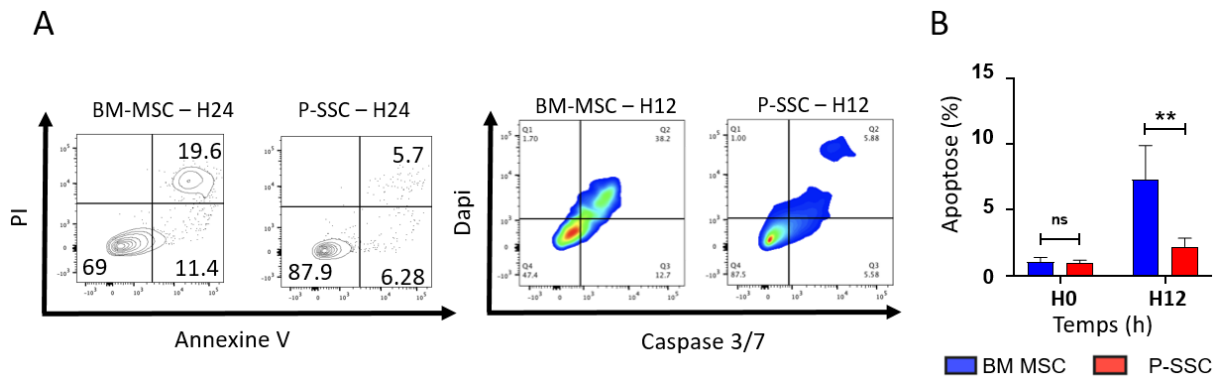


Figure 21

FIGURE 21: Les BM-MSC sont plus sensibles au stress que les P-SSC. (A) Graphiques de cytométrie en flux représentatifs de l'analyse d'apoptose des cellules stromales $CD45^{neg}Ter119^{neg}CD31^{neg}CD51^{pos}CD200^{pos}$. (B) Quantification de l'apoptose des BM-MSC et P-SSC en culture à l'état basal et après 12 heures en hypoxie dans un milieu sans sérum.

En conclusion, les cellules stromales du périoste ont un profil métabolique évocateur d'une importante quiescence avec un faible niveau de ROS conséquence d'une forte expression des enzymes anti-oxydantes et d'une activité mitotique faible en l'absence de stress. Ce statut métabolique pourrait expliquer une plus grande résistance des P-SSC aux situations de stress comme la déprivation en sérum et l'hypoxie.

CHAPITRE IV

CONCLUSION ET DISCUSSION

IV. Conclusion et discussion

Au cours de ce travail, nous avons caractérisé un modèle d'étude de la régénération de la niche hématopoïétique reposant sur la greffe en sous cutanée d'un fémur entier. Après une phase de nécrose des cellules présentes au sein de la cavité médullaire, nous avons observé une régénération de la niche hématopoïétique avec la réapparition d'un réseau vasculaire permettant la colonisation du greffon par les cellules hématopoïétiques de l'hôte. Sur le plan du compartiment stromale, nous avons mis en évidence la réapparition d'un réseau de cellules stromales péri-vasculaires, originaires du fémur greffé et exprimant les cytokines de soutien à l'hématopoïèse. L'analyse morphologique du greffon suggère la réapparition d'une niche présentant de nombreuses similitudes avec la niche hématopoïétique médullaire normale.

Nous avons dans un second temps tiré parti du caractère intense du stress appliqué au fémur greffé pour identifier les cellules stromales résistantes, impliquées dans la régénération et supposées situées en haut de la hiérarchie sur un plan ontogénique. De manière inattendu, nous avons observé une expansion rapide et majeure des cellules stromales du périoste dans les suites immédiates de la greffe. Cette expansion contraste avec la destruction concomitante de la moelle osseuse. Sachant que les cellules stromales observées dans la moelle osseuse sont issues du greffon dans notre système, nous avons émis l'hypothèse que les cellules stromales du périoste contribuaient à la régénération du stroma médullaire. Nous avons confirmé cette hypothèse par deux approches : (1) l'utilisation d'un greffon chimérique périoste-eGFP/fémur WT, (2) un modèle transgénique dans lequel l'expression du rapporteur tdTomato est sous la dépendance du promoteur du gène *periostin* exprimé dans les P-SSC suite à leur activation notamment en situation de fracture osseuse (33). Alors que les P-SSC n'expriment pas les cytokines de soutien à l'hématopoïèse en situation orthotopique, nous avons démontré que cette expression était induite suite à leur migration dans la cavité médullaire suggérant l'acquisition d'une capacité à soutenir l'hématopoïèse. De plus, en tirant parti du modèle transgénique *Postn-Cre ;tdtomato*, nous avons démontré que plus de 80% des BM-MSC analysées 5 mois après la greffe ont pour origine le périoste. Le contraste entre l'expansion rapide et majeure des P-SSC parallèlement à la disparition des BM-MSC au sein du greffon soulève la problématique de la résistance au stress. Nous avons émis l'hypothèse que

les P-SSC étaient mieux armées pour résister à l'hypoxie initiale et au stress oxydatif secondaire à l'inflammation générée par la procédure de greffe. Nous avons observé des différences en terme de profils métaboliques entre les P-SSC et les BM-MSC avec un taux de ROS plus faibles dans les P-SSC associé à une expression plus importante des enzymes aux fonctions anti-oxydantes. Nous avons par ailleurs retrouvé une expression plus importantes de gènes codant pour des enzymes impliquées dans l'inhibition du cycle cellulaire. L'ensemble de ces données suggèrent que les P-SSC sont caractérisée par un état de quiescence pouvant contribuer à leur résistance au stress.

Plusieurs points de discussion et limites de notre étude méritent d'être abordés.

A. Différences et similitudes entre la niche hématopoïétique normale et notre modèle.

Pour l'ensemble de nos analyses, nous avons comparé les fémurs greffés avec les fémurs de l'hôte permettant d'éliminer de possibles différences imputables à une différence d'âge de la niche, la plupart des analyses étant réalisées 5 mois après la greffe. Il est en effet clairement démontré que l'âge est associé à un remodelage profond de la niche hématopoïétique (13, 69, 118, 200-204). Ainsi, les fémurs greffés étaient systématiquement prélevés sur des souris de sexe et d'âge identiques au receveur.

L'hématopoïèse au sein du greffon est la conséquence d'une colonisation de celui-ci par les CSH de l'hôte et se déroule au sein d'une niche stromale dérivée du greffon réalisant ainsi un système chimérique. Afin de valider la pertinence de notre modèle, nous avons analysé différents paramètres en lien avec l'hématopoïèse. Nous n'avons pas observé de différence quantitative significative concernant les progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes entre l'hôte et le greffon. De même, en dehors d'un léger excès de lymphocyte T CD8^{pos} au sein du greffon, il n'existe pas de différence notable sur le plan des principales populations de cellules immunes. Néanmoins, le nombre de cellules souches hématopoïétiques reste inférieur dans le greffon 5 mois après la greffe en comparaison au fémur de l'hôte. Le nombre de CSH en cycle est également plus important dans le greffon pouvant suggérer qu'un délai supplémentaire soit nécessaire pour atteindre un équilibre. L'augmentation de l'activité

mitotique pourrait également être la conséquence d'un défaut d'innervation sympathique de manière similaire à ce qui est observé durant le vieillissement de la niche (69). Néanmoins, le vieillissement est habituellement associé à une augmentation du nombre de CSH, conséquence de leur forte activité mitotique. Pour évaluer, la fonction des CSH, il serait également important de valider la capacité de reconstitution hématopoïétique des CSH issues du greffon dans un système de greffes itératives, validant leur capacité d'autorenouveaulement (205, 206). Ces études sont actuellement en cours au laboratoire. Le vieillissement est également associé à une augmentation des dommages de l'ADN et une perte de polarité des CSH (207-209). L'analyse de ces paramètres apporterait des informations importantes sur un éventuel vieillissement prématuré de la niche hématopoïétique dans notre modèle.

Sur le plan du compartiment stromale médullaire, en utilisant le marqueur validé Nestin pour isoler les BM-MSCs (7, 56, 95, 165), nous n'avons pas observé de différence quantitative entre le greffon et l'hôte 5 mois après la greffe. De même, nous n'avons pas retrouvé d'altération dans l'expression des principales cytokines de soutien à l'hématopoïèse ni dans l'activité CFU-F. Nous avons également confirmé la capacité des BM-MSCs isolées à partir du greffon à se différencier en chondrocytes, adipocytes et ostéoblastes. Nos analyses quantitatives ont principalement reposé sur l'utilisation des marqueurs Nestin, CD51, CD140a et CD200 (95, 165, 168). Les récentes études basées sur des analyses en sc-RNAseq ont confirmé l'importante hétérogénéité des cellules non-hématopoïétiques au sein de la niche (41, 43, 45, 123, 160, 210). Afin de caractériser précisément le compartiment stromale dans notre modèle et de le comparer à la composition d'une niche physiologique, de telles approches seraient pertinentes.

La vascularisation joue un rôle central dans la régulation de l'hématopoïèse en situation physiologique et la plupart des CSH sont situées à proximité des vaisseaux sanguins (53, 56). De plus les cellules endothéliales expriment différents facteurs impliqués dans la régulation des CSH (7, 10, 54, 55, 65). Le réseau vasculaire est composé d'artérioles connectées aux capillaires sinusoides *via* des capillaires de transition ou type H (9, 12, 211). Après une phase de destruction des vaisseaux sanguins, le greffon est le siège d'une néo vascularisation débutant environ 15 jours après la greffe. Une fois la phase de régénération terminée, l'analyse morphologique du greffon retrouve la présence de structures vasculaires similaires à celles retrouvées dans la niche physiologique. Néanmoins, nous avons observé

une augmentation du nombre de cellules endothéliales sinusoidales associée à une baisse du nombre des cellules endothéliales artériolaires. Ces anomalies pourraient être la conséquence de l'absence d'innervation sympathique comme observé au cours du vieillissement (69). Il est également possible que les progéniteurs endothéliaux soient affectés par le stress différemment. L'origine des cellules endothéliales dans la moelle osseuse n'est pas clairement identifiée à ce jour. Il a récemment été démontré que les cellules endothéliales artériolaires étaient capables de former de nouvelles artérioles après un traitement par 5-fluoro-uracile mais incapables de former des capillaires sinusoides suggérant l'existence de progéniteurs distincts en fonction de la nature des vaisseaux (10). Alors que les cellules hématopoïétiques dérivent de l'hôte et les cellules stromales du greffon, nous avons observé de manière surprenante une participation mixte de l'hôte et du greffon dans la régénération de la vascularisation. Notre modèle apparaît comme particulièrement intéressant pour étudier les progéniteurs endothéliaux avec la possibilité d'utiliser des souris transgéniques comme les $Bmx-Cre^{ERT2}$ permettant de marquer les cellules artériolaires (212).

L'absence d'innervation est une différence significative avec la niche physiologique et comme précisé ci-dessus, plusieurs anomalies pourraient être secondaires à ce défaut d'innervation sympathique. En plus de l'effet sur le réseau vasculaire et les cellules souches, l'absence d'innervation pourrait avoir un impact sur le remodelage osseux (3). Nous avons souhaité nous focaliser sur la niche hématopoïétique et avons donc peu étudié le tissu osseux dans notre système. Des analyses complémentaires seront nécessaires pour préciser dans quelle mesure l'os compact et la niche endostéale se régénèrent dans notre modèle.

B. Avantages et limites du modèle pour l'étude de la régénération médullaire.

Plus qu'un modèle permettant d'étudier la niche hématopoïétique, notre système offre avant tout la possibilité d'étudier les processus de régénération. De manière intéressante, ce modèle induit une régénération présentant des similitudes avec ce qui est observé après chimiothérapie ou exposition aux radiations ionisantes. On observe ainsi une expansion initiale des adipocytes progressivement remplacés par le tissu hématopoïétique.

De même, la reconstitution hématopoïétique fait suite à la régénération du réseau vasculaire. Ce modèle offre la possibilité de soumettre les différentes populations cellulaires du greffon à un niveau d'hypoxie qui ne pourrait être atteint *in-vivo*. Il apporte également un niveau de complexité supérieur aux expériences d'hypoxie menées sur cultures cellulaires. Ce stress, intense, nous a permis d'identifier les P-SSC comme possibles cellules contribuant à la régénération de la niche hématopoïétique. Ce caractère extrême et très artificielle du stress induit représente à la fois une force et une faiblesse de notre modèle. La question de la pertinence des observations réalisées lors de notre travail en situation physiologique reste entière. Il est en effet difficile de déterminer dans quelle mesure les P-SSC contribuent au renouvellement des cellules stromales médullaires en situation physiologique, et à la régénération après chimiothérapie ou exposition aux radiations ionisantes. Il n'existe pas de modèle murin disponible permettant un marquage spécifique des P-SSC. La faible expression du gène *periostin* en l'absence d'agression rend difficile l'utilisation des souris Post-Cre ;tdTomato en dehors de la greffe et de l'étude des fractures. L'administration de tamoxifène en situation physiologique entraîne en effet uniquement le marquage de rares P-SSC limitant les possibilités de *lineage-tracing*. Nous n'avons par ailleurs pas réussi à obtenir de résultats probants dans un modèle d'irradiation. En conclusion, l'utilisation de souris Postn-Cre^{ER} ;tdTomato nous a permis d'apporter la preuve de concept de l'importante plasticité des P-SSC mais ne permet pas de répondre à la question de l'existence de telles migrations en dehors du modèle de greffe de fémur.

C. Caractérisation des P-SSC impliquées dans la régénération de la niche hématopoïétique: choix du modèle et prise en compte de l'hétérogénéité stromale.

Contrairement aux BM-MSK où de nombreux marqueurs phénotypiques et modèles murins transgéniques sont disponibles, l'étude des P-SSC *in-vivo* a longtemps été freinée par l'absence de marqueur spécifique. L'équipe du Dr Céline Colnot a mis en évidence, en utilisant un modèle murin Prx1-Cre, l'importance du gène *postn* dans la régulation de la fonction des P-SSC et la régénération osseuse après fracture (33, 197). Ainsi, chez la souris, le gène *postn*

est fortement et spécifiquement surexprimé par les P-SSC dans les suites immédiates d'une fracture (J3). De plus la greffe d'un périoste prélevé sur une souris *periostin*-KO ne permet pas la consolidation d'une fracture contrairement à celle d'un périoste contrôle. Nous avons tiré parti de cette observation et de la disponibilité du modèle murin *postn*-Cre^{ER} récemment développé pour l'étude des fibroblastes myocardiques pour marquer les P-SSC (196). Comme décrit dans la littérature, nous avons observé en situation physiologique, un marquage restreint au périoste avec l'absence de cellules marquées au sein de la cavité médullaire à l'exception de rares ostéoblastes (186, 213). Nous avons également observé une nette expansion des cellules *Postn*-tdTomato^{pos} dans les suites d'une fracture et dans notre modèle de greffe supportant l'utilisation de ce modèle murin pour nos expériences de *lineage-tracing*. Nous ne pouvons néanmoins formellement éliminer l'expression du gène *postn* par une population de cellules stromales minoritaires non périostéales. Le gène *postn* est en effet surexprimé par des cellules fibroblastiques en situations inflammatoire et tumorale (197, 214-217). Cette expression en dehors du périoste semble néanmoins marginale dans notre modèle comme en témoigne l'absence de signal tdTomato au sein de la cavité médullaire 8 jours après la greffe.

L'équipe de Matthew Greenblatt a récemment identifié une population de SSC au sein du périoste caractérisée par l'expression de la cathepsine K (CTSK), connue pour être habituellement exprimée dans les ostéoclastes. En utilisant un modèle murin *CTSK*-Cre ; *mT/mG*, les auteurs ont montré que les cellules marquées correspondaient à des cellules stromales multipotentes impliquées dans la consolidation osseuse après fracture mais pas dans le support de l'hématopoïèse (168). Il serait intéressant de comparer les cellules *CTSK*^{pos} et la population identifiée dans notre modèle.

Notre travail montre la capacité des P-SSC à générer des BM-MSCs *in-vivo*. De récents travaux ont démontré que les BM-MSCs et les P-SSC partageaient une origine commune (33). De plus, un certain nombre de marqueurs phénotypiques est partagé comme le PDGFR α , Gremlin1, Nestin et Ng2 (33, 56, 95, 114, 165). La possibilité que des BM-MSCs dériveraient de SSC provenant de l'os compact et du périoste a également été récemment suggéré avec la mise en évidence de population stromales exprimant la podoplanine situées dans le périoste et morphologiquement proches des BM-MSCs (41). De manière intéressante, nous avons observé une hyperexpression du gène osteopontine (*Opn*) par les BM-MSCs issues du périoste

par rapport à des BM-MSC contrôle dans notre expérience basée sur la greffe de périoste UBC-GFP. Cette hyperexpression pourrait traduire la persistance d'une signature spécifique témoignant de l'origine de ces cellules stromales. Des analyses en RNAseq comparant les BM-MSC issues du périoste après greffe, les P-SSC et des BM-MSC contrôle en situation d'homéostasie sont en cours afin de préciser les similitudes mais également les différences entre ces différentes populations. Ces analyses nous permettront également de préciser les différences sur le plan métabolique entre les BM-MSC et P-SSC. Il serait également intéressant de conduire des analyses en sc-RNA seq pour préciser les liens phylogéniques entre ces différentes populations.

Les mécanismes et processus impliqués dans la migration des P-SSC au sein de la moelle osseuse restent également à préciser. Nos données d'imagerie préliminaires suggèrent que les P-SSC pénètrent au sein de la cavité médullaire en longeant les vaisseaux sanguins nouvellement formés. L'expression de chimiokines comme Cxcl12 ou de facteurs secrétés suite au stress induit dans la cavité médullaire pourraient contribuer à attirer les P-SSC. Nous avons isolé les P-SSC du greffon 72 heures après la greffe et comparons actuellement le profil transcriptomique de ces cellules avec des BM-MSC et P-SSC contrôles (analyse de RNA-seq en cours). Nous espérons ainsi identifier des facteurs impliqués dans la survie et potentiellement l'activation et migration des P-SSC au sein du greffon.

D. CONCLUSION

En conclusion nous avons caractérisé précisément un modèle de régénération de la niche hématopoïétique. Notre modèle récapitule les grandes étapes observées dans des situations de stress comme l'administration de chimiothérapies ou de radiations ionisantes. Malgré, quelques différences avec la niche physiologique, nous avons observé la réapparition d'un réseau de cellules stromales issues du greffon et capables de soutenir l'hématopoïèse. Le stress extrême appliqué sur le greffon nous a permis d'identifier les rares cellules stromales résistantes à la procédure de greffe et capables de reconstituer une niche fonctionnelle. Bien que très artificielle, ce modèle nous a permis de démontrer la capacité des P-SSC à migrer dans la moelle osseuse, et après modification de leur profil d'expression génique, de soutenir

l'hématopoïèse. Des analyses complémentaires devront préciser les populations de P-SSC impliquées dans la régénération et les mécanismes permettant la résistance de ces cellules au stress. Ce travail révèle une capacité nouvelle des P-SSC et confirme l'importante plasticité des cellules stromales mésenchymateuses.

V. REFERENCES

1. Pinho S, Frenette PS. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(5):303-20.
2. Chanavaz M. Anatomy and histophysiology of the periosteum: quantification of the periosteal blood supply to the adjacent bone with ⁸⁵Sr and gamma spectrometry. *J Oral Implantol.* 1995;21(3):214-9.
3. Maryanovich M, Takeishi S, Frenette PS. Neural Regulation of Bone and Bone Marrow. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(9).
4. Colnot C, Zhang X, Knothe Tate ML. Current insights on the regenerative potential of the periosteum: molecular, cellular, and endogenous engineering approaches. *J Orthop Res.* 2012;30(12):1869-78.
5. Tomlinson RE, Silva MJ. Skeletal Blood Flow in Bone Repair and Maintenance. *Bone Res.* 2013;1(4):311-22.
6. Comazzetto S, Shen B, Morrison SJ. Niches that regulate stem cells and hematopoiesis in adult bone marrow. *Dev Cell.* 2021;56(13):1848-60.
7. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature.* 2012;481(7382):457-62.
8. Gori JL, Butler JM, Chan YY, Chandrasekaran D, Poulos MG, Ginsberg M, et al. Vascular niche promotes hematopoietic multipotent progenitor formation from pluripotent stem cells. *J Clin Invest.* 2015;125(3):1243-54.
9. Itkin T, Gur-Cohen S, Spencer JA, Schajnovitz A, Ramasamy SK, Kusumbe AP, et al. Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature.* 2016;532(7599):323-8.
10. Xu C, Gao X, Wei Q, Nakahara F, Zimmerman SE, Mar J, et al. Stem cell factor is selectively secreted by arterial endothelial cells in bone marrow. *Nat Commun.* 2018;9(1):2449.
11. Grüneboom A, Hawwari I, Weidner D, Culemann S, Müller S, Henneberg S, et al. A network of trans-cortical capillaries as mainstay for blood circulation in long bones. *Nature Metabolism.* 2019;1(2):236-50.
12. Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature.* 2014;507(7492):323-8.
13. Kusumbe AP, Ramasamy SK, Itkin T, Mae MA, Langen UH, Betsholtz C, et al. Age-dependent modulation of vascular niches for haematopoietic stem cells. *Nature.* 2016;532(7599):380-4.
14. Langen UH, Pitulescu ME, Kim JM, Enriquez-Gasca R, Sivaraj KK, Kusumbe AP, et al. Cell-matrix signals specify bone endothelial cells during developmental osteogenesis. *Nat Cell Biol.* 2017;19(3):189-201.
15. Long F, Ornitz DM. Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(1):a008334.
16. Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. Genetic control of bone formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009;25:629-48.

17. Koziel L, Kunath M, Kelly OG, Vortkamp A. Ext1-dependent heparan sulfate regulates the range of Ihh signaling during endochondral ossification. *Dev Cell*. 2004;6(6):801-13.
18. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*. 2003;423(6937):332-6.
19. Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet*. 1999;22(1):85-9.
20. Ornitz DM. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays*. 2000;22(2):108-12.
21. Settembre C, Arteaga-Solis E, McKee MD, de Pablo R, Al Awqati Q, Ballabio A, et al. Proteoglycan desulfation determines the efficiency of chondrocyte autophagy and the extent of FGF signaling during endochondral ossification. *Genes Dev*. 2008;22(19):2645-50.
22. Linsenmayer TF, Chen QA, Gibney E, Gordon MK, Marchant JK, Mayne R, et al. Collagen types IX and X in the developing chick tibiotarsus: analyses of mRNAs and proteins. *Development*. 1991;111(1):191-6.
23. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997;89(5):747-54.
24. Maes C, Kobayashi T, Selig MK, Torrekens S, Roth SI, Mackem S, et al. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell*. 2010;19(2):329-44.
25. Colnot C, Lu C, Hu D, Helms JA. Distinguishing the contributions of the perichondrium, cartilage, and vascular endothelium to skeletal development. *Dev Biol*. 2004;269(1):55-69.
26. Yang L, Tsang KY, Tang HC, Chan D, Cheah KS. Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(33):12097-102.
27. Ono N, Ono W, Nagasawa T, Kronenberg HM. A subset of chondrogenic cells provides early mesenchymal progenitors in growing bones. *Nat Cell Biol*. 2014;16(12):1157-67.
28. Zhou X, von der Mark K, Henry S, Norton W, Adams H, de Crombrughe B. Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during development, postnatal growth and fracture healing in mice. *PLoS Genet*. 2014;10(12):e1004820.
29. Franz-Odenaal TA. Induction and patterning of intramembranous bone. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011;16:2734-46.
30. Berendsen AD, Olsen BR. Bone development. *Bone*. 2015;80:14-8.
31. Foolen J, van Donkelaar C, Nowlan N, Murphy P, Huijkes R, Ito K. Collagen orientation in periosteum and perichondrium is aligned with preferential directions of tissue growth. *J Orthop Res*. 2008;26(9):1263-8.
32. Olivos-Meza A, Fitzsimmons JS, Casper ME, Chen Q, An KN, Ruesink TJ, et al. Pretreatment of periosteum with TGF-beta1 in situ enhances the quality of osteochondral tissue regenerated from transplanted periosteal grafts in adult rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(9):1183-91.
33. Duchamp de Lageneste O, Julien A, Abou-Khalil R, Frangi G, Carvalho C, Cagnard N, et al. Periosteum contains skeletal stem cells with high bone regenerative potential controlled by Periostin. *Nat Commun*. 2018;9(1):773.
34. Lou Y, Wang H, Ye G, Li Y, Liu C, Yu M, et al. Periosteal Tissue Engineering: Current Developments and Perspectives. *Adv Healthc Mater*. 2021;10(12):e2100215.
35. Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI. Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *J Orthop Res*. 1991;9(4):465-76.
36. Bakker AD, Schrooten J, van Cleynenbreugel T, Vanlauwe J, Luyten J, Schepers E, et al. Quantitative screening of engineered implants in a long bone defect model in rabbits. *Tissue Eng Part C Methods*. 2008;14(3):251-60.
37. Perka C, Schultz O, Spitzer RS, Lindenhayn K, Burmester GR, Sittinger M. Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits. *Biomaterials*. 2000;21(11):1145-53.

38. Redlich A, Perka C, Schultz O, Spitzer R, Häupl T, Burmester GR, et al. Bone engineering on the basis of periosteal cells cultured in polymer fleeces. *J Mater Sci Mater Med.* 1999;10(12):767-72.
39. Sakata Y, Ueno T, Kagawa T, Kanou M, Fujii T, Yamachika E, et al. Osteogenic potential of cultured human periosteum-derived cells - a pilot study of human cell transplantation into a rat calvarial defect model. *J Craniomaxillofac Surg.* 2006;34(8):461-5.
40. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells.* 1978;4(1-2):7-25.
41. Baccin C, Al-Sabah J, Velten L, Helbling PM, Grünschläger F, Hernández-Malmierca P, et al. Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization. *Nature Cell Biology.* 2020;22(1):38-48.
42. Wolock SL, Krishnan I, Tenen DE, Matkins V, Camacho V, Patel S, et al. Mapping Distinct Bone Marrow Niche Populations and Their Differentiation Paths. *Cell Reports.* 2019;28(2):302-11.e5.
43. Tikhonova AN, Dolgalev I, Hu H, Sivaraj KK, Hoxha E, Cuesta-Dominguez A, et al. The bone marrow microenvironment at single-cell resolution. *Nature.* 2019;569(7755):222-8.
44. Severe N, Karabacak NM, Gustafsson K, Baryawno N, Courties G, Kfoury Y, et al. Stress-Induced Changes in Bone Marrow Stromal Cell Populations Revealed through Single-Cell Protein Expression Mapping. *Cell Stem Cell.* 2019;25(4):570-83 e7.
45. Baryawno N, Przybylski D, Kowalczyk MS, Kfoury Y, Severe N, Gustafsson K, et al. A Cellular Taxonomy of the Bone Marrow Stroma in Homeostasis and Leukemia. *Cell.* 2019;177(7):1915-32 e16.
46. Ellis SL, Grassinger J, Jones A, Borg J, Camenisch T, Haylock D, et al. The relationship between bone, hemopoietic stem cells, and vasculature. *Blood.* 2011;118(6):1516-24.
47. Lord BI, Testa NG, Hendry JH. The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood.* 1975;46(1):65-72.
48. Gong JK. Endosteal marrow: a rich source of hematopoietic stem cells. *Science.* 1978;199(4336):1443-5.
49. Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood.* 2001;97(8):2293-9.
50. Taichman RS, Reilly MJ, Emerson SG. Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures. *Blood.* 1996;87(2):518-24.
51. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 2003;425(6960):841-6.
52. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 2003;425(6960):836-41.
53. Kiel MJ, Yilmaz ÖH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells. *Cell.* 2005;121(7):1109-21.
54. Greenbaum A, Hsu YM, Day RB, Schuettpelz LG, Christopher MJ, Borgerding JN, et al. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature.* 2013;495(7440):227-30.
55. Ding L, Morrison SJ. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature.* 2013;495(7440):231-5.
56. Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, Ahmed J, Pinho S, Zhang D, et al. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature.* 2013;502(7473):637-43.
57. Nombela-Arrieta C, Pivarnik G, Winkel B, Canty KJ, Harley B, Mahoney JE, et al. Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat Cell Biol.* 2013;15(5):533-43.
58. Lam BS, Cunningham C, Adams GB. Pharmacologic modulation of the calcium-sensing receptor enhances hematopoietic stem cell lodgment in the adult bone marrow. *Blood.* 2011;117(4):1167-75.
59. Adams GB, Chabner KT, Alley IR, Olson DP, Szczepiorkowski ZM, Poznansky MC, et al. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature.* 2006;439(7076):599-603.

60. Christodoulou C, Spencer JA, Yeh SA, Turcotte R, Kokkaliaris KD, Panero R, et al. Live-animal imaging of native haematopoietic stem and progenitor cells. *Nature*. 2020;578(7794):278-83.
61. Zehentmeier S, Pereira JP. Cell circuits and niches controlling B cell development. *Immunol Rev*. 2019;289(1):142-57.
62. Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature*. 2010;464(7290):852-7.
63. Zhu J, Garrett R, Jung Y, Zhang Y, Kim N, Wang J, et al. Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. *Blood*. 2007;109(9):3706-12.
64. Mourcin F, Breton C, Tellier J, Narang P, Chasson L, Jorquera A, et al. Galectin-1-expressing stromal cells constitute a specific niche for pre-BII cell development in mouse bone marrow. *Blood*. 2011;117(24):6552-61.
65. Acar M, Kocherlakota KS, Murphy MM, Peyer JG, Oguro H, Inra CN, et al. Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature*. 2015;526(7571):126-30.
66. Kokkaliaris KD, Kunz L, Cabezas-Wallscheid N, Christodoulou C, Renders S, Camargo F, et al. Adult blood stem cell localization reflects the abundance of reported bone marrow niche cell types and their combinations. *Blood*. 2020;136(20):2296-307.
67. Saçma M, Pospiech J, Bogeska R, De Back W, Mallm J-P, Sakk V, et al. Haematopoietic stem cells in perisinusoidal niches are protected from ageing. *Nature Cell Biology*. 2019;21(11):1309-20.
68. Asada N, Kunisaki Y, Pierce H, Wang Z, Fernandez NF, Birbrair A, et al. Differential cytokine contributions of perivascular haematopoietic stem cell niches. *Nat Cell Biol*. 2017;19(3):214-23.
69. Maryanovich M, Zahalka AH, Pierce H, Pinho S, Nakahara F, Asada N, et al. Adrenergic nerve degeneration in bone marrow drives aging of the hematopoietic stem cell niche. *Nat Med*. 2018;24(6):782-91.
70. Pinho S, Marchand T, Yang E, Wei Q, Nerlov C, Frenette PS. Lineage-Biased Hematopoietic Stem Cells Are Regulated by Distinct Niches. *Dev Cell*. 2018;44(5):634-41 e4.
71. Flidner TM, Bond VP, Cronkite EP. Structural, cytologic and autoradiographic (H3-thymidine) changes in the bone marrow following total body irradiation. *Am J Pathol*. 1961;38(5):599-623.
72. Li W, Johnson SA, Shelley WC, Yoder MC. Hematopoietic stem cell repopulating ability can be maintained in vitro by some primary endothelial cells. *Experimental Hematology*. 2004;32(12):1226-37.
73. Butler JM, Nolan DJ, Vertes EL, Varnum-Finney B, Kobayashi H, Hooper AT, et al. Endothelial Cells Are Essential for the Self-Renewal and Repopulation of Notch-Dependent Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2010;6(3):251-64.
74. Chute JP, Saini AA, Chute DJ, Wells MR, Clark WB, Harlan DM, et al. Ex vivo culture with human brain endothelial cells increases the SCID-repopulating capacity of adult human bone marrow. *Blood*. 2002;100(13):4433-9.
75. Calvo W. The innervation of the bone marrow in laboratory animals. *Am J Anat*. 1968;123(2):315-28.
76. Hanoun M, Maryanovich M, Arnal-Estape A, Frenette PS. Neural regulation of hematopoiesis, inflammation, and cancer. *Neuron*. 2015;86(2):360-73.
77. Bajayo A, Bar A, Denes A, Bachar M, Kram V, Attar-Namdar M, et al. Skeletal parasympathetic innervation communicates central IL-1 signals regulating bone mass accrual. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(38):15455-60.
78. Artico M, Bosco S, Cavallotti C, Agostinelli E, Giuliani-Piccari G, Sciorio S, et al. Noradrenergic and cholinergic innervation of the bone marrow. *Int J Mol Med*. 2002;10(1):77-80.
79. Bjurholm A, Kreicbergs A, Brodin E, Schultzberg M. Substance P- and CGRP-immunoreactive nerves in bone. *Peptides*. 1988;9(1):165-71.
80. Gao X, Zhang D, Xu C, Li H, Caron KM, Frenette PS. Nociceptive nerves regulate haematopoietic stem cell mobilization. *Nature*. 2021;589(7843):591-6.
81. Mach DB, Rogers SD, Sabino MC, Luger NM, Schwei MJ, Pomonis JD, et al. Origins of skeletal pain: sensory and sympathetic innervation of the mouse femur. *Neuroscience*. 2002;113(1):155-66.

82. Bellinger DL, Lorton D, Felten SY, Felten DL. Innervation of lymphoid organs and implications in development, aging, and autoimmunity. *Int J Immunopharmacol*. 1992;14(3):329-44.
83. Lai LP, Mitchell J. Beta2-adrenergic receptors expressed on murine chondrocytes stimulate cellular growth and inhibit the expression of Indian hedgehog and collagen type X. *J Cell Biochem*. 2008;104(2):545-53.
84. Aitken SJ, Landao-Bassonga E, Ralston SH, Idris AI. Beta2-adrenoreceptor ligands regulate osteoclast differentiation in vitro by direct and indirect mechanisms. *Arch Biochem Biophys*. 2009;482(1-2):96-103.
85. Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, et al. Leptin Regulates Bone Formation via the Sympathetic Nervous System. *Cell*. 2002;111(3):305-17.
86. Elefteriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, et al. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature*. 2005;434(7032):514-20.
87. Kajimura D, Hinoi E, Ferron M, Kode A, Riley KJ, Zhou B, et al. Genetic determination of the cellular basis of the sympathetic regulation of bone mass accrual. *J Exp Med*. 2011;208(4):841-51.
88. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*. 2000;100(2):197-207.
89. Yadav VK, Oury F, Suda N, Liu ZW, Gao XB, Confavreux C, et al. A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. *Cell*. 2009;138(5):976-89.
90. Shi Y, Oury F, Yadav VK, Wess J, Liu XS, Guo XE, et al. Signaling through the M(3) muscarinic receptor favors bone mass accrual by decreasing sympathetic activity. *Cell Metab*. 2010;11(3):231-8.
91. Offley SC, Guo TZ, Wei T, Clark JD, Vogel H, Lindsey DP, et al. Capsaicin-sensitive sensory neurons contribute to the maintenance of trabecular bone integrity. *J Bone Miner Res*. 2005;20(2):257-67.
92. Ishizuka K, Hirukawa K, Nakamura H, Togari A. Inhibitory effect of CGRP on osteoclast formation by mouse bone marrow cells treated with isoproterenol. *Neurosci Lett*. 2005;379(1):47-51.
93. Liang W, Zhuo X, Tang Z, Wei X, Li B. Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation and osteogenic differentiation of osteoporotic rat-derived bone mesenchymal stem cells. *Mol Cell Biochem*. 2015;402(1-2):101-10.
94. Wang L, Shi X, Zhao R, Halloran BP, Clark DJ, Jacobs CR, et al. Calcitonin-gene-related peptide stimulates stromal cell osteogenic differentiation and inhibits RANKL induced NF-kappaB activation, osteoclastogenesis and bone resorption. *Bone*. 2010;46(5):1369-79.
95. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829-34.
96. Yamazaki K, Allen TD. Ultrastructural morphometric study of efferent nerve terminals on murine bone marrow stromal cells, and the recognition of a novel anatomical unit: the "neuro-reticular complex". *Am J Anat*. 1990;187(3):261-76.
97. Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, et al. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell*. 2006;124(2):407-21.
98. Lucas D, Battista M, Shi PA, Isola L, Frenette PS. Mobilized hematopoietic stem cell yield depends on species-specific circadian timing. *Cell Stem Cell*. 2008;3(4):364-6.
99. Zhao Y, Liu M, Chan XY, Tan SY, Subramaniam S, Fan Y, et al. Uncovering the mystery of opposite circadian rhythms between mouse and human leukocytes in humanized mice. *Blood*. 2017;130(18):1995-2005.
100. Scheiermann C, Kunisaki Y, Lucas D, Chow A, Jang JE, Zhang D, et al. Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues. *Immunity*. 2012;37(2):290-301.
101. Mendez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature*. 2008;452(7186):442-7.
102. Mendez-Ferrer S, Battista M, Frenette PS. Cooperation of beta(2)- and beta(3)-adrenergic receptors in hematopoietic progenitor cell mobilization. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1192:139-44.

103. Chow A, Lucas D, Hidalgo A, Mendez-Ferrer S, Hashimoto D, Scheiermann C, et al. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med*. 2011;208(2):261-71.
104. Semerad CL, Christopher MJ, Liu F, Short B, Simmons PJ, Winkler I, et al. G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood*. 2005;106(9):3020-7.
105. Christopher MJ, Liu F, Hilton MJ, Long F, Link DC. Suppression of CXCL12 production by bone marrow osteoblasts is a common and critical pathway for cytokine-induced mobilization. *Blood*. 2009;114(7):1331-9.
106. Pierce H, Zhang D, Magnon C, Lucas D, Christin JR, Huggins M, et al. Cholinergic Signals from the CNS Regulate G-CSF-Mediated HSC Mobilization from Bone Marrow via a Glucocorticoid Signaling Relay. *Cell Stem Cell*. 2017;20(5):648-58.e4.
107. Garcia-Garcia A, Korn C, Garcia-Fernandez M, Domingues O, Villadiego J, Martin-Perez D, et al. Dual cholinergic signals regulate daily migration of hematopoietic stem cells and leukocytes. *Blood*. 2019;133(3):224-36.
108. Pierce H, Zhang D, Magnon C, Lucas D, Christin JR, Huggins M, et al. Cholinergic Signals from the CNS Regulate G-CSF-Mediated HSC Mobilization from Bone Marrow via a Glucocorticoid Signaling Relay. *Cell Stem Cell*. 2017;20(5):648-58 e4.
109. O'Leary HA. Timing's everything in light, location, and cells. *Blood*. 2019;133(3):186-7.
110. Park MH, Jin HK, Min WK, Lee WW, Lee JE, Akiyama H, et al. Neuropeptide Y regulates the hematopoietic stem cell microenvironment and prevents nerve injury in the bone marrow. *The EMBO Journal*. 2015;34(12):1648-60.
111. Lucas D, Scheiermann C, Chow A, Kunisaki Y, Bruns I, Barrick C, et al. Chemotherapy-induced bone marrow nerve injury impairs hematopoietic regeneration. *Nature Medicine*. 2013;19(6):695-703.
112. Mizoguchi T, Pinho S, Ahmed J, Kunisaki Y, Hanoun M, Mendelson A, et al. Osterix marks distinct waves of primitive and definitive stromal progenitors during bone marrow development. *Dev Cell*. 2014;29(3):340-9.
113. Park D, Spencer JA, Koh BI, Kobayashi T, Fujisaki J, Clemens TL, et al. Endogenous bone marrow MSCs are dynamic, fate-restricted participants in bone maintenance and regeneration. *Cell Stem Cell*. 2012;10(3):259-72.
114. Worthley DL, Churchill M, Compton JT, Taylor Y, Rao M, Si Y, et al. Gremlin 1 identifies a skeletal stem cell with bone, cartilage, and reticular stromal potential. *Cell*. 2015;160(1-2):269-84.
115. Zhou BO, Yu H, Yue R, Zhao Z, Rios JJ, Naveiras O, et al. Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF. *Nature Cell Biology*. 2017;19(8):891-903.
116. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, Daley GQ. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*. 2009;460(7252):259-63.
117. Zhu RJ, Wu MQ, Li ZJ, Zhang Y, Liu KY. Hematopoietic recovery following chemotherapy is improved by BADGE-induced inhibition of adipogenesis. *Int J Hematol*. 2013;97(1):58-72.
118. Ambrosi TH, Scialdone A, Graja A, Gohlke S, Jank AM, Bocian C, et al. Adipocyte Accumulation in the Bone Marrow during Obesity and Aging Impairs Stem Cell-Based Hematopoietic and Bone Regeneration. *Cell Stem Cell*. 2017;20(6):771-84 e6.
119. Yamazaki K, Allen TD. Ultrastructural and morphometric alterations in bone marrow stromal tissue after 7 Gy irradiation. *Blood Cells*. 1991;17(3):527-49.
120. Zhou BO, Yu H, Yue R, Zhao Z, Rios JJ, Naveiras O, et al. Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF. *Nat Cell Biol*. 2017;19(8):891-903.
121. Nishiwaki S, Nakayama T, Saito S, Mizuno H, Ozaki T, Takahashi Y, et al. Efficacy and safety of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for supporting hematopoiesis. *Int J Hematol*. 2012;96(3):295-300.
122. Shen B, Tasdogan A, Ubellacker JM, Zhang J, Nosyreva ED, Du L, et al. A mechanosensitive peri-arteriolar niche for osteogenesis and lymphopoiesis. *Nature*. 2021;591(7850):438-44.
123. Zhong L, Yao L, Tower RJ, Wei Y, Miao Z, Park J, et al. Single cell transcriptomics identifies a unique adipose lineage cell population that regulates bone marrow environment. *Elife*. 2020;9.

124. Tratwal J, Rojas-Sutterlin S, Bataclan C, Blum S, Naveiras O. Bone marrow adiposity and the hematopoietic niche: A historical perspective of reciprocity, heterogeneity, and lineage commitment. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2021;35(4):101564.
125. Notta F, Zandi S, Takayama N, Dobson S, Gan OI, Wilson G, et al. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science.* 2016;351(6269):aab2116.
126. Rodriguez-Fraticelli AE, Wolock SL, Weinreb CS, Panero R, Patel SH, Jankovic M, et al. Clonal analysis of lineage fate in native haematopoiesis. *Nature.* 2018;553(7687):212-6.
127. Carrelha J, Meng Y, Kettyle LM, Luis TC, Norfo R, Alcolea V, et al. Hierarchically related lineage-restricted fates of multipotent haematopoietic stem cells. *Nature.* 2018;554(7690):106-11.
128. Yamamoto R, Morita Y, Ooehara J, Hamanaka S, Onodera M, Rudolph KL, et al. Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell.* 2013;154(5):1112-26.
129. Sanjuan-Pla A, Macaulay IC, Jensen CT, Woll PS, Luis TC, Mead A, et al. Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature.* 2013;502(7470):232-6.
130. Bruns I, Lucas D, Pinho S, Ahmed J, Lambert MP, Kunisaki Y, et al. Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat Med.* 2014;20(11):1315-20.
131. Zhao M, Perry JM, Marshall H, Venkatraman A, Qian P, He XC, et al. Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat Med.* 2014;20(11):1321-6.
132. Jiang L, Han X, Wang J, Wang C, Sun X, Xie J, et al. SHP-1 regulates hematopoietic stem cell quiescence by coordinating TGF- β signaling. *J Exp Med.* 2018;215(5):1337-47.
133. Heralut A, Binnewies M, Leong S, Calero-Nieto FJ, Zhang SY, Kang YA, et al. Myeloid progenitor cluster formation drives emergency and leukaemic myelopoiesis. *Nature.* 2017;544(7648):53-8.
134. Christopher MJ, Rao M, Liu F, Woloszynek JR, Link DC. Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice. *J Exp Med.* 2011;208(2):251-60.
135. Winkler IG, Sims NA, Pettit AR, Barbier V, Nowlan B, Helwani F, et al. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood.* 2010;116(23):4815-28.
136. Hur J, Choi JI, Lee H, Nham P, Kim TW, Chae CW, et al. CD82/KAI1 Maintains the Dormancy of Long-Term Hematopoietic Stem Cells through Interaction with DARC-Expressing Macrophages. *Cell Stem Cell.* 2016;18(4):508-21.
137. Ludin A, Itkin T, Gur-Cohen S, Mildner A, Shezen E, Golan K, et al. Monocytes-macrophages that express alpha-smooth muscle actin preserve primitive hematopoietic cells in the bone marrow. *Nat Immunol.* 2012;13(11):1072-82.
138. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
139. Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells.* 2008;26(3):591-9.
140. Buzzi M, Alviano F, Campioni D, Stignani M, Melchiorri L, Rotola A, et al. Umbilical cord blood CD34(+)cell-derived progeny produces human leukocyte antigen-G molecules with immunomodulatory functions. *Hum Immunol.* 2012;73(2):150-5.
141. Konno M, Hamabe A, Hasegawa S, Ogawa H, Fukusumi T, Nishikawa S, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells and regenerative medicine. *Dev Growth Differ.* 2013;55(3):309-18.
142. Orciani M, Di Primio R. Skin-derived mesenchymal stem cells: isolation, culture, and characterization. *Methods Mol Biol.* 2013;989:275-83.
143. Gullo F, De Bari C. Prospective purification of a subpopulation of human synovial mesenchymal stem cells with enhanced chondro-osteogenic potency. *Rheumatology (Oxford).* 2013;52(10):1758-68.
144. Short B, Wagey R. Isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Methods Mol Biol.* 2013;946:335-47.

145. Colnot C. Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. *J Bone Miner Res.* 2009;24(2):274-82.
146. Zhou BO, Yue R, Murphy MM, Peyer JG, Morrison SJ. Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell.* 2014;15(2):154-68.
147. Cohnheim J. Über Entzündung und Eiterung *Path Anat Physiol Klin Med.* 1867;40:1-79.
148. AA M. Über experimentelle Erzeugung von Knochenmarks-Gewebe. *Ana Anz.* 1906;28:24-38.
149. Friedenstein A. Stromal-hematopoietic interrelationships: Maximov's ideas and modern models. *Haematol Blood Transfus.* 1989;32:159-67.
150. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970;3(4):393-403.
151. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol.* 1974;2(2):83-92.
152. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation.* 1974;17(4):331-40.
153. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968;6(2):230-47.
154. Tavassoli M, Crosby WH. Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science.* 1968;161(3836):54-6.
155. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood.* 1980;56(2):289-301.
156. Gartner S, Kaplan HS. Long-term culture of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77(8):4756-9.
157. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7.
158. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5):641-50.
159. Kfoury Y, Scadden DT. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. *Cell Stem Cell.* 2015;16(3):239-53.
160. Tikhonova AN, Lasry A, Austin R, Aifantis I. Cell-by-Cell Deconstruction of Stem Cell Niches. *Cell Stem Cell.* 2020;27(1):19-34.
161. Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M, Smith AG, et al. Neuroepithelial Cells Supply an Initial Transient Wave of MSC Differentiation. *Cell.* 2007;129(7):1377-88.
162. Ono N, Ono W, Mizoguchi T, Nagasawa T, Frenette PS, Kronenberg HM. Vasculature-associated cells expressing nestin in developing bones encompass early cells in the osteoblast and endothelial lineage. *Dev Cell.* 2014;29(3):330-9.
163. Pineault KM, Song JY, Kozloff KM, Lucas D, Wellik DM. Hox11 expressing regional skeletal stem cells are progenitors for osteoblasts, chondrocytes and adipocytes throughout life. *Nat Commun.* 2019;10(1):3168.
164. Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, Nakamura M, Nagai Y, Satoh E, et al. Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell.* 2008;2(4):392-403.
165. Pinho S, Lacombe J, Hanoun M, Mizoguchi T, Bruns I, Kunisaki Y, et al. PDGFRalpha and CD51 mark human nestin+ sphere-forming mesenchymal stem cells capable of hematopoietic progenitor cell expansion. *J Exp Med.* 2013;210(7):1351-67.
166. Gulati GS, Murphy MP, Marecic O, Lopez M, Brewer RE, Koepke LS, et al. Isolation and functional assessment of mouse skeletal stem cell lineage. *Nat Protoc.* 2018;13(6):1294-309.
167. Chan CK, Seo EY, Chen JY, Lo D, McArdle A, Sinha R, et al. Identification and specification of the mouse skeletal stem cell. *Cell.* 2015;160(1-2):285-98.

168. Debnath S, Yallowitz AR, McCormick J, Lalani S, Zhang T, Xu R, et al. Discovery of a periosteal stem cell mediating intramembranous bone formation. *Nature*. 2018;562(7725):133-9.
169. Houlihan DD, Mabuchi Y, Morikawa S, Niibe K, Araki D, Suzuki S, et al. Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR- α . *Nature Protocols*. 2012;7(12):2103-11.
170. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity*. 2006;25(6):977-88.
171. Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K, et al. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity*. 2010;33(3):387-99.
172. Yue R, Zhou BO, Shimada IS, Zhao Z, Morrison SJ. Leptin Receptor Promotes Adipogenesis and Reduces Osteogenesis by Regulating Mesenchymal Stromal Cells in Adult Bone Marrow. *Cell Stem Cell*. 2016;18(6):782-96.
173. Logan M, Martin JF, Nagy A, Lobe C, Olson EN, Tabin CJ. Expression of Cre Recombinase in the developing mouse limb bud driven by a Prxl enhancer. *Genesis*. 2002;33(2):77-80.
174. Joseph C, Quach JM, Walkley CR, Lane SW, Lo Celso C, Purton LE. Deciphering hematopoietic stem cells in their niches: a critical appraisal of genetic models, lineage tracing, and imaging strategies. *Cell Stem Cell*. 2013;13(5):520-33.
175. Passaro D, Garcia-Albornoz M, Diana G, Chakravarty P, Ariza-McNaughton L, Batsivari A, et al. Integrated OMICs unveil the bone-marrow microenvironment in human leukemia. *Cell Rep*. 2021;35(6):109119.
176. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007;131(2):324-36.
177. Chan CKF, Gulati GS, Sinha R, Tompkins JV, Lopez M, Carter AC, et al. Identification of the Human Skeletal Stem Cell. *Cell*. 2018;175(1):43-56 e21.
178. Ghazanfari R, Li H, Zacharaki D, Lim HC, Scheduling S. Human Non-Hematopoietic CD271(pos)/CD140a(low/neg) Bone Marrow Stroma Cells Fulfill Stringent Stem Cell Criteria in Serial Transplantations. *Stem Cells Dev*. 2016;25(21):1652-8.
179. Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, Nagai Y, Niibe K, Hiratsu E, et al. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med*. 2009;206(11):2483-96.
180. Chan CK, Chen CC, Luppen CA, Kim JB, DeBoer AT, Wei K, et al. Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation. *Nature*. 2009;457(7228):490-4.
181. Oguro H, Ding L, Morrison SJ. SLAM family markers resolve functionally distinct subpopulations of hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. *Cell Stem Cell*. 2013;13(1):102-16.
182. Perrin S, Julien A, de Lageneste OD, Abou-Khalil R, Colnot C. Mouse Periosteal Cell Culture, in vitro Differentiation, and in vivo Transplantation in Tibial Fractures. *Bio Protoc*. 2021;11(15):e4107.
183. van Gestel N, Torrekens S, Roberts SJ, Moermans K, Schrooten J, Carmeliet P, et al. Engineering vascularized bone: osteogenic and proangiogenic potential of murine periosteal cells. *Stem Cells*. 2012;30(11):2460-71.
184. Wang Q, Huang C, Zeng F, Xue M, Zhang X. Activation of the Hh pathway in periosteum-derived mesenchymal stem cells induces bone formation in vivo: implication for postnatal bone repair. *Am J Pathol*. 2010;177(6):3100-11.
185. De Bari C, Dell'Accio F, Vanlauwe J, Eyckmans J, Khan IM, Archer CW, et al. Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(4):1209-21.
186. Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, Takamatsu H, Katsuura M, Ozawa H, et al. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res*. 1999;14(7):1239-49.

187. Oka T, Xu J, Kaiser RA, Melendez J, Hambleton M, Sargent MA, et al. Genetic Manipulation of Periostin Expression Reveals a Role in Cardiac Hypertrophy and Ventricular Remodeling. *Circulation Research*. 2007;101(3):313-21.
188. Owston HE, Ganguly P, Tronci G, Russell SJ, Giannoudis PV, Jones EA. Colony Formation, Migratory, and Differentiation Characteristics of Multipotential Stromal Cells (MSCs) from “Clinically Accessible” Human Periosteum Compared to Donor-Matched Bone Marrow MSCs. *Stem Cells International*. 2019;2019:1-14.
189. Declercq HA, De Ridder LI, Cornelissen MJ. Isolation and Osteogenic Differentiation of Rat Periosteum-derived Cells. *Cytotechnology*. 2005;49(1):39-50.
190. Roberts SJ, Owen HC, Tam WL, Solie L, Van Cromphaut SJ, Van Den Berghe G, et al. Humanized Culture of Periosteal Progenitors in Allogeneic Serum Enhances Osteogenic Differentiation and In Vivo Bone Formation. *STEM CELLS Translational Medicine*. 2014;3(2):218-28.
191. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res*. 1999;14(11):1805-15.
192. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2002;17(3):513-20.
193. Schmid GJ, Kobayashi C, Sandell LJ, Ornitz DM. Fibroblast growth factor expression during skeletal fracture healing in mice. *Dev Dyn*. 2009;238(3):766-74.
194. Yu YY, Lieu S, Lu C, Miclau T, Marcucio RS, Colnot C. Immunolocalization of BMPs, BMP antagonists, receptors, and effectors during fracture repair. *Bone*. 2010;46(3):841-51.
195. Frenette PS, Pinho S, Lucas D, Scheiermann C. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:285-316.
196. Kanisicak O, Khalil H, Ivey MJ, Karch J, Maliken BD, Correll RN, et al. Genetic lineage tracing defines myofibroblast origin and function in the injured heart. *Nature Communications*. 2016;7(1):12260.
197. Duchamp de Lageneste O, Colnot C. Periostin in Bone Regeneration. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1132:49-61.
198. Mortimer PM, Mc Intyre SA, Thomas DC. Beyond the Extra Respiration of Phagocytosis: NADPH Oxidase 2 in Adaptive Immunity and Inflammation. *Front Immunol*. 2021;12:733918.
199. Zhang DY, Pan Y, Zhang C, Yan BX, Yu SS, Wu DL, et al. Wnt/beta-catenin signaling induces the aging of mesenchymal stem cells through promoting the ROS production. *Mol Cell Biochem*. 2013;374(1-2):13-20.
200. Woods K, Guezguez B. Dynamic Changes of the Bone Marrow Niche: Mesenchymal Stromal Cells and Their Progeny During Aging and Leukemia. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:714716.
201. Aguilar-Navarro AG, Meza-Leon B, Gratzinger D, Juarez-Aguilar FG, Chang Q, Ornatsky O, et al. Human Aging Alters the Spatial Organization between CD34+ Hematopoietic Cells and Adipocytes in Bone Marrow. *Stem Cell Reports*. 2020;15(2):317-25.
202. Greenblatt MB, Debnath S. A stem-cell basis for skeletal ageing. *Nature*. 2021.
203. Jaiswal S, Ebert BL. Clonal hematopoiesis in human aging and disease. *Science*. 2019;366(6465).
204. Svendsen AF, Yang D, Kim KM, Lazare SS, Skinder N, Zwart E, et al. A comprehensive transcriptome signature of murine hematopoietic stem cell aging. *Blood*. 2021.
205. Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE, Weissman IL. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development*. 1997;124(10):1929-39.
206. Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*. 1994;1(8):661-73.
207. Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoeijmakers J, Weissman IL. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature*. 2007;447(7145):725-9.

208. Rossi DJ, Seita J, Czechowicz A, Bhattacharya D, Bryder D, Weissman IL. Hematopoietic stem cell quiescence attenuates DNA damage response and permits DNA damage accumulation during aging. *Cell Cycle*. 2007;6(19):2371-6.
209. Florian MC, Dorr K, Niebel A, Daria D, Schrezenmeier H, Rojewski M, et al. Cdc42 activity regulates hematopoietic stem cell aging and rejuvenation. *Cell Stem Cell*. 2012;10(5):520-30.
210. Mabuchi Y, Okawara C, Mendez-Ferrer S, Akazawa C. Cellular Heterogeneity of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in the Bone Marrow. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:689366.
211. Crane GM, Jeffery E, Morrison SJ. Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(9):573-90.
212. Ehling M, Adams S, Benedito R, Adams RH. Notch controls retinal blood vessel maturation and quiescence. *Development*. 2013;140(14):3051-61.
213. Takeshita S, Kikuno R, Tezuka K, Amann E. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem J*. 1993;294 (Pt 1)(Pt 1):271-8.
214. Sonnenberg-Riethmacher E, Miehle M, Riethmacher D. Periostin in Allergy and Inflammation. *Front Immunol*. 2021;12:722170.
215. Liu Y, Li F, Gao F, Xing L, Qin P, Liang X, et al. Periostin promotes tumor angiogenesis in pancreatic cancer via Erk/VEGF signaling. *Oncotarget*. 2016;7(26):40148-59.
216. Zhao S, Wu H, Xia W, Chen X, Zhu S, Zhang S, et al. Periostin expression is upregulated and associated with myocardial fibrosis in human failing hearts. *J Cardiol*. 2014;63(5):373-8.
217. Conway SJ, Izuhara K, Kudo Y, Litvin J, Markwald R, Ouyang G, et al. The role of periostin in tissue remodeling across health and disease. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(7):1279-88.

VI. ANNEXES - ARTICLES

ARTICLE 1

Periosteal skeletal stem cells represent a source of bone marrow mesenchymal stem cells contributing to the bone marrow regeneration after injury.

Tony Marchand, Kemi Akinnola, Shoichiro Takeishi, Maria Maryanovich, Sandra Pinho, Paul Frenette.

Article en cours de finalisation.

Format « Short report » pour le journal Developmental Cell

Title: Periosteal skeletal stem cells represent a source of bone marrow mesenchymal stem cells contributing to the bone marrow regeneration after injury.

Authors: Tony Marchand^{1,2,3*}, Kemi Akinnola^{3,4,5}, Shoichiro Takeishi^{3,4,5}, Maria Maryanovich^{3,4,5}, Sandra Pinho⁶, Paul Frenette^{3,4,5}.

Affiliations:

1. Service d'hématologie Clinique, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Rennes, France
2. INSERM U1236, Université Rennes 1, Rennes, France
3. Ruth L. and David S. Gottesman Institute for Stem Cell and Regenerative Medicine, Albert Einstein College of Medicine, Michael F. Price Center, 1301 Morris Park Avenue, Bronx, NY 10461, USA
4. Department of Cell Biology, Albert Einstein College of Medicine, Michael F. Price Center, 1301 Morris Park Avenue, Room 101, Bronx, NY 10461, USA
5. Department of Medicine, Albert Einstein College of Medicine, Michael F. Price Center, 1301 Morris Park Avenue, Room 101, Bronx, NY 10461, USA
6. Department of Pharmacology, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL, USA

Correspondence: tony.marchand@chu-rennes.fr

In brief:

Using a newly developed bone transplant model, Marchand et al. show that periosteal skeletal stem cells are able to migrate into the bone cavity after injury. Following their migration, periosteal skeletal stem cells acquire the capacity to support hematopoiesis with the expression of niche specific cytokines such as *Cxcl12* and *Scf*. This work highlights the periosteum as a source of bone marrow mesenchymal stem cells.

Highlights:

- Development of a mouse model to study bone marrow regeneration
- Periosteal skeletal stem cells migrate in the bone marrow after injury
- Periosteal skeletal stem cells are able to support hematopoiesis after their migration in the bone marrow

Summary:

Functional stromal cells are known to be important for bone marrow regeneration after chemotherapy or radiation induced injury to avoid prolonged myelosuppression. However, how the cells within the bone marrow are repopulated post injury is unknown. We have developed a whole bone transplantation model that mimics the initial bone marrow necrosis and fatty infiltration seen after bone marrow injury and the gradual recovery. Unexpectedly, we found that skeletal stem cells from the periosteum are able to migrate into the bone marrow, thereby contributing to bone marrow regeneration. These periosteal skeletal stem cells also give rise to bone marrow mesenchymal stem cells with the expression of hematopoietic stem cell niche factors, such as *Cxcl12* and *Scf*. The observation that bone marrow mesenchymal stem cells, but not periosteal skeletal stem cells, die during the transplantation process suggests that periosteal skeletal stem cells are more resistant to stress compared to bone marrow mesenchymal stem cells in part due to a more quiescent phenotype. Our study uncovers a new function of periosteal skeletal stem cells, highlighting their major plasticity and the role of the periosteum as a potential bone marrow mesenchymal stem cells source following bone marrow injury.

Keywords: skeletal stem cell, periosteum, bone marrow regeneration, mesenchymal stem cells, hematopoietic niche.

INTRODUCTION

Hematopoietic stem cells (HSCs) are localized in a specific microenvironment often referred as “niche” where their self-renewal, differentiation and proliferation capacities are finely regulated by molecular and cellular interactions with the different niche constituents.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are rare multipotent stromal cells capable of multilineage differentiation into various cell types including osteoblasts, chondrocytes and adipocytes (Caplan, 1991; Dominici et al., 2006; Frenette et al., 2013). Within the bone marrow (BM), mesenchymal stem cells are mostly found around the blood vessels where they closely interact with HSCs controlling their fate (Acar et al., 2015; Asada et al., 2017; Ding et al., 2012; Kunisaki et al., 2013). Several BM-MSCs populations, with significant overlaps, have been described using cell surface markers or reporter mice (Asada *et al.*, 2017; Ding *et al.*, 2012; Mendez-Ferrer et al., 2010; Pinho et al., 2013; Zhou et al., 2014).

BM-MSCs are mostly quiescent at steady state, but after injury, BM-MSCs can exit quiescence and have high regenerative capacity. Functional stromal cells are known to be important for BM regeneration after chemotherapy- or radiation-induced injury, in particular to avoid myelosuppression, a common side effect of these treatments ((Lucas et al., 2013; Severe et al., 2019; Zhou et al., 2017)). However, the major mechanisms governing BM regeneration post injury remain incompletely understood. Recently, several MSCs candidates have been described in the BM and also in the periosteum (Chan et al., 2015; Duchamp de Lageneste et al., 2018). How these various MSCs relate to each other is not known. While the BM is classically known as a major source of MSCs, the bone itself represents a richer source of colony-forming units-fibroblastic (CFU-F) (Blashki et al., 2016; Mizoguchi et al., 2014). Recent studies have suggested that the periosteum, a thin sheet of fibrous material that encases the surface of long bones, represents a source of skeletal stem cells for bone regeneration (Arnsdorf et al., 2009; Chan *et al.*, 2015; Debnath et al., 2018; Duchamp de Lageneste *et al.*, 2018). It has been suggested that bone regeneration is mediated by both endochondral and intramembranous ossification (Debnath *et al.*, 2018; Shapiro, 2008; Wang et al., 2017). However, there is little information on the role of periosteal SSC (P-SSC) function outside their crucial role in bone healing and bone remodeling.

Here, we have developed a whole-bone transplantation model to study BM regeneration. After an initial destruction of the BM architecture, we observed a regeneration of the hematopoietic niche. Regeneration occurring in the graft mimics the initial destruction and fatty infiltration observed after chemotherapy or irradiation (Zhou *et al.*, 2017). A progressive regeneration of the vascular network enables hematopoietic cells derived from the host and MSCs derived from the graft to colonize the transplanted bone. Unexpectedly we found that P-SSCs could migrate to the BM and give rise to BM-MSCs capable of sustaining HSCs through expression of specific niche genes *in vivo* such as Cxcl12 and Stem cell factor (*Kitl*). P-SSCs further differentiate into bone, and fat. In addition, we found that BM-MSCs and P-SSCs display different metabolic profiles suggesting that P-SSCs are highly quiescent at steady state possibly contributing to the resistance to the transplantation-induced stress. In conclusion, our study unveiled the high plasticity of P-SSCs and their potential contribution to BM stroma regeneration after injury.

RESULTS AND DISCUSSION

The bone transplant model recapitulates physiological bone marrow regeneration

To study the mechanisms involved in BM regeneration, we developed a new model based on the subcutaneous transplantation of an intact femur in recipient mice. The transplantation is followed by a rapid and massive necrosis of BM cells with a cell viability below 10% only 24 hours after transplantation (**Figures 1A and S1A**). Interestingly, we observed the replacement of the graft hematopoietic cells by adipocytes as described after chemotherapy or irradiation (**Figure S1B**) (Yamazaki and Allen, 1991; Zhou *et al.*, 2017).

A monthly follow up of the graft cellularity showed a progressive increase over time with no significant difference between the host and grafted femurs 5 months after transplantation (**Figure 1B**). This regeneration of the BM compartment is associated with a reduction of the adipocyte number as revealed by staining with the anti-perilipin antibody (**Figure S1B**). Since BM-MSCs are major constituent of the hematopoietic niche (Asada *et al.*, 2017; Ding *et al.*, 2012; Greenbaum *et al.*, 2013; Kunisaki *et al.*, 2013; Pinho and Frenette, 2019; Zhou *et al.*, 2014), we looked specifically at the stromal compartment. The absolute number of graft BM-MSCs defined by the $CD45^{neg}Ter119^{neg}CD31^{neg}CD51^{pos}CD140a^{pos}$ phenotype (Pinho *et al.*, 2013) increased over time with no difference between the host and grafted femurs 5 months after transplantation (**Figure 1B**). We also observed an increase in the number of $Lin^{neg}Sca-1^{neg}c-kit^{pos}CD48^{neg}CD150^{pos}$ HSCs in the graft over time however without reaching the HSCs number in the host femur at 5 months (**Figure 1B**). HSCs regeneration kinetic suggests that more time could be necessary to reach a plateau. No difference was observed in term of hematopoietic progenitors and immune cells populations between host and graft femurs except a slight increase in the percentage of T $CD8^{pos}$ lymphocytes (**Figure S1D and S1E**).

In order to determine the origin of the cells in the graft, we took advantage of the Rosa-mT/mG and UBC-GFP mice models in which all cells are labeled by red and green reporters respectively (Liu *et al.*, 2020; Muzumdar *et al.*, 2007). We transplanted femurs isolated from UBC-GFP mice into Rosa-mT/mG recipients and quantified endothelial cells, BM-MSCs, and hematopoietic cells in the graft (**Figures 1C and S1C**). Five months after transplantation, virtually all the BM-MSCs were from graft origin and hematopoietic cells from host origin

(Figures 1D and 1E). No cells coming from the graft were observed in the host femurs (data not shown). These results are consistent with data obtained from ossicle-based experiments where MSC-seeded ossicles are colonized by recipient-derived hematopoietic cells (Friedenstein et al., 1968; Mendez-Ferrer *et al.*, 2010; Sacchetti et al., 2007; Tavassoli and Crosby, 1968). Interestingly, endothelial cells were derived from both host and graft suggesting the contribution of different progenitors (Figure 1D and 1E). The origin of endothelial cells progenitors in the BM are not well defined. A recent study showed that during BM regeneration after chemotherapy, sinusoidal and arteriolar vessels are derived from distinct progenitors (Xu et al., 2018). Further studies are needed to clarify the respective contribution of graft and host derived progenitors in the vascular network regeneration.

To look at the niche supportive activity of BM-MSCs, we transplanted femurs from Nestin-GFP mice into Nestin-GFP recipient and sorted CD45^{neg}Ter119^{neg}CD31^{neg}NestinGFP^{pos} BM-MSCs from host and graft for analysis (Figure 1F). Since no circulation of BM-MSCs between host and graft BM was observed, this strategy allowed us to compare host and graft BM-MSCs in the same animal. We observed a progressive increase of the expression of niche specific genes with no difference at 5 months for *Cxcl12* and *Kitl* (Figure 1F). Similarly, no difference was observed between host and graft femurs in term of *Osteopontin (Opn)*, *Angiopoietin-1 (Angpt1)*, *Vascular cell adhesion molecule-1 (Vcam1)* and *Nerve growth factor (Ngf)* expression (Figure 1G). By using the same strategy, host and graft BM-MSCs were shown to display similar CFU-F activity at 5 months (Figure 1H). Altogether, these data identify our model of graft femur as relevant to study BM-MSCs and BM hematopoietic niche reconstitution.

Periosteal skeletal stem cells but not BM-MSCs expanded after bone transplantation.

Skeletal stem cells have been identified in the periosteum, compact bone, and BM (Duchamp de Lageneste *et al.*, 2018; Mendez-Ferrer *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2014). Since the transplantation was followed by a virtually complete destruction of the BM cavity content, we hypothesized that cells derived from the compact bone and the periosteum could contribute to the regeneration process. We first analyzed the graft BM, compact bone, and periosteum cellularities at different early time points after the transplantation. While the BM and compact bone cellularities were drastically reduced, we unexpectedly observed a major increase in the

periosteum cellularity (**Figures 2A and S2A**). Moreover, while most of the BM cells died shortly after transplantation (**Figure S1A and S2A**), cell viability was not affected in the periosteum (**Figure S2B**). In order to quantify P-SSCs and BM-MSCs by flow cytometry, we used the combination of CD51 and CD200 as these markers are well-validated in both tissues (Chan *et al.*, 2015; Debnath *et al.*, 2018; Gulati *et al.*, 2018). We confirmed by flow cytometry an expansion of P-SSCs starting 3 days after transplantation with a peak at day 8 (**Figure 2B**). By transplanting femurs from Nestin-GFP mice into WT mice, we observed by confocal microscopy an expansion of Nestin-GFP^{pos} SSCs within the periosteum with a peak at day 8 (**Figure 2C and S2C**).

To evaluate the potential role of the periosteum in BM regeneration, we transplanted intact femurs and femurs in which we mechanically removed the periosteum. Five months after transplantation, total cellularity and BM-MSCs number were significantly reduced in femurs transplanted without periosteum supporting a role of this tissue in BM regeneration (**Figure 2D**).

Identification of P-SSCs as a source of BM-MSCs

To directly evaluate P-SSCs contribution to BM regeneration, we wrapped bones from WT mice in which the periosteum was previously removed, with periosteum isolated from UBC-GFP mice (**Figure 3A and S3A**). We then transplanted these chimeric bones into WT mice as described before. Five months after transplantation, we observed by confocal microscopy the replacement of the graft compact bones by GFP-positive cells consistent with the well-described role of the periosteum in bone remodeling (**Figure 3B**) (Duchamp de Lageneste *et al.*, 2018; Julien *et al.*, 2020). Interestingly we also observed within the BM, GFP-positive cells located near the vasculature, akin to the natural position of BM-MSCs (**Figure 3B**). High magnification analysis revealed that some endothelial cells stained by an anti-endomucin antibody were also GFP-positive suggesting a migration of endothelial cells or endothelial cell precursors from the periosteum into the BM (**Figure S3B**). Flow cytometry analysis of the graft 5 months after transplantation revealed that 8% (3.1 – 15.4) of BM-MSCs and 8.8% (2.8 – 15.7) of endothelial cells derived from the periosteum in our system (**Figure 3C**). Importantly, while P-SSCs did not express *Cxcl12* and *Kitl*, periosteum-derived GFP^{pos} BM-MSCs expressed these niche cytokines at a similar level than GFP^{neg} graft BM-MSCs and control Nestin-GFP^{pos} BM-

MSCs (**Figure 3D**). Similarly, we measured the expression of *Angpt1*, a secreted glycoprotein known to regulate HSCs quiescence within the BM niche (Arai et al., 2004). We found that *Angpt1* expression in GFP^{POS} BM-MSCs reached the expression of GFP^{NEG} and control Nestin-GFP^{POS} BM-MSCs 5 months after transplantation (**Figure S3C**). Interestingly we observed a higher expression of the Osteopontin gene (*Opn*) by periosteum-derived GFP^{POS} BM-MSCs compared to GFP^{NEG} BM-MSCs and control Nestin-GFP^{POS} BM-MSCs (**Figure S3C**). Osteopontin is an extracellular glycoprotein produced by BM-MSCs and osteolineage cells such as osteoblasts and osteocytes (Grassinger et al., 2009; Nilsson et al., 2005). Osteopontin regulates hematopoietic stem cell migration, homing and negatively the HSC pool (Grassinger et al., 2009; Stier et al., 2005). The high expression of *Opn* by periosteum-derived BM-MSCs could represent a genomic imprinting reflecting their origin as P-SSC are mostly osteo-biased (Roberts et al., 2014; Wang et al., 2010). These results show that P-SSCs can both migrate into the BM cavity and adopt a BM-MSC profile to support HSCs. However, the percentage of GFP^{POS} MSCs within the engrafted BM remained low, probably due to the highly artificial nature of the method. Therefore, we decided to use a transgenic mouse model with an inducible Cre expression under the promoter of the periostin gene (*Postn*) hereafter referred as Postn-Cre^{ER} (Oka et al., 2007). Periostin is a secreted matricellular protein that has been shown to be highly expressed by periosteal cells and upregulated during bone healing (Duchamp de Lageneste et al., 2018). While *Postn* gene is expressed by various cell types, including but not limited to osteoblasts and fibroblasts, its low level of expression by BM-MSCs compared to P-SSCs makes it a useful marker to distinguish endogenous BM-MSCs from periosteum-derived BM-MSCs after BM regeneration (Conway et al., 2014; Duchamp de Lageneste et al., 2018). To trace the P-SSCs after bone transplantation, we intercrossed the Postn-Cre^{ER} line with the ROSA26-loxP-stop-loxP-tdTomato reporter (iTdTomato) mice. At steady state, TdTomato^{POS} cells were mostly located within the periosteum with some TdTomato^{POS} osteoblast as expected (**Figures S4A and S4B**). We then transplanted WT mice with femurs isolated from PostnCre^{ERx} iTdTomato mice and gave tamoxifen shortly after transplantation to induce the expression of the reporter iTdTomato in the periosteum. Five months after transplantation, 86.7% (71.7 – 95.8) of the BM-MSCs within the engrafted BM were TdTomato^{POS} indicating a periosteal origin (**Figure 3E**). We also observed *in vivo* adipocyte differentiation from periosteal-derived SSCs (**Figure S4C**). Quantitative PCR analysis performed on sorted BM-MSCs confirmed the expression of *Cxcl12* and *Kitl* with no difference

with host BM-MSCs (**Figure 3F**). All together, these results suggest that SSCs derived from the periosteum and able to migrate into the BM during regeneration and to adopt a BM-MSC-like phenotype.

P-SSCs are more resistant to stress and more quiescent than BM-MSCs

Due to the ability of P-SSCs to survive the bone transplantation and eventually migrate into the BM, we hypothesized that P-SSCs are more resistant to hypoxia and lack of nutrients than BM-MSCs, due to their innate properties rather than anatomical location. To investigate the cell-intrinsic differences between BM-MSCs and P-SSCs, we first developed *in vitro* culture experiments designed to submit BM-MSC and P-SSC to an equivalent level of stress. Briefly, after a short-term *in vitro* expansion, purified P-SSCs and BM-MSCs were maintained for 12 hours in serum-free culture medium under 1% hypoxia before evaluation of spontaneous apoptosis by staining for active caspase 3/7. BM-MSCs exhibited a significantly higher level of apoptosis compared to P-SSCs (**Figures 4A and B**). These results suggest that P-SSCs are more resistant than BM-MSC when they are submitted to an equivalent stress.

We then wanted to decipher the mechanisms of this increased resistance to cell apoptosis. Subcutaneous bone transplantation represents an inflammatory condition with destruction of the bone marrow content shortly after the procedure. Inflammation is known to lead to an increase in reactive oxygen species (ROS) which play a crucial role in immune response (Mortimer et al., 2021). Since a high ROS level was shown to induce MSC senescence and apoptosis (Zhang et al., 2013), we hypothesized that P-SSCs were more prone to cope with high-ROS level than BM-MSCs. First, we measured cellular and mitochondrial ROS by performing Dihydroethidium (DHE) and MitoSOXTM assays respectively. At steady state, flow cytometry analysis revealed that P-SSCs had lower levels of both cellular and mitochondrial ROS compared with BM-MSCs (**Figure 4C**). Under physiological conditions, cells can maintain a low ROS-level by expressing antioxidant enzymes. Indeed, we found a higher expression of the 3 major ROS-detoxifying enzymes genes superoxide dismutase (*Sod1*), glutaminase (*Gls*) and glutathione peroxidase (*Gpx1*), quantified by qPCR in sorted P-SSCs compared with BM-MSCs (**Figure 4D**). A low-ROS level and high expression of antioxidant enzymes is one of the hallmark of quiescent cells (Ito and Suda, 2014; Suda et al., 2011). Therefore, we hypothesized that P-SSCs were more quiescent than BM-MSCs protecting them from extrinsic aggression

such as oxidative stress and low nutrient conditions. Consistent with this hypothesis, freshly sorted P-SSCs were shown to display a higher expression of the cell cycle inhibitors *Cdkn1a* and *Cdkn1b* and a lower expression of *Cdk4*, a gene associated with cell proliferation, compared to BM-MSCs (**Figure 4E**). We also assessed glucose uptake by flow cytometry using 2-NDGB labeling, as it is known that cellular quiescence is associated with decreased glucose uptake (Ito and Suda, 2014) and observed that P-SSCs exhibited reduced glucose uptake *ex vivo* compared to BM-MSCs (**Figure 4F**). Taken together, these data suggest that P-SSCs are more quiescent than BM-MSCs, due at least in part to cell-intrinsic mechanisms, potentially allowing P-SSCs to survive the stress of bone transplantation.

We next evaluated the impact of bone transplantation by performing cell cycle analysis and metabolism assays in order to compare BM-MSCs and P-SSCs at steady state with P-SSCs 72 hours after transplantation, a time point associated with an important expansion of P-SSCs (**Figure 2A**). As expected, we observed a shift in cells from G0 to G1 phases of the cell cycle in P-SSC 72 hours after transplantation (**Figure 4G**). Consistent with the high mitotic activity, graft P-SSCs analyzed 72 hours after transplantation display a higher glucose uptake, mitochondrial ROS and mitochondrial potential compared with host BM-MSCs and P-SSCs (**Figures 4H**). Various studies have shown that low levels of ROS maintain stem cell quiescence (Ito and Suda, 2014; Suda *et al.*, 2011) and that a transient increase in ROS levels triggers MSC proliferation after exiting quiescence (Lyublinskaya *et al.*, 2015). Whether increased ROS level observed shortly after transplantation is only the consequence of P-SSC mitotic activity or a sign of oxidative stress induced by the procedure and contributing to stimulate P-SSCs expansion remains to be determined.

In conclusion, our results suggest that P-SSCs and BM-MSCs display different metabolic profiles potentially contributing to the resistance of the bone transplantation procedure.

Conclusion

BM regeneration is an important process after injury due to disease or cancer treatment. When the BM fails to regenerate, individuals are at risk of infections and ultimately, death. While the BM microenvironment is quite well studied, the process of BM regeneration and stromal recovery remain poorly understood. Our results suggest a novel role for the periosteum in the process of stromal BM regeneration. At steady state, the periosteum

does not express HSC maintenance genes, *Kitl* and *Cxcl12*, and is not known to support HSCs. However, our results show that once in the bone marrow, periosteum-derived SSCs are able to adapt a BM-MSC-phenotype and express genes important for hematopoiesis. Therefore, it is possible that P-SSCs can be harvested and manipulated as a source for BM-MSCs.

Our results also suggest that the differential stress response between BM-MSCs and P-SSCs is due to the quiescent nature of P-SSCs. Additionally, the differences between P-SSCs and BM-MSCs appear to be cell-intrinsic rather than environmental. Further studies should be done to understand the mechanism behind P-SSCs stress resistance and mobilization within the bone marrow cavity.

In summary, our study has identified that P-SSCs can be a source of BM-MSCs following BM injury and that P-SSCs appear more quiescent and resistant to stress compared to BM-MSCs.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Whole bone transplantation is a good model to study bone marrow regeneration.

- (A) Schematic illustration and picture of the bone transplantation procedure.
- (B) Absolute number of total graft bone marrow cells, BM-MSCs and HSCs at 1, 2, 3, 4 and 5 months after transplantation (N=3).
- (C) Schematic illustration: the origin of the cells in the graft is determined by the transplantation of a Ubc-GFP bone into a Rosa mT/mG mouse
- (D) Origin of graft's BM-MSCs, Endothelial cells (EC) and hematopoietic cells (Hemato) analyzed by flow cytometry 5 months after bone transplantation (N=3).
- (E) Representative whole-mount confocal z-stack projections of a ubc-GFP bone transplanted into a Rosa mT/mG recipient 5 months after transplantation. Vascularization is stained by anti-CD31 and anti-CD144 antibodies. Scale Bar = 50 μ m (n = 3 mice)
- (F) Quantitative mRNA level relative to Gapdh comparison of niche specific genes expression by host and graft Nestin^{pos} BM-MSCs at T0, 1, 2, 3, 4 and 5 months after transplantation. (n = 3 mice per time point)
- (G) Expression of *Opn*, *Angpt1*, *Vcam1* and *Ngf* by control, host and graft Nestin^{pos} BM-MSCs 5 months after transplantation. (n =3 mice)
- (H) CFU-F absolute number of flushed CD45^{neg}Ter119^{neg}Nestin-GFP^{pos} BM-MSCs sorted from host and graft femurs 5 months after transplantation and plated at equal number and clonal densities under CFU-F culture condition (n=5 mice per group).

Data represented as mean \pm SEM. Unless otherwise noted, statistical significance was determined using unpaired two-tailed Student's t test. *p<0.05. ** p<0,01. *** p<0,001

Figure 2. Periosteal skeletal stem cells but not bone marrow mesenchymal stem cells expanded after bone transplantation.

- (A) Flow cytometry quantification of bone marrow, compact bone and periosteum cellularity at steady state, 1, 3, 8, 15 days and 3 months post transplantation. (n = 3 – 9 mice per time point)
 - (B) Absolute number of CD45^{neg}Ter119^{neg}CD31^{neg}CD51^{pos}CD200^{pos} P-SSCs at steady state, 1, 8 and 15 days post transplantation. (n = 3-4 mice per time point).
 - (C) Representative whole-mount confocal z-stack projections of Nestin-GFP^{pos} bone graft at steady state, 1, 8 and 15 days post transplantation. Three independent experiments yielded similar results. Scale bar = 100µm
 - (D) Total bone marrow cellularity and BM-MSCs absolute number 5 months after transplantation of bones with or without periosteum. (n = 3-4 mice per group).
- Data represented as mean ± SEM. Unless otherwise noted, statistical significance was determined using unpaired two-tailed Student's t test. *p<0.05. ** p<0,01. *** p<0,001

Figure 3. Periosteal SSCs regenerate the bone marrow stroma after bone transplant.

- (A) Schematic illustration of the transplantation of a wild-type bone wrapped with periosteum from a UBC-GFP mouse donor into a WT recipient mouse.
- (B) Representative whole-mount confocal z-stack projections of wild-type bone graft wrapped with periosteum from a UBC-GFP mouse donor into a WT recipient mouse 5 months after transplantation. Three independent experiments yielded similar results. Scale bar = 50µm (left panel) and 20µm (right panel)
- (C) Flow cytometry analysis of the percentage of GFP^{pos} CD45^{neg}Ter119^{neg}CD31^{neg}CD51^{pos}CD200^{pos} graft BM-MSCs and CD45^{neg}Ter119^{neg}CD31^{pos} endothelial cells 5 months after transplantation (n = 6 mice)
- (D) Quantification of *Cxcl12* and *Kitl* mRNA level relative to *Gapdh* in sorted control CD45^{neg}Ter119^{neg}CD31^{neg}Nestin-GFP^{pos} BM-MSCs, CD45^{neg}Ter119^{neg}CD31^{neg}CD51^{pos}CD200^{pos} P-SSCs, CD45^{neg}Ter119^{neg}CD31^{neg}CD51^{pos}CD200^{pos}GFP^{neg} graft BM-MSCs and CD45^{neg}Ter119^{neg}CD31^{neg}CD51^{pos}CD200^{pos}GFP^{pos} periosteum-derived graft BM-MSCs (n = 3-4 per group)
- (E) Percentage of BM idTomato^{pos} BM-MSCs 5 months after transplantation of a bone from a PostnCre^{ER};idTmt mouse into a WT recipient (n=4)
- (F) Quantification of *Cxcl12* and *Kitl* mRNA level relative to *Gapdh* in sorted host BM-MSCs; host P-SSC and graft idTomato^{pos} BM-MSCs from a grafted PostnCre^{ER};idTmt femur into a WT recipient.

Data represented as mean ± SEM. Unless otherwise noted, statistical significance was determined using unpaired two-tailed Student's t test. *p<0.05. ** p<0,01. *** p<0,001

Figure 4. Periosteal MSCs have a specific metabolic profile conferring a resistance to stress

- (A) Representative FACS plots of apoptosis assay comparing BM-MSCs and P-SSCs resistance to hypoxia and low nutrient content.

- (B) Percentage of apoptotic BM-MSCs and P-SSCs cultured under 1% O₂ and 0% FBS serum conditions (n = 10-11 per group)
- (C) Quantification of cellular ROS (left) and mitochondrial ROS (right) at steady state in CD45^{neg}Ter119^{neg}CD31^{neg}CD51^{pos}CD200^{pos} BM-MSCs and P-SSCs (n = 3 per group)
- (D) Quantification of *Sod1*, *Gls* and *Gpx1* expression by qPCR relative to *Gapdh* in sorted CD45^{neg}Ter119^{neg}CD31^{neg}CD51^{pos}CD200^{pos} BM-MSCs and P-SSCs (n = 3 – 7 per group)
- (E) Quantification of *Cdkn1a*, *Cdkn1c*, *Cdk4* relative to *Gapdh* in sorted CD45^{neg}Ter119^{neg}CD31^{neg}CD51^{pos}CD200^{pos} BM-MSCs and P-SSCs (n = 3-6 per group)
- (F) Quantification of glucose uptake at steady state in CD45^{neg}Ter119^{neg}CD31^{neg}CD51^{pos}CD200^{pos} BM-MSCs and P-SSCs (n = 5 per group)
- (G) Cell cycle analysis by flow cytometry of host BM-MSCs, host P-SSCs and graft P-SSC performed 72 hours after transplantation. (N=3)
- (H) Flow cytometry analysis of glucose uptake, mitochondrial ROS and mitochondrial potential host BM-MSCs, host P-SSCs and graft P-SSC performed 72 hours after transplantation (N=3)

DHE: Dihydroethidium; TMRE: Tetramethylrhodamine, ethyl ester; MTG: MitoTracker green
 Data represented as mean ± SEM. Unless otherwise noted, statistical significance was determined using unpaired two-tailed Student's t test. *p<0.05. ** p<0,01. *** p<0,001

Supplemental Figure 1: Bone and bone marrow regeneration after transplantation

- (A) Cell viability determined by flow cytometry and expressed as percentage of total dapi negative alive cells in the BM graft at steady state, 1, 3, 8, 15 days and 3 months after bone transplantation (N=3-4)
- (B) Representative whole-mount confocal z-stack projections of host and graft femurs 1 and 4 months after transplantation. Adipocytes are stained using an anti-perilipin antibody (scale bar: 50um). Three independent experiments yielded similar results.
- (C) Representative FACS plots showing the gating strategy to determine the origin of the different cell-fractions in the graft 5 months after transplantation of a Ubc-GFP bone into a Rosa mT/mG mouse.
- (D) Comparison of different hematopoietic progenitors populations between graft and host 5 months after bone transplantation (n = 4 per group)
- (E) Comparison of different immune cells populations between graft and host 5 months after bone transplantation (n = 4 per group)

Data represented as mean ± SEM. Unless otherwise noted, statistical significance was determined using unpaired two-tailed Student's t test. *p<0.05. ** p<0,01. *** p<0,001

Supplemental Figure 2: Periosteal stem cells expansion after transplantation.

- (A) Representative FACS plots of graft periosteum and bone marrow analysis gated on alive cells at steady state, 1, 8 and 15 days post transplantation.
- (B) Percentage of total dapi negative alive cells in the periosteum graft at steady state, 1, 3, 8,15 days and 3 months after bone transplantation (n=3-4 per time point)
- (C) Representative whole-mount confocal z-stack projections of a Nestin-GFP^{pos} bone graft 15 days after transplantation showing the expansion of Nestin-GFP^{pos} P-SSCs. (scale bare = 50 μm). Three independent experiments yielded similar results.

Supplemental Figure 3: Periosteal stem cell migration tracking.

- (A) Pictures illustrating the transplantation of a wild-type bone enwrapped with periosteum from a UBC-GFP mouse donor into a WT recipient mouse.
- (B) Representative whole-mount confocal z-stack projections of a graft from a WT mouse enwrapped with periosteum from a UBC-GFP mouse 5 months after transplantation into a WT recipient. Magnification showing a periosteal GFP^{pos} derived endothelial cell. Endothelial cells are stained using an antibody directed against endomucin. Scale bar: 20 μ m (left); 10 μ m (magnification). Three independent experiments yielded similar results.
- (C) Quantification of *Opn* and *Angpt1* mRNA level relative to *Gapdh* in sorted control bone marrow CD45^{neg}Ter119^{neg}CD31^{neg}Nestin-GFP^{pos} BM-MSCs, CD45^{neg}Ter119^{neg}CD31^{neg}CD51^{pos}CD200^{pos}GFP^{neg} graft BM-MSCs and CD45^{neg}Ter119^{neg}CD31^{neg}CD51^{pos}CD200^{pos}GFP^{pos} graft BM-MSCs (n = 3-4 per group)
- Data represented as mean \pm SEM. Unless otherwise noted, statistical significance was determined using unpaired two-tailed Student's t test. *p<0.05. ** p<0,01. *** p<0,001

Supplemental Figure 4: Postn-Cre^{ER} mouse model characterization

- (A) Representative whole-mount confocal z-stack projections of a femur from a Postn-Cre^{ER}; Tmt mouse at steady state showing the labeling of periosteal perivascular cells. Periosteum is stained using an anti-periostin antibody. Scale bar : 100 μ m (left); 50 μ m (right). Three independent experiments yielded similar results.
- (B) Representative whole-mount confocal z-stack projections of a femur from a Postn-Cre^{ER}; Tmt mouse at steady state showing the labeling of few osteoblasts. Osteoblasts are stained using an anti-osteocalcin antibody. Scale bar : 50 μ m. Three independent experiments yielded similar results.
- (C) Representative whole-mount confocal z-stack projections of a graft bone marrow one month after transplantation showing the in-vivo adipocytic differentiation of periosteum-derived Tmt+ stromal cells. Adipocyte are stained using an anti-perilipin antibody. Scale bar = 20 μ m. Three independent experiments yielded similar results.

STAR ★ METHODS

KEY RESOURCES TABLE

LEAD CONTACT AND MATERIALS AVAILABILITY

Further information and requests for resources and reagents should be addressed to the lead contact, Dr Tony Marchand, at tony.marchand@chu-rennes.fr

METHODS DETAILS

Mice

C57BL/6J were bred in our facilities or ordered from Jackson Laboratory. B6.129-Postn^{tm2.1(cre/Esr1*)Jmol}/J were ordered from Jackson Laboratory then bred in our facilities. Nestin-GFP, B6.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato, -EGFP)Luo/J (Rosa26mTmG), C57BL/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J (UBC-GFP) mice were bred in our facilities. Unless otherwise specified, 6-12 weeks old mice were used for the experiments. For all analytical and therapeutic experiments, sex-matched animals from the same age group were randomly assigned to experimental groups. This study complied with all ethical regulations involving experiments with mice, and the Animal Care and Use Committee of Albert Einstein College of Medicine approved all experimental procedures.

Bone transplantation procedure

Donor mice were sacrificed by cervical dislocation. Femurs were isolated and preserved in an ice-cold saline solution with 1% FBS. Recipient mice were anesthetized with a Ketamine/Xylazine intraperitoneal injection (10 μ L/g). Donor femurs were subcutaneously implanted and skin sutured with a non-absorbable polyamide 5/0 silk.

In-vivo treatment

Tamoxifen was administered intraperitoneally (i.p.) every other day at 1mg/day for five doses for Postn-Cre^{ER} induction.

For lineage tracing experiments using femurs from Postn^{tm2.1(cre/Esr1*)Jmol}/J donor mice, tamoxifen (1mg/mouse) was administered intraperitoneally to recipient mice twice daily for 10 consecutive days starting at day 2 post transplantation.

Preparation of single cell suspensions

Bone marrow cells were obtained by flushing and dissociating using a 1-ml syringe with PBS via a 21-gauge needle. For analysis of stromal and endothelial cell populations, intact flushed

bone marrow plugs were digested at 37 °C for 30 min in 1 mg.ml⁻¹ collagenase type IV (Gibco), 2 mg.ml⁻¹ Dispase (Gibco) and 500 µg.ml⁻¹ DNase I (Sigma-Aldrich) in Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco). To isolate P-SSCs, muscles were carefully removed using scissors and intact bones incubated 30 minutes in ice-cold PBS with 1% fetal bovine serum (FBS). Periosteum was then removed with a surgical blade and a mechanic dissociation performed using scissors. Enzymatic dissociation was performed by incubating the periosteum's fragments during 45 minutes at 37°C in the digestion buffer. After bone marrow and periosteum isolation, the remaining compact bone was crushed, mechanically dissociated using scissor as previously described (Gulati *et al.*, 2018) and digested in digestion buffer, rotating for 45 minutes at 37°C. Enzymatic digestion was stopped by adding ice-cold PEB buffer (PBS with 0.5% BSA and 2mM EDTA).

Flow cytometry and sorting

For FACS analysis and sorting, red blood cells were lysed and washed in ice-cold PEB (PBS containing 0.5% BSA and 2 mM EDTA) before staining with antibodies in PEB during 20 minutes on ice. Dead cells and debris were excluded by FSC (forward scatter), SSC (side scatter) and DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole ; Sigma). FACS analyses were carried out using BD LSRII flow cytometry (BD Biosciences) and cell sorting experiments were performed using a MoFlo Astrios (Beckman Coulter). Data were analysed with FlowJo 10.4.0 (LCC) and FACS Diva 6.1 software (BD Biosciences).

For the metabolic assays, cells were first stained for extracellular marker. For the ROS quantification, cells were incubated with DHE (1:1000; Molecular Probes) or MitoSOX (1:1000; ThermoFisher) for the intracellular and mitochondrial ROS respectively during 20 minutes at 37°C in PBS. To quantify the membrane potential and mitochondrial mass, cells were incubated during 20 minutes at 37°C with TMRE (1:10000; ThermoFisher), Mitotraker (1:20000; ThermoFisher) and verapamil (1:500) in HBSS w/o calcium and magnesium (Gibco). Glucose uptake quantification was performed by incubating the cells in DMEM w/o glucose (Gibco) containing Glutamax (1:100; Gibco) and 2-NBDG (17µmol.mL; Cayman Chemical Company) during 30 minutes at 37°C.

Cell cycle and apoptosis analysis

Analyses of the cell cycle were performed as described previously (Kunisaki *et al.*, 2013). Briefly, single-cell suspension was stained for cell surface markers and subsequently fixed with Cytofix/Cytoperm fixation and permeabilization solution (BD Biosciences), according to the manufacturer's instructions. The cells were then stained with anti-Ki-67 antibody (eBioscience) and Hoechst 33342 (Sigma) at 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for 30 min.

Apoptosis quantification was performed using the CellEvent Caspase 3/7 kit (ThermoFisher) and Annexin V : FITC Apoptosis Detection kit (BD Biosciences) following the manufacturer's recommendations.

In vitro culture assays.

For CFU-F and stromal cells culture, CD45^{neg}Ter119^{neg}CD31^{neg}CD51^{pos}CD200^{pos} stromal cells isolated from bone marrow and periosteum were sorted and plated at clonal density (1,000 cell/well) in α -MEM (Gibco) containing 20% FBS (Hyclone), 10% MesenCult Stimulatory supplement (StemCell Technologies) and 1% Penicilline-Streptomycine. Half of the medium was changed at day 7. Cells were cultured for 12-14 days, at the end of which the colonies were scored.

For apoptosis assay, whole bone marrow from 1 femur and whole periosteum from 2 femurs were isolated and digested as previously described and plated in α -MEM (Gibco) containing 20% FBS (Hyclone), 1% Penicillin-Streptomycin, 1% L-glutamine and β FGF. Media was changed every 3-4 days. Once a plate has reached near confluence, CD45 lineage depletion was performed. Cells were then counted and plated in 12- or 24-well plates

Immunofluorescence imaging

To stain blood vessels, anti-CD31 and anti-CD144 antibodies were injected intravenously to mice (10 μg , 20 μL of 0.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) and mice were killed for analysis 10 min after injection. For frozen sections of long bones, femurs and tibias were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) overnight at 4 °C. For cryopreservation, the bones were incubated sequentially in 10%, 20%, and 30% sucrose/PBS at 4 °C for 1h each, embedded and flash frozen in SCEM embedding medium (SECTION-LAB). Frozen sections were prepared 20 μm thick with a Cryostat (CM3050, Leica) using Kawamoto's tape transfer method (Kawamoto and Shimizu, 2000). For

immunofluorescence staining, sections were rinsed with PBS, postfixed with 4% cold PFA for 10 min followed by blocking with 20% donkey serum (DS; Sigma) in 0.5% Triton X-100/PBS for 3 h at room temperature (20–25 °C). For perilipin and osteocalcin staining, sections were incubated 1h at room temperature in saturation buffer (PBS-donkey serum 10%). Rabbit polyclonal anti-perilipin antibody (clone: D1D8; Cat: 9349; Cell Signaling Technology) and anti-osteocalcin antibody (Clone R21C-01A; Cat: M188; Takara) were used at 1:100 dilution in 2% Donkey serum 0.1% Triton X-100/PBS overnight at 4 °C. For periostin staining using whole mount imaging, bone marrow was exposed by shaving the bone using a cryostat (CM3050, Leica). Samples were fixed 30 minutes at 4°C in PBS/PFA 4%. Samples were then incubated in the saturation buffer (PBS-donkey serum 10%) during 1 hour at room temperature. Anti-periostin antibody (Cat: AF2955; R&D) was used at 1:100 dilution overnight at 4°C in PBS-donkey serum 2%. When necessary, primary antibody staining was followed by 3 washes with 2% DS 0.1% Triton X-100/PBS and 30 min incubation with Alexa Fluor 568-conjugated secondary antibody (Invitrogen) and 0.2% DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole; Sigma).

All images were acquired at room temperature using a Zeiss Axio examiner D1 microscope (Zeiss) with confocal scanner unit (Yokogawa), and reconstructed in three dimensions with Slide Book software (Intelligent Imaging Innovations). Image analysis was performed using both Slide Book software (Intelligent Imaging Innovations) and the Fiji build of ImageJ (NIH).

RNA isolation and quantitative real time PCR (q-PCR)

Stromales cells were sorted in a lysis buffer (Invitrogen). RNA were purified using Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit (Life technologies - Invitrogen) and reverse transcription performed using RNA to cDNA EcoDry™ Premix (Clontech - Takara bio) following the manufacturer instructions. SYBR green (Roche) technic was used for quantitative PCR using QuantStudio 6 Flex system (Applied Biosystems, ThermoFisher). All mRNA expression levels were calculated relative to Gapdh or Actb. The sequences of the oligonucleotides used can be provided upon reasonable request.

Statistical analysis

All data are presented as mean±s.e.m. n represents the number of mice in each experiment, as detailed in the figure legends. No statistical method was used to predetermine sample

sizes; sample sizes were determined by previous experience with similar models of hematopoiesis, as shown in previous experiments done in our laboratory. Statistical significance was determined by an unpaired, two-tailed Student's t-test to compare two groups or a one-way ANOVA for multiple group comparisons. Statistical analyses were performed and data presented using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software), FACS Diva 6.1 software (BD Biosciences, FlowJo 10.4.0 (LLC), Slide Book Software 6.0 (Intelligent Imaging Innovations) and QuantStudio 6 Real-Time PCR Software (Applied Biosystem, Thermo Fisher). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Colette Prophete and Paul Ciero for technical assistance; Lydia Tesfa and the Einstein Flow Cytometry Core Facility for expert cell sort assistance. T.M. is supported by the « Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer », the « Association pour le Développement de l'Hématologie Oncologie », the « Société Française d'Hématologie » and the Philip foundation.

REFERENCES

- 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. 10.1038/nature15250.
- 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. 10.1016/j.cell.2004.07.004.
- Arnsdorf, E.J., Jones, L.M., Carter, D.R., and Jacobs, C.R. (2009). The periosteum as a cellular source for functional tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 15, 2637-2642. 10.1089/ten.TEA.2008.0244.
- 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. 10.1038/ncb3475.
- Blashki, D., Murphy, M.B., Ferrari, M., Simmons, P.J., and Tasciotti, E. (2016). Mesenchymal stem cells from cortical bone demonstrate increased clonal incidence, potency, and developmental capacity compared to their bone marrow-derived counterparts. *J Tissue Eng* 7, 2041731416661196. 10.1177/2041731416661196.
- Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9, 641-650. 10.1002/jor.1100090504.

Chan, C.K., Seo, E.Y., Chen, J.Y., Lo, D., McArdle, A., Sinha, R., Tevlin, R., Seita, J., Vincent-Tompkins, J., Wearda, T., et al. (2015). Identification and specification of the mouse skeletal stem cell. *Cell* *160*, 285-298. 10.1016/j.cell.2014.12.002.

Conway, S.J., Izuhara, K., Kudo, Y., Litvin, J., Markwald, R., Ouyang, G., Arron, J.R., Holweg, C.T., and Kudo, A. (2014). The role of periostin in tissue remodeling across health and disease. *Cell Mol Life Sci* *71*, 1279-1288. 10.1007/s00018-013-1494-y.

Debnath, S., Yallowitz, A.R., McCormick, J., Lalani, S., Zhang, T., Xu, R., Li, N., Liu, Y., Yang, Y.S., Eiseman, M., et al. (2018). Discovery of a periosteal stem cell mediating intramembranous bone formation. *Nature* *562*, 133-139. 10.1038/s41586-018-0554-8.

Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G., and Morrison, S.J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* *481*, 457-462. 10.1038/nature10783.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* *8*, 315-317. 10.1080/14653240600855905.

Duchamp de Lageneste, O., Julien, A., Abou-Khalil, R., Frangi, G., Carvalho, C., Cagnard, N., Cordier, C., Conway, S.J., and Colnot, C. (2018). Periosteum contains skeletal stem cells with high bone regenerative potential controlled by Periostin. *Nat Commun* *9*, 773. 10.1038/s41467-018-03124-z.

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. 10.1146/annurev-immunol-032712-095919.

Friedenstein, A.J., Petrakova, K.V., Kurolesova, A.I., and Frolova, G.P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* *6*, 230-247.

Grassinger, J., Haylock, D.N., Storan, M.J., Haines, G.O., Williams, B., Whitty, G.A., Vinson, A.R., Be, C.L., Li, S., Sørensen, E.S., et al. (2009). Thrombin-cleaved osteopontin regulates hemopoietic stem and progenitor cell functions through interactions with alpha9beta1 and alpha4beta1 integrins. *Blood* *114*, 49-59. 10.1182/blood-2009-01-197988.

Greenbaum, A., Hsu, Y.M., Day, R.B., Schuettpelz, 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. 10.1038/nature11926.

Gulati, G.S., Murphy, M.P., Marecic, O., Lopez, M., Brewer, R.E., Koepke, L.S., Manjunath, A., Ransom, R.C., Salhotra, A., Weissman, I.L., et al. (2018). Isolation and functional assessment of mouse skeletal stem cell lineage. *Nat Protoc* *13*, 1294-1309. 10.1038/nprot.2018.041.

Ito, K., and Suda, T. (2014). Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* *15*, 243-256. 10.1038/nrm3772.

Julien, A., Perrin, S., Duchamp de Lageneste, O., Carvalho, C., Bensidhoum, M., Legeai-Mallet, L., and Colnot, C. (2020). FGFR3 in Periosteal Cells Drives Cartilage-to-Bone Transformation in Bone Repair. *Stem Cell Reports* *15*, 955-967. 10.1016/j.stemcr.2020.08.005.

- Kawamoto, T., and Shimizu, M. (2000). A method for preparing 2- to 50-micron-thick fresh-frozen sections of large samples and undecalcified hard tissues. *Histochem Cell Biol* *113*, 331-339. 10.1007/s004180000149.
- 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. 10.1038/nature12612.
- Liu, S., Lockhart, J.R., Fontenard, S., Berlett, M., and Ryan, T.M. (2020). Mapping the Chromosomal Insertion Site of the GFP Transgene of UBC-GFP Mice to the MHC Locus. *The Journal of Immunology* *204*, 1982-1987. 10.4049/jimmunol.1901338.
- 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. *Nature Medicine* *19*, 695-703. 10.1038/nm.3155.
- Lyublinskaya, O.G., Borisov, Y.G., Pugovkina, N.A., Smirnova, I.S., Obidina, J.V., Ivanova, J.S., Zenin, V.V., Shatrova, A.N., Borodkina, A.V., Aksenov, N.D., et al. (2015). Reactive Oxygen Species Are Required for Human Mesenchymal Stem Cells to Initiate Proliferation after the Quiescence Exit. *Oxid Med Cell Longev* *2015*, 502105. 10.1155/2015/502105.
- Mendez-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. 10.1038/nature09262.
- Mizoguchi, T., Pinho, S., Ahmed, J., Kunisaki, Y., Hanoun, M., Mendelson, A., Ono, N., Kronenberg, H.M., and Frenette, P.S. (2014). Osterix marks distinct waves of primitive and definitive stromal progenitors during bone marrow development. *Dev Cell* *29*, 340-349. 10.1016/j.devcel.2014.03.013.
- Mortimer, P.M., Mc Intyre, S.A., and Thomas, D.C. (2021). Beyond the Extra Respiration of Phagocytosis: NADPH Oxidase 2 in Adaptive Immunity and Inflammation. *Front Immunol* *12*, 733918. 10.3389/fimmu.2021.733918.
- Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., and Luo, L. (2007). A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *genesis* *45*, 593-605. 10.1002/dvg.20335.
- 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. 10.1182/blood-2004-11-4422.
- Oka, T., Xu, J., Kaiser, R.A., Melendez, J., Hambleton, M., Sargent, M.A., Lorts, A., Brunskill, E.W., Dorn, G.W., Conway, S.J., et al. (2007). Genetic Manipulation of Periostin Expression Reveals a Role in Cardiac Hypertrophy and Ventricular Remodeling. *Circulation Research* *101*, 313-321. 10.1161/circresaha.107.149047.
- Pinho, S., and Frenette, P.S. (2019). Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* *20*, 303-320. 10.1038/s41580-019-0103-9.
- Pinho, S., Lacombe, J., Hanoun, M., Mizoguchi, T., Bruns, I., Kunisaki, Y., and Frenette, P.S. (2013). PDGFRalpha and CD51 mark human nestin+ sphere-forming mesenchymal stem cells

capable of hematopoietic progenitor cell expansion. *J Exp Med* 210, 1351-1367. 10.1084/jem.20122252.

Roberts, S.J., Owen, H.C., Tam, W.L., Solie, L., Van Cromphaut, S.J., Van Den Berghe, G., and Luyten, F.P. (2014). Humanized Culture of Periosteal Progenitors in Allogeneic Serum Enhances Osteogenic Differentiation and In Vivo Bone Formation. *STEM CELLS Translational Medicine* 3, 218-228. 10.5966/sctm.2012-0137.

Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P.G., Riminucci, M., and Bianco, P. (2007). Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 131, 324-336. 10.1016/j.cell.2007.08.025.

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 e577. 10.1016/j.stem.2019.06.003.

Shapiro, F. (2008). Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater* 15, 53-76. 10.22203/ecm.v015a05.

Stier, S., Ko, Y., Forkert, R., Lutz, C., Neuhaus, T., Grünewald, E., Cheng, T., Dombkowski, D., Calvi, L.M., Rittling, S.R., and Scadden, D.T. (2005). Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med* 201, 1781-1791. 10.1084/jem.20041992.

Suda, T., Takubo, K., and Semenza, G.L. (2011). Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 9, 298-310. 10.1016/j.stem.2011.09.010.

Tavassoli, M., and Crosby, W.H. (1968). Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science* 161, 54-56. 10.1126/science.161.3836.54.

Wang, Q., Huang, C., Zeng, F., Xue, M., and Zhang, X. (2010). Activation of the Hh pathway in periosteum-derived mesenchymal stem cells induces bone formation in vivo: implication for postnatal bone repair. *Am J Pathol* 177, 3100-3111. 10.2353/ajpath.2010.100060.

Wang, T., Zhang, X., and Bikle, D.D. (2017). Osteogenic Differentiation of Periosteal Cells During Fracture Healing. *J Cell Physiol* 232, 913-921. 10.1002/jcp.25641.

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. 10.1038/s41467-018-04726-3.

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.

Zhang, D.Y., Pan, Y., Zhang, C., Yan, B.X., Yu, S.S., Wu, D.L., Shi, M.M., Shi, K., Cai, X.X., Zhou, S.S., et al. (2013). Wnt/beta-catenin signaling induces the aging of mesenchymal stem cells through promoting the ROS production. *Mol Cell Biochem* 374, 13-20. 10.1007/s11010-012-1498-1.

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. 10.1038/ncb3570.

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. 10.1016/j.stem.2014.06.008.

Figure 1

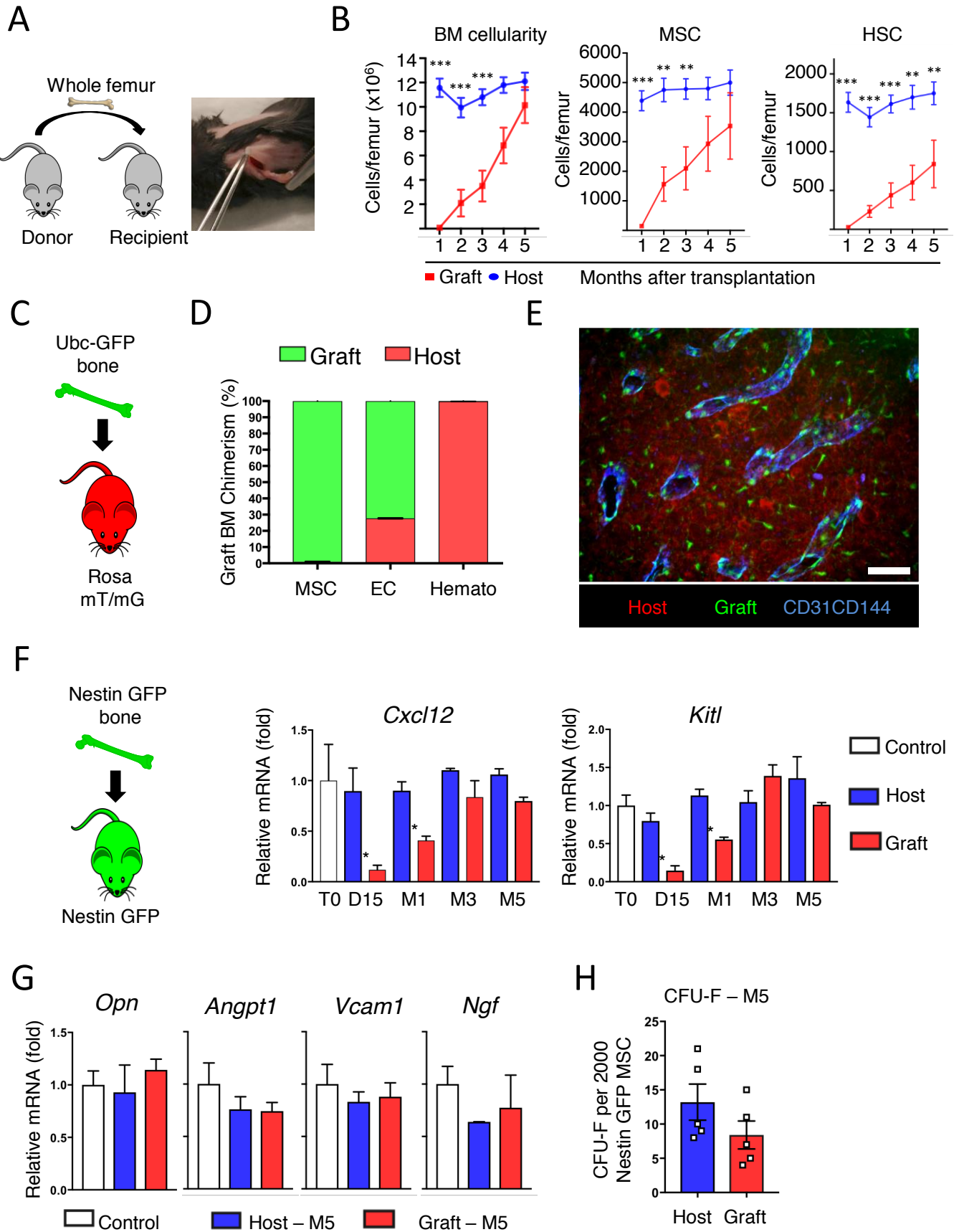
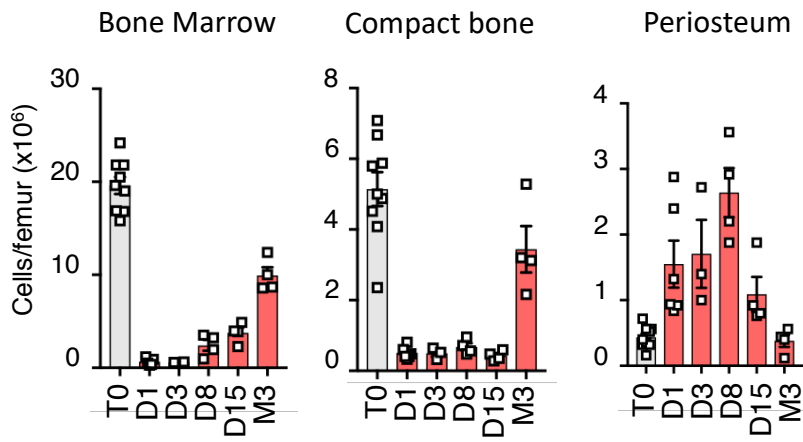
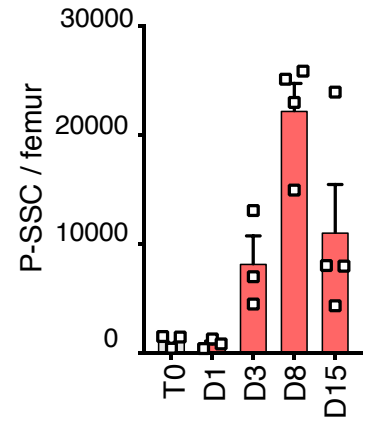


Figure 2

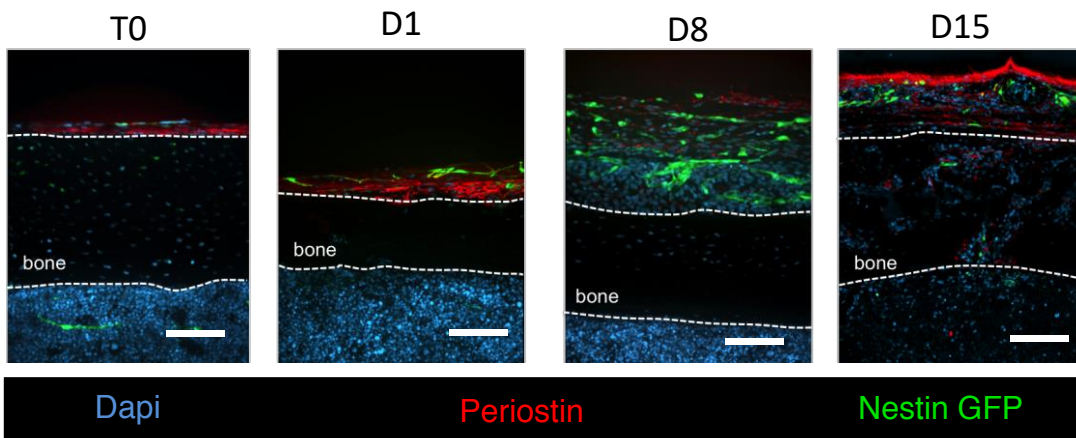
A



B



C



D

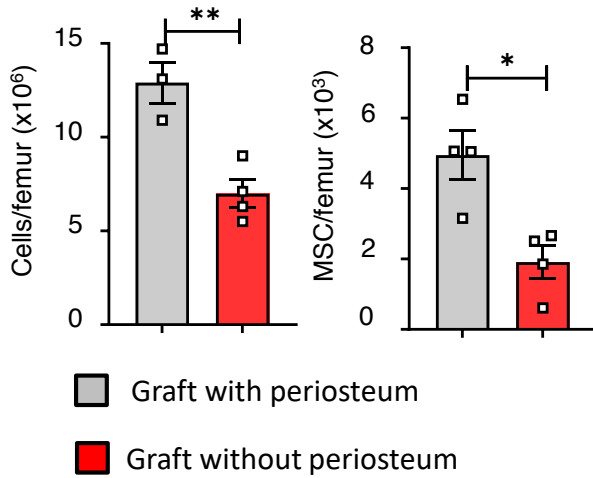


Figure 3

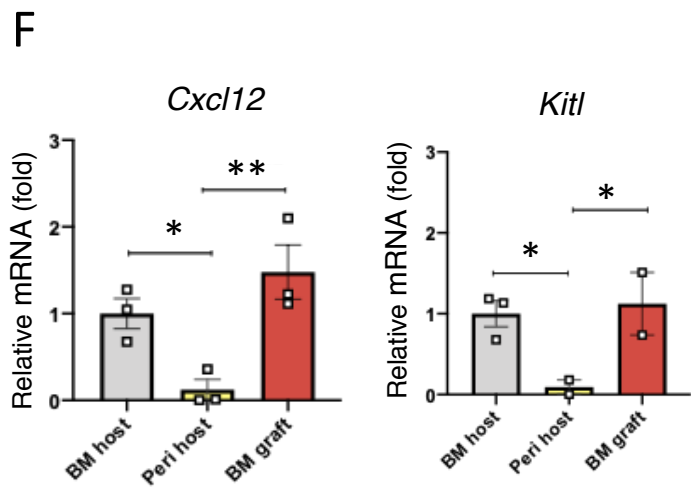
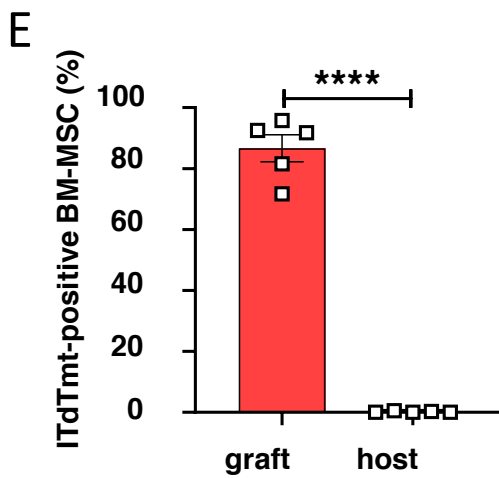
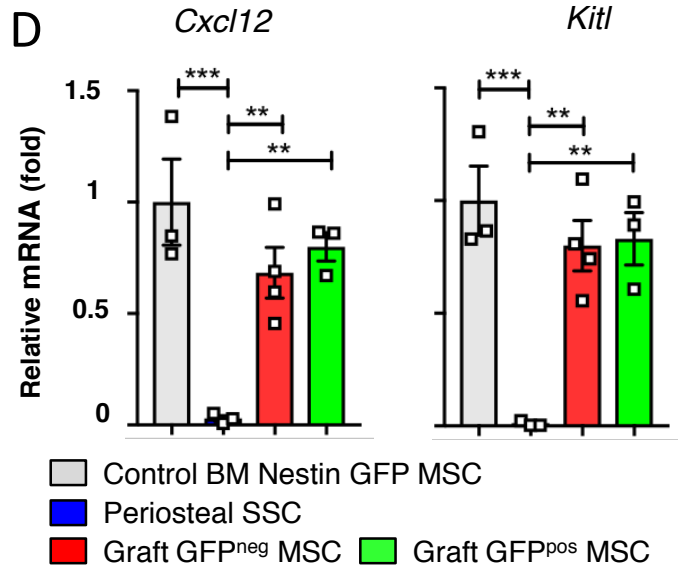
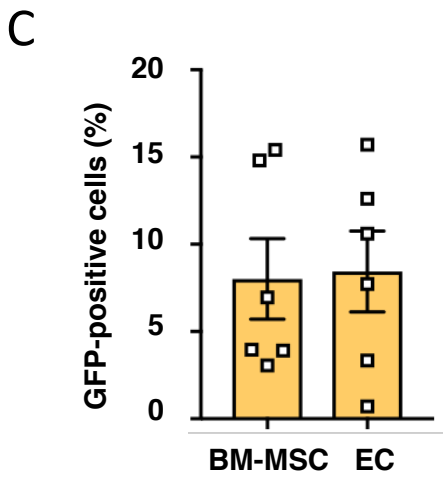
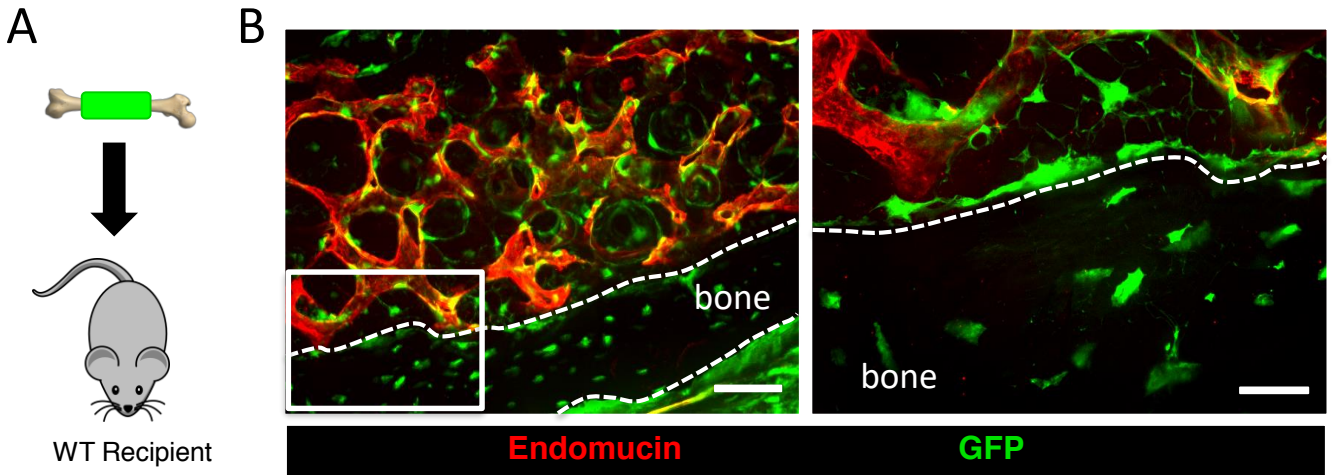
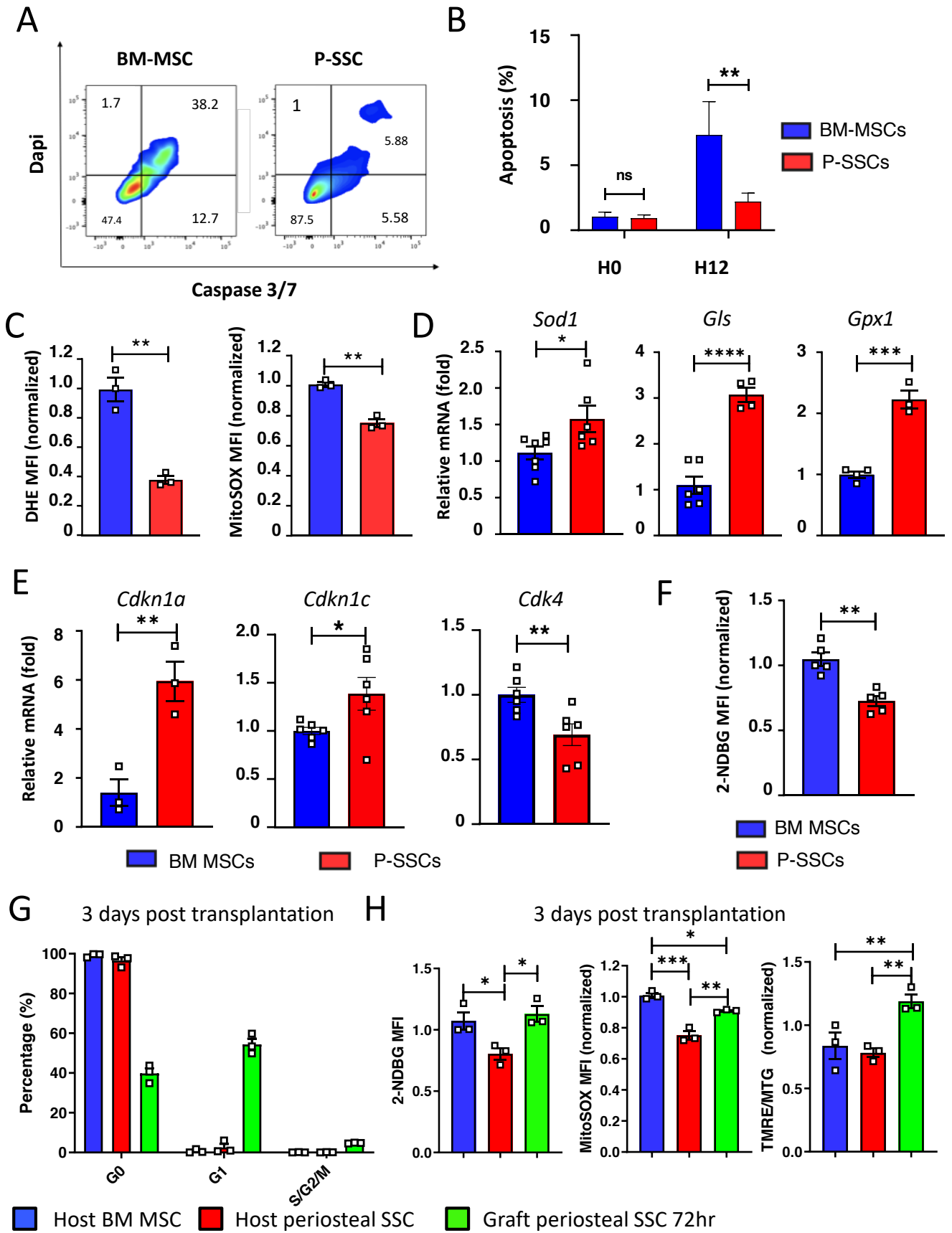
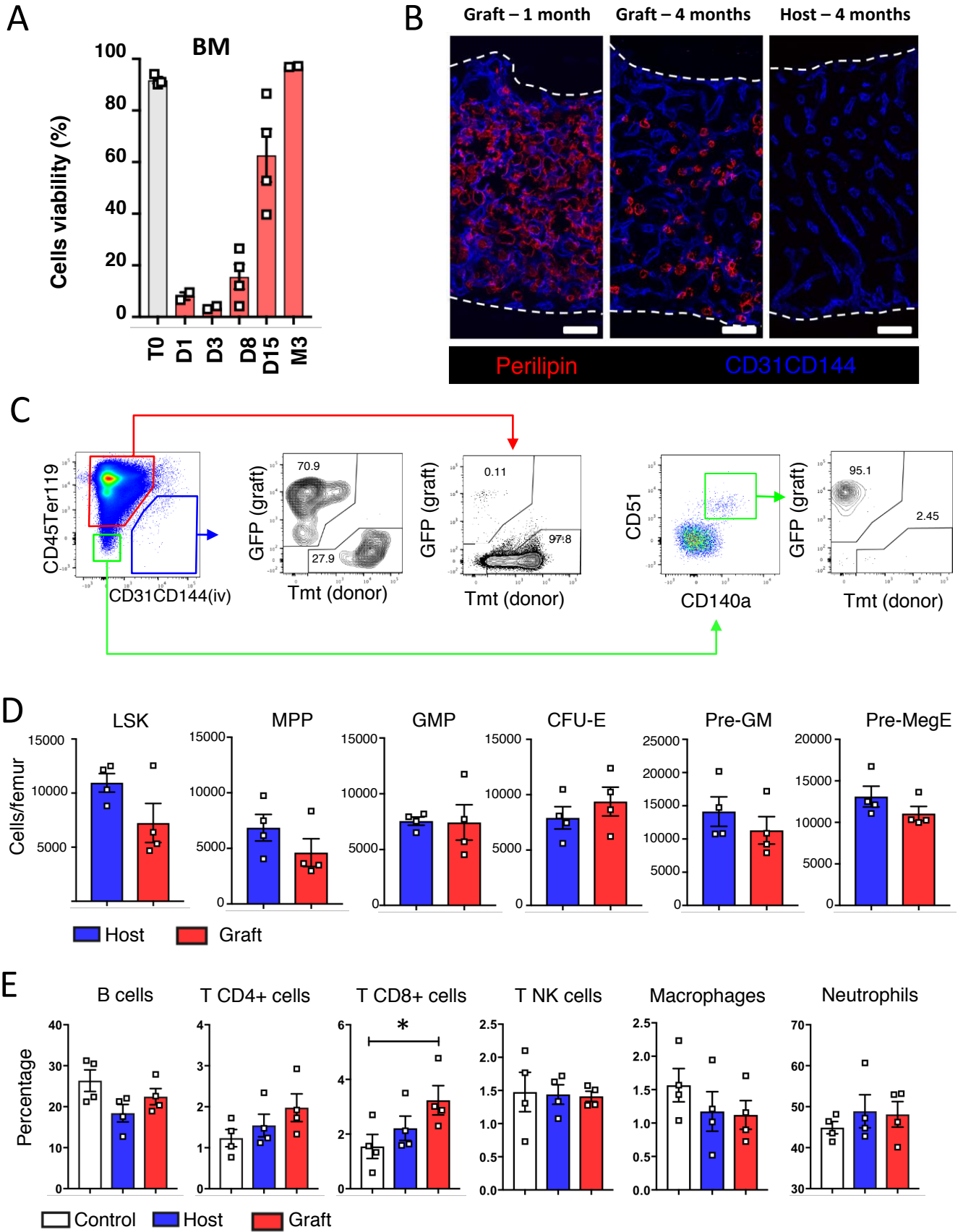


Figure 4

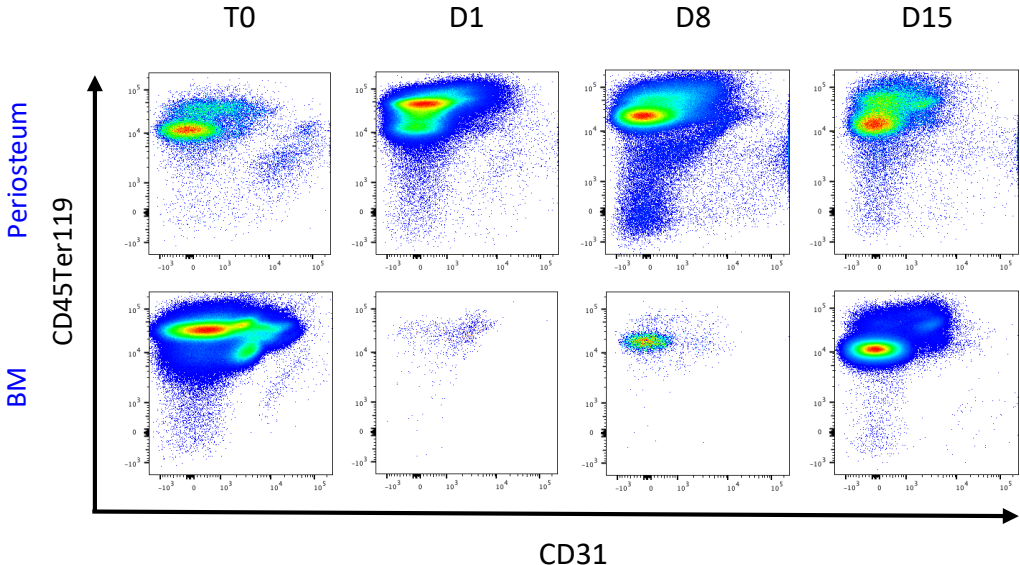


Suppl Figure 1

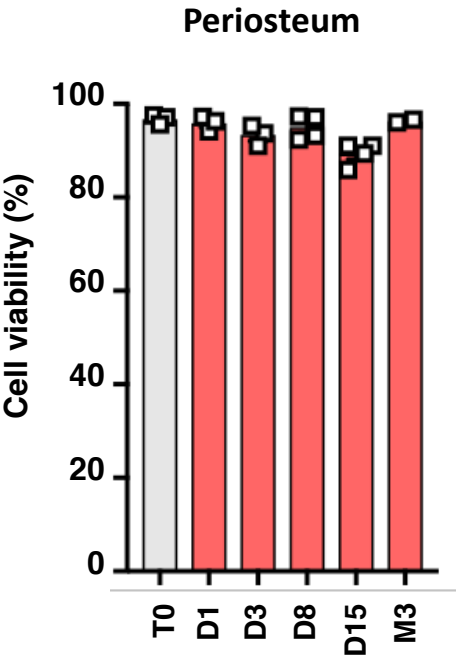


Suppl Figure 2

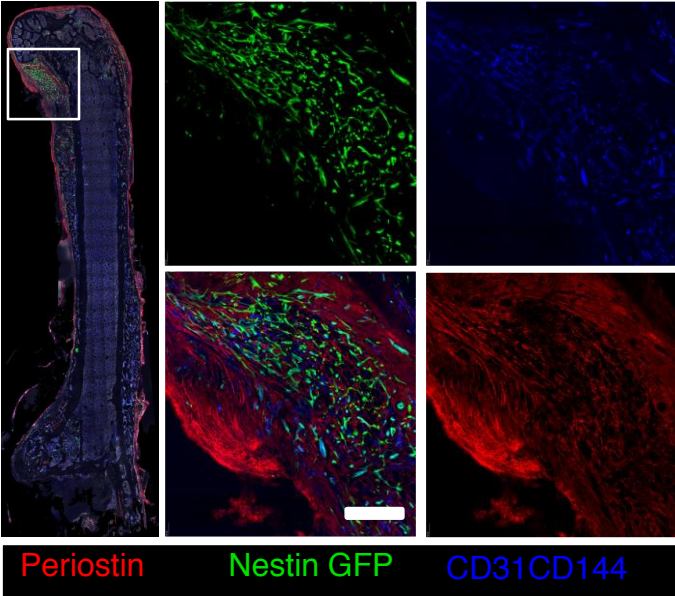
A



B

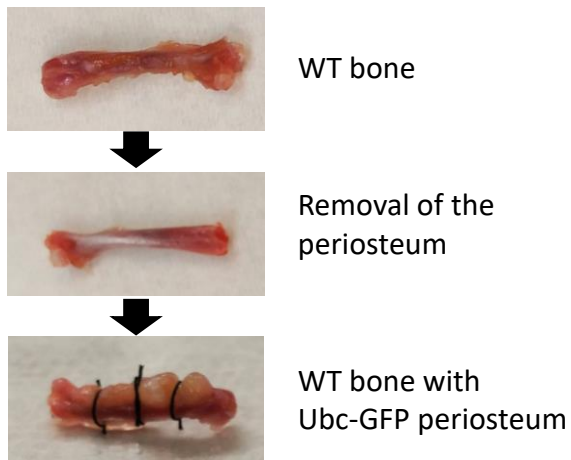


C

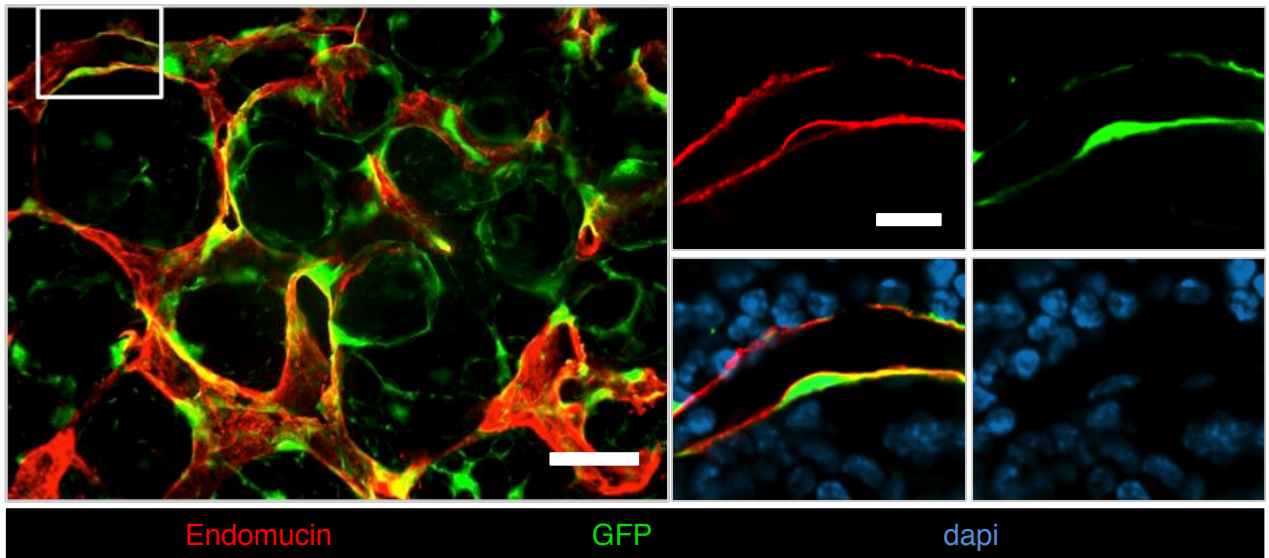


Suppl Figure 3

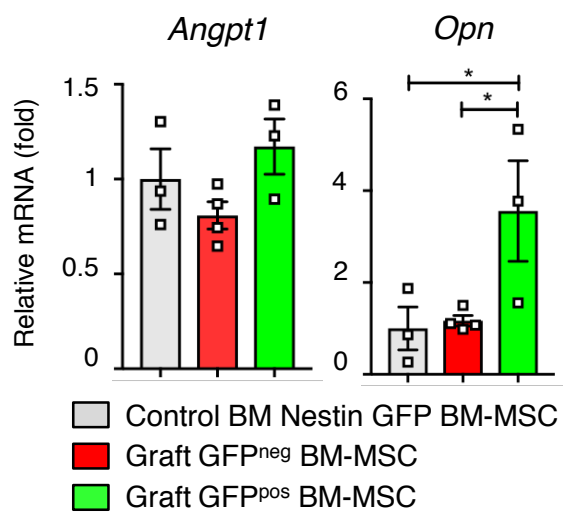
A



B

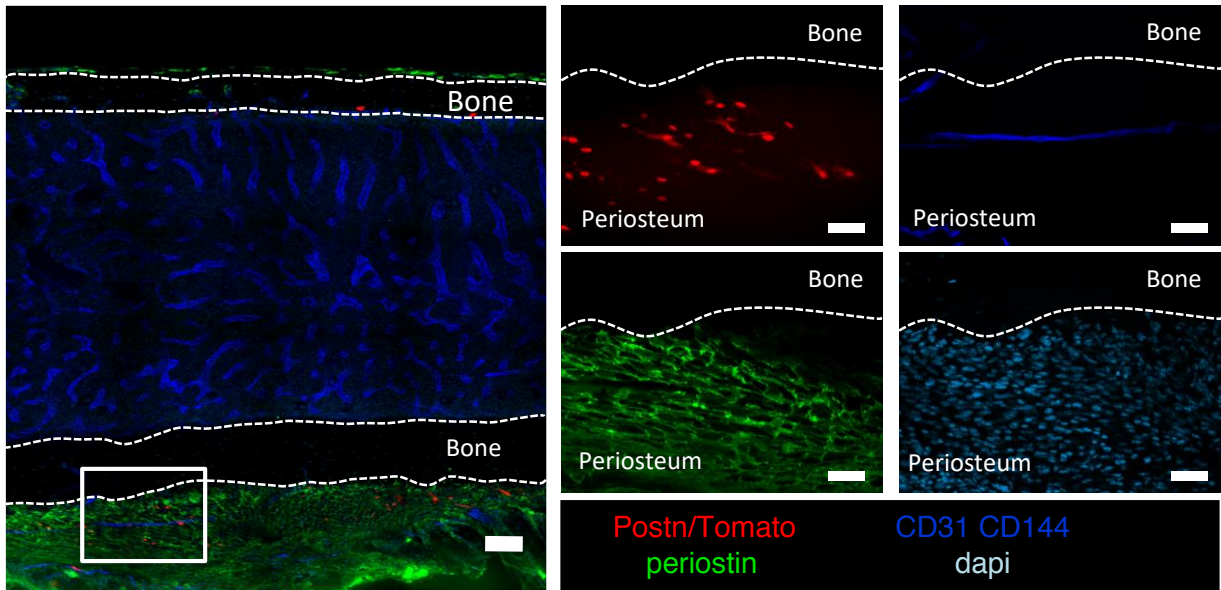


C

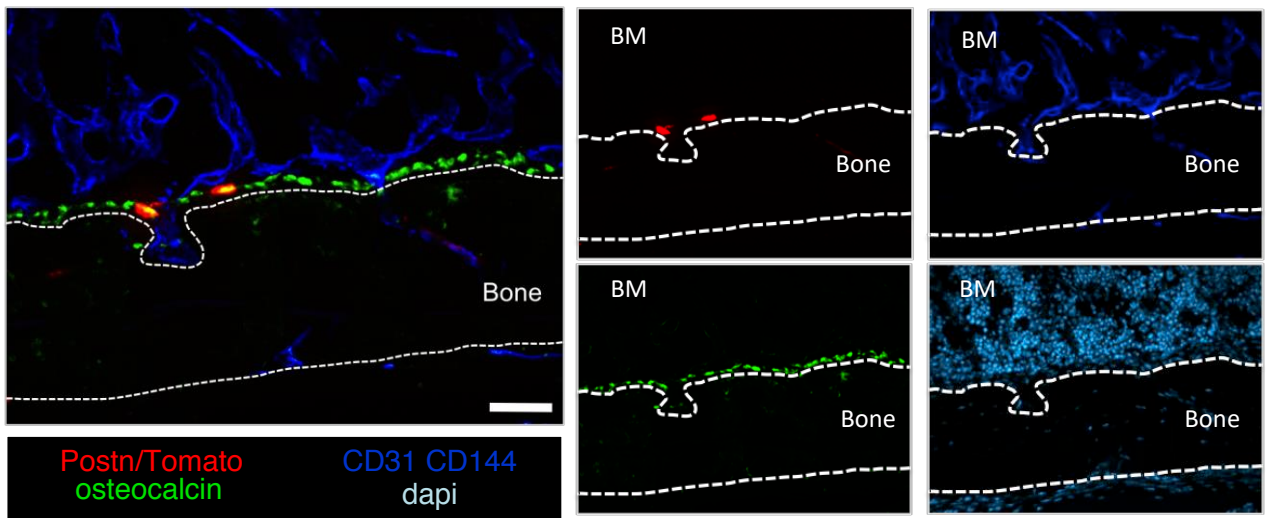


Suppl Figure 4

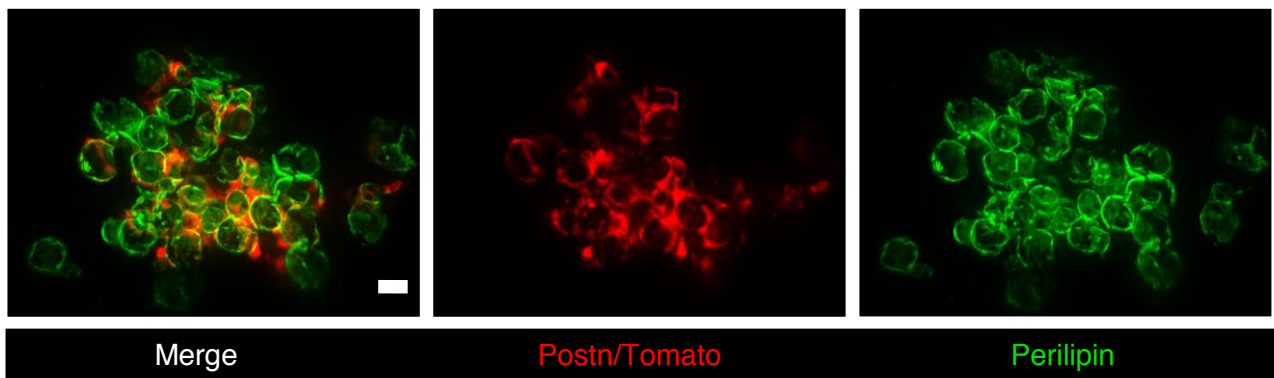
A



B



C



ARTICLE 2

Lineage-Biased Hematopoietic Stem Cells Are Regulated by Distinct Niches

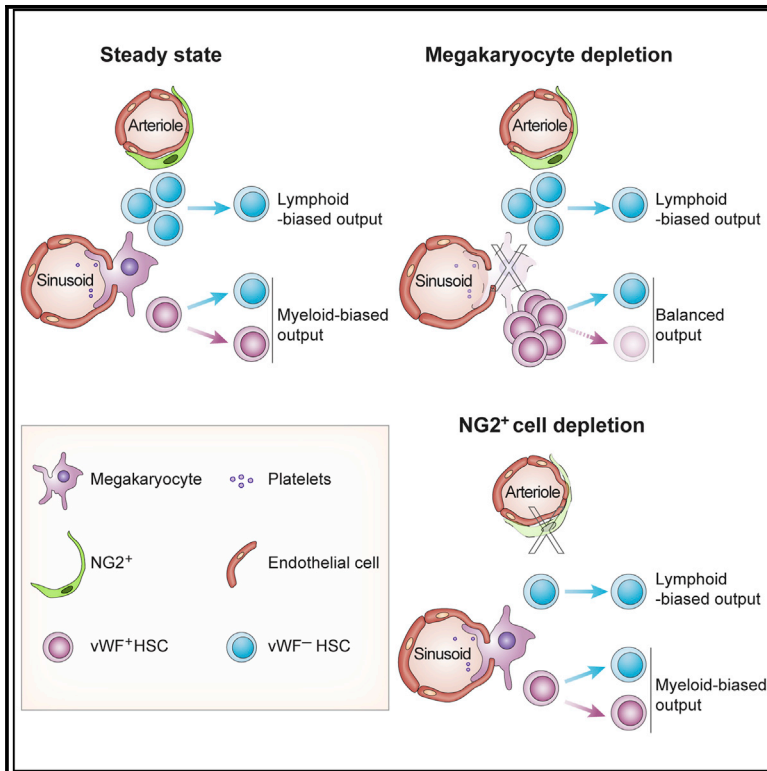
Pinho S, Marchand T, Yang E, Wei Q, Nerlov C, Frenette PS

Dev Cell. 2018;44(5):634-641.e4. doi:10.1016/j.devcel.2018.01.016

Developmental Cell

Lineage-Biased Hematopoietic Stem Cells Are Regulated by Distinct Niches

Graphical Abstract



Authors

Sandra Pinho, Tony Marchand, Eva Yang, Qiaozhi Wei, Claus Nerlov, Paul S. Frenette

Correspondence

paul.frenette@einstein.yu.edu

In Brief

Pinho et al. show that myeloid- and lymphoid-biased HSCs are located in, and regulated by, separate bone marrow niches occupied by megakaryocytes (MK) and arterioles, respectively. MK niches may also regulate HSC fate since MK deletion reprograms myeloid-biased HSCs to balanced-lineage contributions.

Highlights

- Platelet- and myeloid-biased vWF⁺ HSCs associate with MK, but not arteriolar niches
- vWF⁺, but not lymphoid-biased vWF⁻ HSC proliferation, is regulated by MK
- vWF⁺ HSC reconstitution potential is regulated by MK
- NG2⁺ arteriolar niches selectively regulate vWF⁻ HSC quiescence and localization



Lineage-Biased Hematopoietic Stem Cells Are Regulated by Distinct Niches

Sandra Pinho,^{1,2,3} Tony Marchand,^{1,2,4} Eva Yang,^{1,2} Qiaozhi Wei,^{1,2} Claus Nerlov,⁵ and Paul S. Frenette^{1,2,3,6,*}

¹Ruth L. and David S. Gottesman Institute for Stem Cell and Regenerative Medicine, Albert Einstein College of Medicine, Michael F. Price Center, 1301 Morris Park Avenue, Bronx, NY 10461, USA

²Department of Cell Biology, Albert Einstein College of Medicine, Michael F. Price Center, 1301 Morris Park Avenue, Room 101, Bronx, NY 10461, USA

³Department of Medicine, Albert Einstein College of Medicine, Michael F. Price Center, 1301 Morris Park Avenue, Room 101, Bronx, NY 10461, USA

⁴INSERM U1236, Université Rennes 1, Rennes, France

⁵MRC Molecular Haematology Unit, Weatherall Institute of Molecular Medicine, University of Oxford, Oxford, UK

⁶Lead Contact

*Correspondence: paul.frenette@einstein.yu.edu

<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.01.016>

SUMMARY

The spatial localization of hematopoietic stem cells (HSCs) in the bone marrow (BM) remains controversial, with some studies suggesting that they are maintained in homogeneously distributed niches while others have suggested the contributions of distinct niche structures. Subsets of quiescent HSCs have been reported to associate with megakaryocytes (MK) or arterioles in the BM. However, these HSC subsets have not been prospectively defined. Here, we show that platelet and myeloid-biased HSCs, marked by von Willebrand factor (vWF) expression, are highly enriched in MK niches. Depletion of MK selectively expands vWF⁺ HSCs, whereas the depletion of NG2⁺ arteriolar niche cells selectively depletes vWF⁻ lymphoid-biased HSCs. In addition, MK depletion compromises vWF⁺ HSC function by reducing their long-term self-renewal capacity and eliminating their lineage bias after transplantation. These studies demonstrate the existence of two spatially and functionally separate BM niches for HSC subsets with distinct developmental potential.

INTRODUCTION

Despite intense investigation, there remains controversy about the precise location of hematopoietic stem cells (HSCs) in the bone marrow (BM). Initial studies have suggested a close relationship with osteoblasts in the endosteal region (Zhang et al., 2003). Subsequent studies, with the advent of SLAM markers, have shown that CD150⁺ CD48⁻ Lineage⁻ CD41⁻ HSCs were distributed broadly in close proximity of endothelial and Nestin-GFP⁺ perivascular cells (Kiel et al., 2005; Mendez-Ferrer et al., 2010). Further improvement in imaging technologies allowing tridimensional (3D) visualization of endogenous HSCs in the BM have uncovered heterogeneity among Nestin-GFP⁺ cells, with a subset of quiescent HSCs showing a significant associa-

tion with Nestin-GFP-bright arteriole structures. Upon deletion of periaarteriolar NG2⁺ stromal cells or after inducing HSC proliferation, HSCs were shown to redistribute away from arteriole structures (Kunisaki et al., 2013). Further studies show that another subset of HSCs exhibits a significant association with megakaryocytes (MK), which are broadly distributed in the BM (Bruns et al., 2014). Selective deletion of MK induced HSC proliferation in a manner shown to depend on CXCL4 (also called platelet factor 4), transforming growth factor β , or thrombopoietin production by MK (Bruns et al., 2014; Nakamura-Ishizu et al., 2014; Zhao et al., 2014). These studies thus suggest that both arteriole structures and MK are niche sites promoting HSC quiescence. However, other studies using α -catulin⁺ c-Kit⁺ Lineage⁻ to mark HSCs have shown in cleared BM that these HSCs were uniformly distributed near sinusoids in a manner indistinguishable from randomly placed dots (Acar et al., 2015). Other analyses, in support of multiple niche structures, have also suggested the existence of distinct arteriolar and MK niche harboring reactive oxygen species (ROS)-low quiescent HSCs (Itkin et al., 2016), or HSC association with type H endothelial cells bridging arterioles and sinusoids in developing bones (Kusumbe et al., 2016). As sinusoids are evenly distributed throughout the BM (Kunisaki et al., 2013), every hematopoietic cell is expected to be relatively close to them (~15 μ m on average), raising questions on the niche specificity. Indeed, the relationship of HSCs with sinusoid vessels was not found to be significantly different from computational modeling random dots (Acar et al., 2015; Kunisaki et al., 2013). However, one study, using a Hoxb5 reporter, found that these HSCs significantly associated with sinusoidal endothelial cells in the BM (Chen et al., 2016). Thus, these studies using different HSC markers have reported differing results about HSC localization in the BM.

HSCs are known to be functionally heterogeneous (Copley et al., 2012; Muller-Sieburg et al., 2012). For example, transplantation of single HSCs has revealed reproducible bias toward selective differentiation to the myeloid or the lymphoid lineage (Dykstra et al., 2007). Using von Willebrand factor (vWF) promoter to drive GFP in transgenic mice (*Vwf-eGFP*), GFP was shown to mark a subset of quiescent HSCs that exhibits platelet and myeloid bias upon transplantation, whereas the GFP⁻ HSC subset was lymphoid biased (Sanjuan-Pla et al., 2013). This



differential expression of vWF may have hierarchical significance, since only vWF-eGFP⁺ HSCs could give rise to vWF-eGFP⁻ HSCs. HSCs with high CD150 expression are enriched in vWF transcripts and are myeloid biased (Beerman et al., 2010; Kent et al., 2009). Expression of CD41 (Gekas and Graf, 2013) or c-Kit (Shin et al., 2014) has also been suggested to mark a megakaryocytic-biased HSC subset. Myeloid-biased, lymphoid-biased, and lymphoid/myeloid balanced HSC subsets prevail in young mice (Dykstra et al., 2007; Muller-Sieburg et al., 2002; Sanjuan-Pla et al., 2013; Sieburg et al., 2006), whereas myeloid-biased HSCs become dominant with age (Cho et al., 2008; Dykstra et al., 2011; Grover et al., 2016) with declined long-term self-renewal functions, possibly contributing to the development of hematologic malignancies. Here, we show using *Vwf-eGFP* genetic marking that myeloid-biased and lymphoid-biased HSCs occupy distinct BM niche microenvironments that are differentially regulated.

RESULTS AND DISCUSSION

vWF⁺ HSCs Associate with Megakaryocytes, but Not Arterioles, in the Mouse Bone Marrow

We evaluated the relationships of platelet- and myeloid-biased vWF-eGFP⁺ and lymphoid-biased vWF-eGFP⁻ HSCs (henceforth designated vWF⁺ and vWF⁻ HSCs) with MK and arteriolar niches in *Vwf-eGFP* mice. We prepared whole-mount sternal BM of *Vwf-eGFP* mice to image by 3D confocal immunofluorescence analyses whereby HSCs are identified with Lineage⁻ CD48⁻ CD150⁺ and in which eGFP marks both MK and a subset of HSCs in BM (Asada et al., 2017; Bruns et al., 2014; Kunisaki et al., 2013) (Figures 1A, 1B, and S1A). Since 90% of the vWF-eGFP⁺ HSC subset expresses CD41 (Sanjuan-Pla et al., 2013), this marker was not included in the analyses and MK progenitors were excluded based on CD48 expression (Oguro et al., 2013), found on > 98% of MK progenitors (Figure S1B). vWF⁺ HSCs constitute a minor fraction of the Lineage⁻ Sca1⁺ c-Kit⁺ (LSK) CD48⁻ CD150⁺ HSC population (24.1% ± 1.4%, mean ± SEM), as measured by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis (Figure S1C). However, 77.2% ± 9.9% of vWF⁺ HSCs were located within 5 μm distance from MK (Figures 1C and S1E), with a considerable fraction (70.8% ± 17.2%) laying directly adjacent to MK (Figure 1F). By contrast to vWF⁻ HSCs, vWF⁺ HSCs did not show any significant association with arterioles (identified by Sca-1^{high} expression, morphology, and small diameter) in the mouse BM. vWF⁺ HSC distribution was statistically different from that of lymphoid-biased vWF⁻ HSCs relative to arterioles (Figures 1D–1F and S1D and S1E), but statistically indistinguishable from random HSC-like dots ($p = 0.9992$; Figures 1D and 1E). These data suggest the existence of at least two spatially distinct BM niches for subsets of HSCs with distinct developmental potential.

vWF⁺, but Not vWF⁻, HSC Proliferation Is Regulated by Megakaryocytes via CXCL4

To investigate the role of MK *in vivo* in lineage-biased HSC regulation, we generated *Cxcl4-cre;iDTR;Vwf-eGFP* mice. Control *iDTR;Vwf-eGFP* and triple-transgenic *Cxcl4-cre;iDTR;Vwf-eGFP* mice were treated with diphtheria toxin (DT) (Figure 2A) to deplete MK as described by Bruns et al. (2014). Seven days

after the initial dose, we evaluated the impact on HSC numbers. Consistent with previous results, MK depletion significantly increased the total number of phenotypic HSCs in BM (Bruns et al., 2014). Strikingly, we found that MK depletion selectively increased (by 11.4-fold, $p < 0.0001$) vWF⁺ HSC numbers whereas the number of vWF⁻ HSCs modestly expanded by 1.4-fold (Figures 2B–2E). In addition, injection of recombinant CXCL4 into *Vwf-eGFP* mice selectively reduced the number of vWF⁺ HSCs in the BM while the number of vWF⁻ HSCs was unaltered (Figures 2F and 2G), which is in line with its role in regulating HSC quiescence (Bruns et al., 2014). To investigate whether MK regulate HSCs directly, we cultured Lineage⁻ cells in the presence or absence of CXCL4. Interestingly, we found that CXCL4 selectively reduced the number (Figure S2A) and proliferation (Figure S2B) of vWF⁺ HSCs but not vWF⁻ HSCs. Evaluation of the BM 3D distribution of vWF⁻ and vWF⁺ HSCs in steady-state and MK-depleted mice revealed no significant alterations in their relationships with arterioles (Figures S2C and S2D). These data strongly suggest that MK can selectively regulate a subset of HSCs directly via CXCL4, although the contribution of other MK-derived factors and additional yet unidentified indirect effects emanating from the microenvironment cannot be excluded.

vWF⁺ HSC Reconstitution Potential Is Regulated by Megakaryocytes

We next evaluated the impact of MK depletion on the ability of vWF⁻ and vWF⁺ HSCs obtained from steady-state and MK-depleted mice to reconstitute hematopoietic lineages after transplantation (Figure S3A). Competitive transplantation of sorted LSK CD48⁻ CD150⁺ vWF⁻ and vWF⁺ HSCs revealed that vWF⁺ HSCs exhibited a bias toward repopulation of platelets (Figures 2H, S3B, and S3C) and myeloid cells (Figures 2I and S3C) compared with vWF⁻ HSCs, consistent with prior results (Sanjuan-Pla et al., 2013). The capacity to generate platelets and myeloid cells was preserved after MK depletion (Figures 2H and S3C). In fact, HSCs were more balanced in their lineage generation upon MK depletion (Figures 2I and S3C), suggesting the interesting possibility that MK can regulate HSC fate. While the overall long-term engraftment of vWF⁻ and vWF⁺ HSCs was not statistically different after MK depletion (Figure 2J), the repopulation capacity of vWF⁺ HSCs from MK-depleted mice was reduced (Figure 2J, note the y axis values). This is likely due to their proliferative state, as the long-term engraftment potential resides predominately in the non-proliferative G₀ fraction of HSCs (Glimm et al., 2000; Passegue et al., 2005). In addition, analysis of the BM 16 weeks after transplantation revealed that whereas both HSC subsets from MK-depleted mice were capable of reconstituting the CD45.2⁺ LSK CD48⁻ CD150⁺ vWF⁻ HSC compartment (Figure S3D, right plots), the ability of vWF⁺ HSCs to reconstitute CD45.2⁺ LSK CD48⁻ CD150⁺ vWF⁺ HSCs was compromised (Figure S3D), suggesting a self-renewal defect. Donor vWF⁻ HSCs, harvested from either steady-state or MK-depleted mice, did not regenerate the vWF⁺ HSC compartment (Figure S3D), indicating that vWF⁻ HSCs are downstream of vWF⁺ HSCs in the hematopoietic hierarchy (Sanjuan-Pla et al., 2013). These results suggest that MK selectively regulate both the proliferation and fate of the vWF⁺ HSC subset.

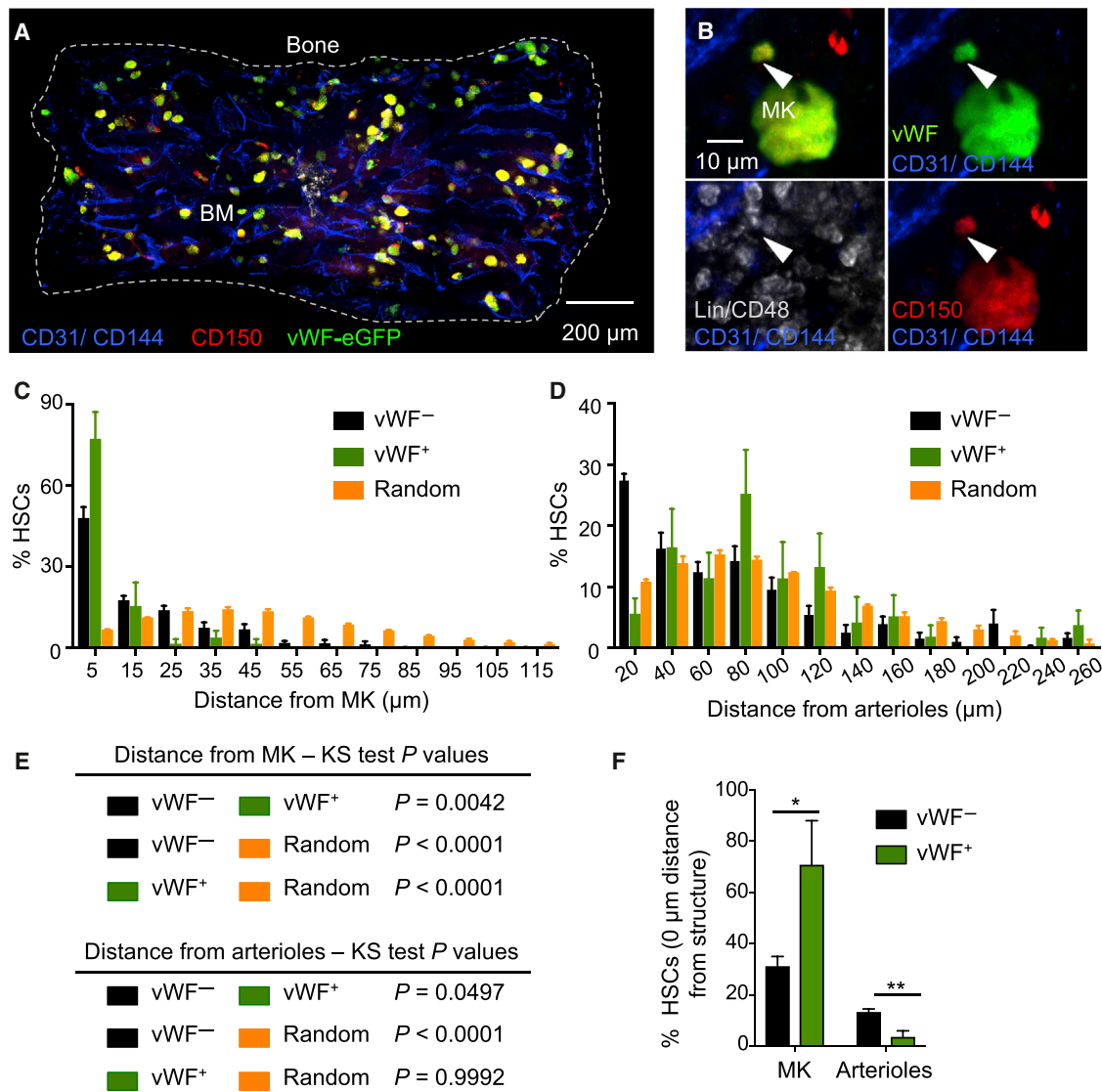


Figure 1. Platelet- and Myeloid-Biased vWF⁺ HSCs Are Exclusively Associated with Megakaryocytes in the Mouse Bone Marrow

(A and B) Representative whole-mount images of *Vwf-eGFP* mouse sternal bone marrow (BM). The dashed outline in (A) denotes the bone-BM border of a sternum piece. White arrowheads in (B) denote a phenotypic Lineage⁻ CD48⁻ CD150⁺ vWF-eGFP⁺ HSC. Megakaryocytes (MK) are distinguished by their size, morphology, and CD150 and vWF expression. Vascular endothelial cells are stained intravenously with antibodies to CD31 and CD144.

(C and D) Localization of vWF⁻ (black bars) and vWF⁺ (green bars) HSCs observed *in situ*, relative to MK (C) and arterioles (D) in the mouse BM of *Vwf-eGFP* mice. Yellow bars depict the mean distances between simulated randomly distributed HSCs and MK and arterioles. $n = 282$ vWF⁻ HSCs and $n = 37$ vWF⁺ HSCs. The numbers on the x axis indicate intervals of 10 μm (C; where 5 indicates the interval -5 to 5, 15 indicates 5 to 15, and so on) and 20 μm (D; where 20 indicates the interval 0 to 20, 40 indicates 20 to 40, and so on).

(E) p values determined by two-sample KS test (C and D).

(F) Percentage of vWF⁻ and vWF⁺ HSCs located in direct contact (0 μm) with MK or arterioles. Unpaired Student's t tests.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Error bars denote SEM. See also Figure S1.

NG2⁺ Arteriolar Niche Cells Selectively Regulate vWF⁻ Lymphoid-Biased HSC Quiescence and Distribution in Bone Marrow

NG2⁺ periarteriolar cell depletion leads to an altered localization of the HSC subset associated with arterioles and increases the proportion of proliferative HSCs (Kunisaki et al., 2013). To investigate the impact of arteriolar niche depletion on the vWF⁺ and vWF⁻ HSC subsets, we generated *NG2-cre^{ERTM};iDTR;Vwf-eGFP* mice. Triple-transgenic *NG2-cre^{ERTM};iDTR;Vwf-eGFP*

and control *iDTR;Vwf-eGFP* mice were treated with tamoxifen and DT to induce NG2⁺ cell depletion, and analyzed 16 days later by FACS and whole-mount immunofluorescence imaging of the sternal BM (Figure 3A). We found that NG2⁺ cell depletion led to significant (~50%) reductions in the number of phenotypic LSK CD48⁻ CD150⁺ lymphoid-biased vWF⁻ HSCs compared with control *iDTR* mice (Figures 3B–E). However, in contrast to MK depletion, vWF⁺ HSC numbers were not significantly affected by NG2⁺ cell depletion and disruption of the arteriolar niche

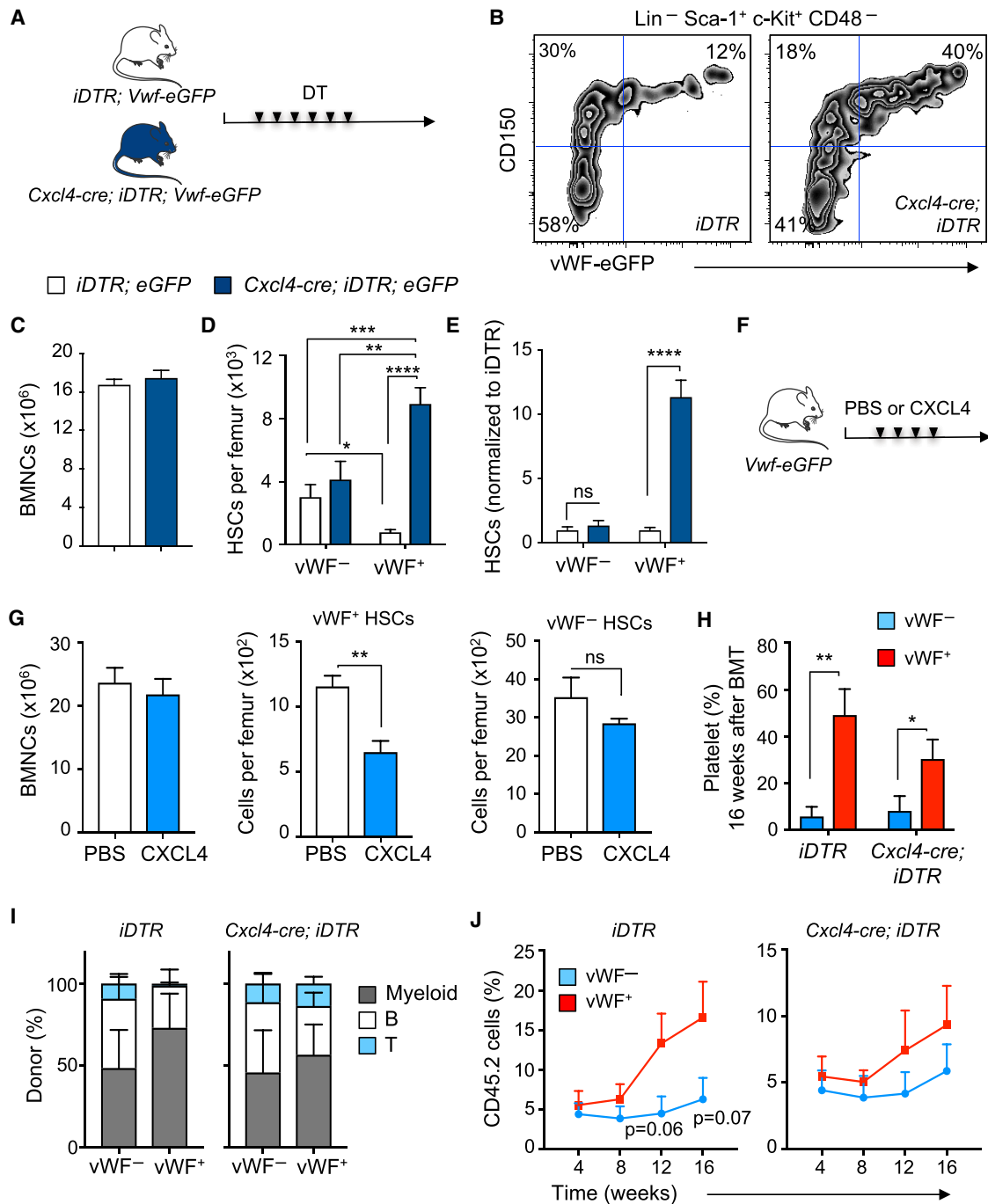


Figure 2. Platelet- and Myeloid-Biased vWF^+ HSC Proliferation and Reconstitution Potential Are Regulated by Megakaryocytes

(A) Experimental design to test the effect of MK depletion on vWF^+ and vWF^- HSCs.

(B) Representative FACS plots of the frequency of vWF^+ and vWF^- HSCs in the BM of control (*iDTR; Vwf-eGFP*) and *Cxcl4-cre; iDTR; Vwf-eGFP* mice, 7 days after diphtheria toxin (DT) treatment.

(C–E) BM cellularity (C), absolute number of HSCs per femur (D), and number of HSCs in *iDTR; Vwf-eGFP* and *Cxcl4-cre; iDTR; Vwf-eGFP* mice normalized to control *iDTR* (E), 7 days after DT treatment. Control group, $n = 6$; *Cxcl4-cre; iDTR; Vwf-eGFP* group, $n = 5$.

(F) Experimental design to test the effect of CXCL4 injection on vWF^+ and vWF^- HSCs.

(G) BM cellularity and number of vWF^+ and vWF^- HSCs per femur in mice treated with PBS ($n = 6$) or CXCL4 ($n = 4$). Bone marrow mononuclear cells (BMNCs). (H–J) Contribution of 100 DAPI $^-$ LSK CD48 $^-$ CD150 $^-$ vWF^- and vWF^+ HSCs from *iDTR; Vwf-eGFP* and *Cxcl4-cre; iDTR; Vwf-eGFP* mice after MK depletion, to peripheral blood (H) platelets (16 weeks post transplantation), (I) myeloid and B and T cells, and (J) overall reconstitution at 16 weeks. $n = 8$ (*iDTR* groups) and *Cxcl4-cre; iDTR* vWF^+ group) and $n = 9$ (*Cxcl4-cre; iDTR* vWF^- group).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Error bars denote SEM. Unpaired Student's t tests (C, E, G, H, and J). One-way ANOVA analyses followed by Tukey's multiple comparison tests were used for multiple group comparisons (D). See also Figures S2 and S3.

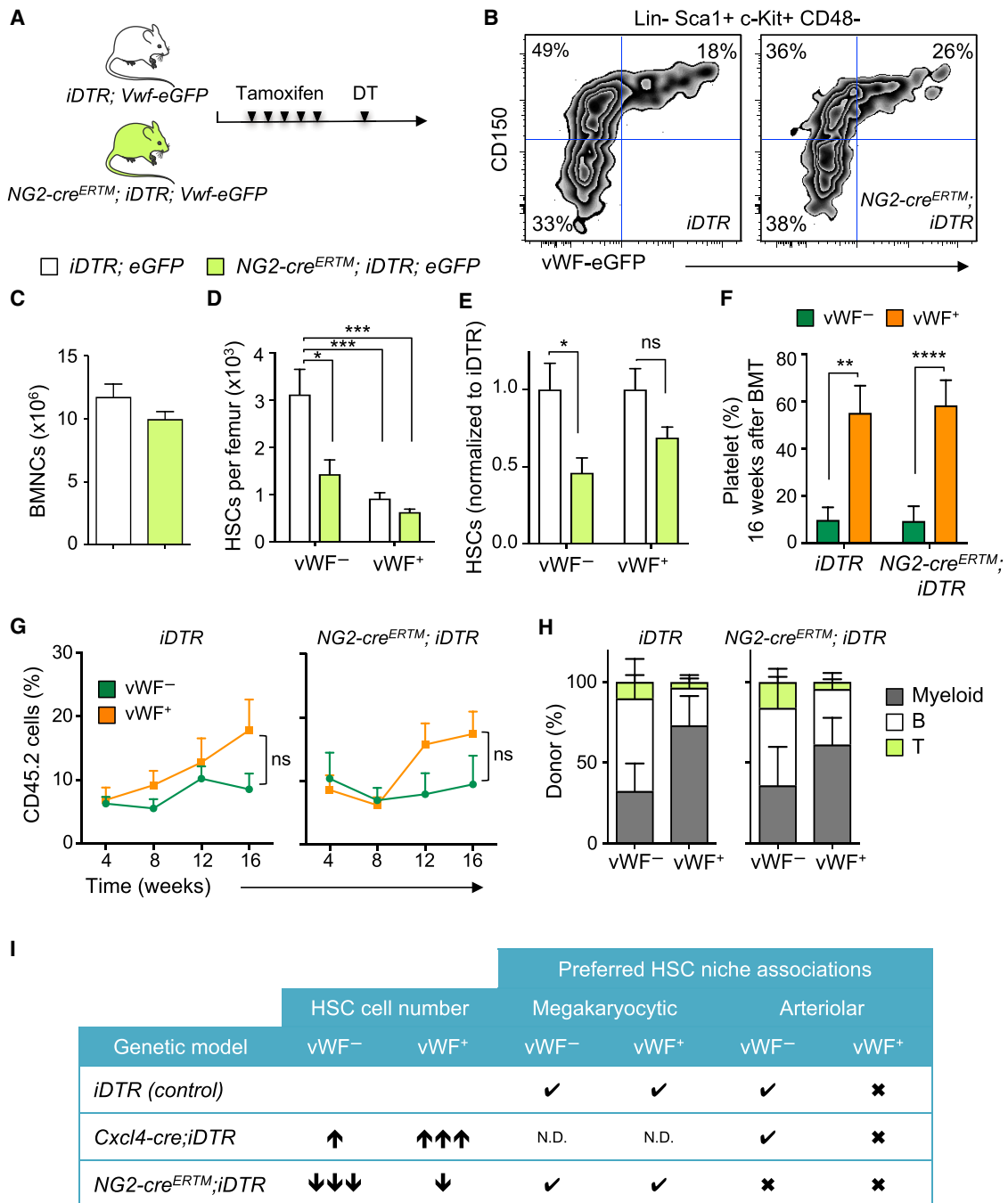


Figure 3. NG2⁺ Arteriole Niche Cells Are Critical Regulators of the vWF⁻ Lymphoid-Biased HSC Quiescence and Localization

(A) Experimental design to test the effect of depletion of NG2⁺ cells on vWF⁺ and vWF⁻ HSCs.

(B) Representative FACS plots of the frequency of vWF⁺ and vWF⁻ HSCs in the BM of control (*iDTR*; *Vwf-eGFP*) and *NG2-cre^{ERTM}*;*iDTR*; *Vwf-eGFP* mice, 16 days after DT treatment.

(C–E) BM cellularity (C), absolute number (D), and number of HSCs per femur (E) in *iDTR*; *Vwf-eGFP* and *NG2-cre^{ERTM}*;*iDTR*; *Vwf-eGFP* mice normalized to control *iDTR*, 16 days after DT treatment. Control group, n = 9; and *NG2-cre^{ERTM}*;*iDTR*; *Vwf-eGFP* group, n = 6.

(F–H) Contribution of 100 DAPI⁻ LSK CD48⁻ CD150⁺ vWF⁻ and vWF⁺ HSCs from *iDTR* and *NG2-cre^{ERTM}*;*iDTR* mice after NG2⁺ cell depletion, to peripheral blood (F) platelets (16 weeks post transplantation), (G) overall reconstitution, and (H) myeloid and B and T cells at 16 weeks. n = 8 (*iDTR* groups) and n = 9 (*NG2-cre^{ERTM}*;*iDTR* groups).

(I) Summary of BM phenotypes of niche-structure-depleted mice in lineage-biased HSCs. Check marks indicate significant HSC/niche association and crosses indicate no preferred association. N.D., not determined due to MK depletion.

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. Error bars denote SEM. Unpaired Student's t tests (C, E, F, and G). One-way ANOVA analyses followed by Tukey's multiple comparison tests were used for multiple group comparisons (D). See also Figure S4.

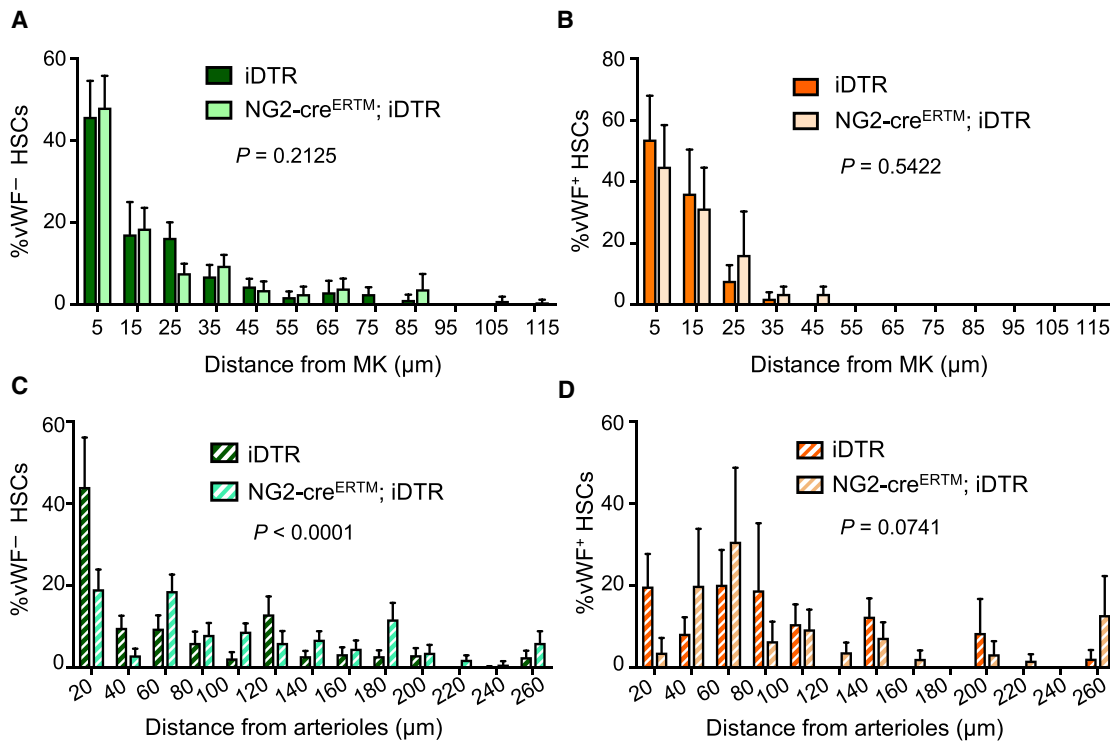


Figure 4. Distribution of Lineage-Biased HSCs in the Mouse BM after NG2⁺ Cell Depletion

(A–D) Localization of phenotypic Lineage⁻ CD48⁻ CD150⁺ vWF-eGFP⁻ (A and C) and vWF-eGFP⁺ (B and D) HSCs in the mouse BM relative to MK (A and B) and arterioles (C and D) in control (iDTR;Vwf-eGFP) and NG2-cre^{ERTM};iDTR;Vwf-eGFP mice, 16 days after DT treatment. $n = 172$ vWF⁻ and $n = 32$ vWF⁺ HSCs from control iDTR;Vwf-eGFP; $n = 163$ vWF⁻ and $n = 26$ vWF⁺ HSCs from NG2-cre^{ERTM};iDTR;Vwf-eGFP. p values were determined by two-sample Kolmogorov-Smirnov test. Error bars denote SEM.

(Figures 3B–3E). We next evaluated the spatial relationships of HSCs with MK and arterioles by 3D imaging. Interestingly, while NG2⁺ cell depletion did not affect the relationship of remaining vWF⁻ (Figure 4A) or vWF⁺ HSCs (Figure 4B) with MK, it selectively altered vWF⁻ HSC localization relative to arterioles (Figure 4C; $p < 0.0001$), but not that of vWF⁺ HSCs (Figure 4D). These results further suggest that MK and arterioles preferentially regulate distinct HSC subsets in the BM.

Finally, we examined the reconstitution potential of sorted vWF⁻ and vWF⁺ HSCs harvested from NG2⁺ depleted and control animals (Figure S4A). Peripheral blood lineage analyses of reconstituted mice with sorted vWF⁺ HSCs revealed a similar platelet- and myeloid-biased blood production from both control and NG2⁺ cell-depleted mice (Figures 3F and S4B). In addition, reconstitution of recipient mice with vWF⁻ HSCs was biased toward the lymphoid lineage in both steady-state and NG2⁺ cell-depleted mice (Figures 3F–3H and S4B). Furthermore, stable platelet-biased blood generation persisted for at least 16 weeks whether vWF⁺ HSCs were harvested from control or NG2⁺ cell-depleted animals (Figures 3F and S4B). Interestingly, whereas, as expected, vWF⁻ HSCs from steady-state mice repopulated only the vWF⁻ HSC compartment, instances of vWF⁺ repopulation (3 out of 9 recipient mice) were observed from vWF⁻ HSCs harvested from NG2⁺ cell-depleted BM (Figure S4C, third panel).

These results argue for the presence of spatially separate perivascular niches in the mouse BM that regulate functionally

distinct subsets of lineage-biased quiescent HSCs. Phenotypic HSCs, like Nestin-GFP⁺/LepR⁺/CAR niche cells, are distributed throughout the BM (Acar et al., 2015; Kunisaki et al., 2013; Omatsu et al., 2010). However, the number of niche cells, whether defined by Nestin, LepR, or CXCL12 expression, vastly outnumbers that of HSCs (by >20:1), underscoring the need, if the HSC niche concept is valid, for further stromal fractionation. We have previously suggested that the niche may be formed by the coupling of mesenchymal stem cells (MSCs) and HSCs (Mendez-Ferrer et al., 2010), an idea supported by the segregation of niche factor expression with MSC activity (Pinho et al., 2013). Further analyses fractionating and enriching MSC activity will be helpful to rule in or out this possibility. However, it is becoming clear that multiple cells in the microenvironment contribute to niche activity (Mendelson and Frenette, 2014). Among these are the arteriole-associated stromal cells, which confer HSC quiescence as shown by the depletion of NG2⁺ cells leading to HSC redistribution and proliferation (Kunisaki et al., 2013). The role of arterioles as a specific microenvironment for HSC maintenance has been questioned by other studies that have used other markers to identify HSC *in situ* (Acar et al., 2015), but confirmed by others (Itkin et al., 2016). The present studies, using specific disruption of arterial and MK niches, further document their selective contributions in regulating the maintenance of distinct subsets of HSCs.

vWF-driven GFP marking has allowed for the first time to evaluate the spatial distribution of distinct lineage-biased HSC

subsets *in situ*. Lineage bias in hematopoietic repopulation capacity has been retrospectively identified and defined by single HSC competitive transplantation experiments (Dykstra et al., 2007), but whether such lineage-biased HSCs occupy specific microenvironments or are uniformly distributed in the BM remained unknown. Our studies show that myeloid-biased vWF^+ HSCs are enriched in MK niches whereas lymphoid-biased vWF^- HSCs are enriched in arteriolar niches (Figure 3I). This contention is supported by their localization and, perhaps more importantly, by selective disruption of homeostasis using conditional depletion of these niches with genetically engineered models. These results support the notion that HSC niches are not uniform in the BM but rather are formed by complex microenvironments with input from several cellular constituents. Serial transplantations of HSCs with defined hues reproduced the same complex pattern in lethally irradiated recipients, suggesting that the lineage contribution array may be intrinsically programmed by epigenetic memory (Yu et al., 2016). Our studies, however, show for the first time that a BM niche constituent (i.e., MK) may also regulate HSC fate, since MK deletion appears sufficient to reprogram vWF^+ HSCs from myeloid-biased to balanced-lineage contributions. As myeloid bias is a hallmark of HSC aging, understanding its molecular underpinnings may provide a new armamentarium for the rejuvenation of aged HSCs.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
 - Mice
- METHOD DETAILS
 - *In Vivo* Treatments
 - Whole-mount Immunofluorescence Imaging
 - Computational Modeling of Random HSC Localization
 - Antibodies
 - Flow Cytometry and Cell Sorting
 - Cell Cycle Analyses
 - Cell Culture
 - Bone Marrow Transplantation
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes four figures and can be found with this article online at <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.01.016>.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Colette Prophete and Paul Ciero for technical assistance; Lydia Tesfa and the Einstein Flow Cytometry Core Facility for expert cell sort assistance; Sten Eirik W. Jacobsen for providing the *Vwf-eGFP* mice; and Ali Zahalka and Maria Maryanovich for helpful scientific discussions. S.P. was supported by a New York Stem Cell Foundation-Druckenmiller Fellowship; T.M. is supported by the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer and by the Société Française d'Hématologie. This work was supported by the New York State Department of Health (NYSTEM Program,

C029154 and C029570), by the New York Stem Cell Foundation, and by R01 grants from the NIH (DK056638, HL116340, HL097819, DK112976 to P.S.F.).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.P. designed the study, performed the majority of the experiments, and analyzed data. T.M. helped with the whole-mount imaging experiments and analyzed data. E.Y. performed computational modeling. Q.W. performed FACS analyses. C.N. provided the *Vwf-eGFP* mice and advised on experimental setup. P.S.F. supervised the study. S.P. and P.S.F. wrote the manuscript. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: June 26, 2017

Revised: December 18, 2017

Accepted: January 22, 2018

Published: February 15, 2018

REFERENCES

- 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.
- 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.
- Beerman, I., Bhattacharya, D., Zandi, S., Sigvardsson, M., Weissman, I.L., Bryder, D., and Rossi, D.J. (2010). Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 5465–5470.
- 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.
- Chen, J.Y., Miyaniishi, 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.
- Cho, R.H., Sieburg, H.B., and Muller-Sieburg, C.E. (2008). A new mechanism for the aging of hematopoietic stem cells: aging changes the clonal composition of the stem cell compartment but not individual stem cells. *Blood* 111, 5553–5561.
- Copley, M.R., Beer, P.A., and Eaves, C.J. (2012). Hematopoietic stem cell heterogeneity takes center stage. *Cell Stem Cell* 10, 690–697.
- Dykstra, B., Kent, D., Bowie, M., McCaffrey, L., Hamilton, M., Lyons, K., Lee, S.J., Brinkman, R., and Eaves, C. (2007). Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs *in vivo*. *Cell Stem Cell* 1, 218–229.
- Dykstra, B., Olthof, S., Schreuder, J., Ritsema, M., and de Haan, G. (2011). Clonal analysis reveals multiple functional defects of aged murine hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 208, 2691–2703.
- Gekas, C., and Graf, T. (2013). CD41 expression marks myeloid-biased adult hematopoietic stem cells and increases with age. *Blood* 121, 4463–4472.
- Glimm, H., Oh, I.H., and Eaves, C.J. (2000). Human hematopoietic stem cells stimulated to proliferate *in vitro* lose engraftment potential during their S/G(2)/M transit and do not reenter G(0). *Blood* 96, 4185–4193.
- Grover, A., Sanjuan-Pla, A., Thongjuea, S., Carrelha, J., Giustacchini, A., Gambardella, A., Macaulay, I., Mancini, E., Luis, T.C., Mead, A., et al. (2016). Single-cell RNA sequencing reveals molecular and functional platelet bias of aged haematopoietic stem cells. *Nat. Commun.* 7, 11075.
- 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.
- Kent, D.G., Copley, M.R., Benz, C., Wohrer, S., Dykstra, B.J., Ma, E., Cheyne, J., Zhao, Y., Bowie, M.B., Zhao, Y., et al. (2009). Prospective isolation and molecular characterization of hematopoietic stem cells with durable self-renewal potential. *Blood* 113, 6342–6350.
- Kiel, M.J., Yilmaz, O.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.
- 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.
- Kusumbe, A.P., Ramasamy, S.K., Itkin, T., Mae, M.A., Langen, U.H., Betsholtz, C., Lapidot, T., and Adams, R.H. (2016). Age-dependent modulation of vascular niches for haematopoietic stem cells. *Nature* 532, 380–384.
- Mendelson, A., and Frenette, P.S. (2014). Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nat. Med.* 20, 833–846.
- Mendez-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.
- Muller-Sieburg, C.E., Cho, R.H., Thoman, M., Adkins, B., and Sieburg, H.B. (2002). Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood* 100, 1302–1309.
- Muller-Sieburg, C.E., Sieburg, H.B., Bernitz, J.M., and Cattarossi, G. (2012). Stem cell heterogeneity: implications for aging and regenerative medicine. *Blood* 119, 3900–3907.
- Nakamura-Ishizu, A., Takubo, K., Fujioka, M., and Suda, T. (2014). Megakaryocytes are essential for HSC quiescence through the production of thrombopoietin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 454, 353–357.
- Oguro, H., Ding, L., and Morrison, S.J. (2013). SLAM family markers resolve functionally distinct subpopulations of hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. *Cell Stem Cell* 13, 102–116.
- 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.
- Passegue, E., Wagers, A.J., Giuriato, S., Anderson, W.C., and Weissman, I.L. (2005). Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J. Exp. Med.* 202, 1599–1611.
- Pinho, S., Lacombe, J., Hanoun, M., Mizoguchi, T., Bruns, I., Kunisaki, Y., and Frenette, P.S. (2013). PDGFRalpha and CD51 mark human nestin⁺ sphere-forming mesenchymal stem cells capable of hematopoietic progenitor cell expansion. *J. Exp. Med.* 210, 1351–1367.
- 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.
- Shin, J.Y., Hu, W., Naramura, M., and Park, C.Y. (2014). High c-Kit expression identifies hematopoietic stem cells with impaired self-renewal and megakaryocytic bias. *J. Exp. Med.* 211, 217–231.
- Sieburg, H.B., Cho, R.H., Dykstra, B., Uchida, N., Eaves, C.J., and Muller-Sieburg, C.E. (2006). The hematopoietic stem compartment consists of a limited number of discrete stem cell subsets. *Blood* 107, 2311–2316.
- Yu, V.W., Yusuf, R.Z., Oki, T., Wu, J., Saez, B., Wang, X., Cook, C., Baryawno, N., Ziller, M.J., Lee, E., et al. (2016). Epigenetic memory underlies cell-autonomous heterogeneous behavior of hematopoietic stem cells. *Cell* 167, 1310–1322.e17.
- 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.
- 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.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
anti-mouse Ly-6A/E (Sca1) APC	eBioscience	Cat#17-5981-83; RRID: AB_469488
anti-mouse Ly-6A/E (Sca1) PE-Cy7	eBioscience	Cat#25-5981-82; RRID: AB_469669
anti-mouse Ly-6A/E (Sca1) Alexa Fluor 700	eBioscience	Cat#56-5981-82; RRID: AB_657836
anti-mouse CD117 (c-Kit) BV 421	Biolegend	Cat#105828; RRID: AB_11204256
anti-mouse CD117 (c-Kit) PE-Cy7	Biolegend	Cat#105814; RRID: AB_313223
anti-mouse CD48 biotin	eBioscience	Cat#13-0481-85; RRID: AB_466471
anti-mouse CD48 PerCP-eFluor 710	eBioscience	Cat#46-0481-82; RRID: AB_10853483
anti-mouse CD48 FITC	eBioscience	Cat#11-0481-82; RRID: AB_465077
anti-mouse CD41 APC	eBioscience	Cat#17-0411-82; RRID: AB_1603237
anti-mouse CD41 FITC	eBioscience	Cat#11-0411-81; RRID: AB_763482
anti-mouse CD45.2 PE	eBioscience	Cat#12-0454-82; RRID: AB_465678
anti-mouse CD45.2 PerCP-Cy5.5	eBioscience	Cat#45-0454-82; RRID: AB_953590
anti-mouse CD45.1 FITC	eBioscience	Cat#11-0453-85; RRID: AB_465059
anti-mouse CD45.1 APC eFluor 780	eBioscience	Cat#47-0453-82; RRID: AB_1582228
anti-mouse CD4 PE-Cy7	eBioscience	Cat#25-0041-82; RRID: AB_469576
anti-mouse CD8a PE-Cy7	eBioscience	Cat#25-0081-82; RRID: AB_469584
anti-mouse B220 APC eFluor 780	eBioscience	Cat#47-0452-82; RRID: AB_1518810
anti-mouse CD11b Alexa Fluor 647	Biolegend	Cat#101218; RRID: AB_389327
anti-mouse CD31 Alexa Fluor 647	Biolegend	Cat#102516; RRID: AB_2161029
anti-mouse CD144 Alexa Fluor 647	Biolegend	Cat#138006; RRID: AB_10569114
anti-mouse Ki-67 eFluor 660	eBioscience	Cat#50-5698-82; RRID: AB_2574235
anti-mouse CD34 PE	Biolegend	Cat#119308; RRID: AB_493400
anti-mouse FcR γ /III PerCP-eFluor 710	eBioscience	Cat#46-0161-82; RRID: AB_2016701
anti-mouse CD150 PE	Biolegend	Cat#115904; RRID: AB_313683
anti-mouse Ter119 PerCP-Cy5.5	eBioscience	Cat#45-5921-82; RRID: AB_925765
anti-mouse Lineage panel cocktail biotin	BD Biosciences	Cat#559971; RRID: AB_10053179
Streptavidin APC eFluor 780	eBioscience	Cat#47-4317-82; RRID: AB_10366688
Streptavidin eFluor 450	eBioscience	Cat#48-4317-82; RRID: AB_10359737
Streptavidin BV 570	Biolegend	Cat#405227
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Diphtheria Toxin	Sigma-Aldrich	D0564
Tamoxifen	Sigma-Aldrich	T5648
Corn oil	Sigma-Aldrich	C8267
Recombinant mouse CXCL4	ProSpec	CHM-245
DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole)	Sigma-Aldrich	D9542
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich	B2261
StemSpan medium	StemCell Technologies	09650
Recombinant murine SCF	PeproTech	250-03
Recombinant human FGF-1	PeproTech	100-18B
Streptavidin Microbeads	Miltenyi Biotec	130-048-101
Critical Commercial Assays		
Foxp3/Transcription factor staining buffer set	eBioscience	00-5523-00

(Continued on next page)

Continued		
REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Experimental Models: Organisms/Strains		
C57BL/6-Tg(Pf4-iCre)Q3Rsko/J	The Jackson Laboratory	RRID:IMSR_JAX:008535
B6.Cg-Tg(Cspg4-cre/Esr1*)BAKik/J	The Jackson Laboratory	RRID:IMSR_JAX:008538
C57BL/6-Gt(ROSA)26Sor ^{tm1(HBEGF)Awai} /J	The Jackson Laboratory	RRID:IMSR_JAX:007900
<i>Vwf-EGFP</i>	Gift from Sten Eirik W. Jacobsen and Claus Nerlov (University of Oxford) (Sanjuan-Pla et al., 2013)	N/A
C57BL/6 (CD45.2)	National Cancer Institute	N/A
Bl6-Ly5.1 (CD45.1)	The Jackson Laboratory	N/A
Software and Algorithms		
SlideBook	Intelligent Imaging Innovations	RRID:SCR_014300
Matlab	MathWorks	RRID:SCR_001622
FlowJo	Tree Star	RRID:SCR_008520
FACS Diva 6.1	BD Biosciences	RRID:SCR_001456
GraphPad Prism	GraphPad Software	RRID:SCR_002798

CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Paul S. Frenette (paul.frenette@einstein.yu.edu).

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Mice

C57BL/6-Tg(Pf4-iCre)Q3Rsko/J (*Cxcl4-cre*), B6.Cg-Tg(Cspg4-cre/Esr1*)BAKik/J (*NG2-cre^{ERTM}*) and C57BL/6-Gt(ROSA)26Sor^{tm1(HBEGF)Awai}/J (*iDTR*) mice were purchased from the Jackson Laboratory. *Vwf-EGFP* transgenic mice was generated using a 226 Kb BAC as described (Sanjuan-Pla et al., 2013). The BAC contained near all *Vwf* gene (110 Kb out of 130 Kb), and an additional 100 Kb upstream sequence. Most of the identified transcriptional regulatory elements of the *Vwf* gene elements are located within -5kb~5kb from the transcription start site. C57BL/6 (CD45.2) and Bl6-Ly5.1 (CD45.1) mice were purchased from the National Cancer Institute or the Jackson laboratory (B6.SJL-*Ptprc^a Pepc^b*/BoyJ). Unless indicated otherwise, 8–12-week-old male and female mice were used. No randomization or blinding was used to allocate experimental groups. The Animal Care and Use Committees of Albert Einstein College of Medicine approved all experimental procedures.

METHOD DETAILS

In Vivo Treatments

For DT-mediated MK depletion, 250 ng of DT (Sigma) was injected intraperitoneally (i.p.) every 24 hours over 7 days. Mice were subjected to HSC analyses on the day of the last injection. For induction of *NG2-cre^{ERTM}*-mediated recombination mice were injected i.p. with 2 mg tamoxifen (Sigma) dissolved in corn oil (Sigma) once a day during 5 consecutive days. For DT-mediated *NG2⁺* cells depletion, 2 days after the last tamoxifen injection, mice were injected i.p. with 250 ng of DT (Sigma) once a day during 2 days. All treatments were similarly applied to *control* and *cre;iDTR* groups. CXCL4 (1 μ g; ProSpec) or PBS vehicle were injected i.p. every 24 hours over 4 days.

Whole-mount Immunofluorescence Imaging

Whole-mount tissue preparation, HSC immunofluorescence staining and imaging analysis of the sternum were performed as described previously (Bruns et al., 2014; Kunisaki et al., 2013) with minor modifications. Briefly, bone marrow endothelial cells were stained by i.v. injection of anti-CD31/anti-CD144 or anti-Sca-1 antibodies and after 10 min mice were euthanized. Sternum bones were carefully harvested, cleaned and transected with a surgical blade into individual pieces. Each piece was bisected sagittally in order to expose the marrow cavity. Fragments were fixed with 4% PFA; blocked/permeabilized in PBS with 20% normal goat serum and 0.5% Triton X-100 and stained with primary antibodies (biotin anti-Lineage panel cocktail, biotin anti-CD48 and PE anti-CD150) for 3 days. The tissues were then incubated with streptavidin eFluor 450 for 2 hours. Images were acquired using a ZEISS

AXIO examiner D1 microscope (Zeiss) with a confocal scanner unit, CSUX1CU (Yokogawa), and reconstructed in 3D with SlideBook software (Intelligent Imaging Innovations). For each vWF^- or vWF^+ HSC the Euclidean distance to the closest MK and arteriole was measured in order to generate distribution maps.

Computational Modeling of Random HSC Localization

Computer simulations were performed as described previously (Bruns et al., 2014; Kunisaki et al., 2013) with Matlab software (MathWorks) and minor modifications. 2D z-stack images of whole mount sternal segments were used to generate a representative 3D spatial map of arterioles and MK onto which 20 spots representing HSCs were randomly placed. Thresholds were applied to generate binary maps, followed by median filtering to remove nonspecific background staining to accurately represent arteriole and MK localization within the marrow space. Boundaries of the bone-to-marrow interface were demarcated on the binary maps of MK and arterioles such that random HSC-like spots were only placed in the unoccupied marrow space. HSC simulation coordinates were randomly selected from the region within the boundary, and the shortest Euclidean distance was calculated for each spot to the nearest MK and arteriole. Each simulated run of 20 randomly placed HSC-like spots was repeated 1,000 times on images of arterioles and MK. 3D distance distributions of 2 randomly placed spots (in the same range of frequency of the rarer vWF^+ subset) repeated 1,000 times were also generated. Since these random distributions were similar to the random 20-spot distribution, the data from 20 random spots was used in all distribution comparisons to simplify the presentation of results.

Antibodies

The following antibodies were used in this study: anti-Ly6A/E (Sca1) (D7), anti-CD48 (HM48-1), anti-CD41 (MWRReg30), anti-CD45.2 (104), anti-CD45.1 (A20), anti-CD4 (GK1.5), anti-CD8a (53-6.7), anti-B220 (RA3-6B2), anti-Ki-67 (SolA15), anti-FcR11/III (93) and anti-Ter119 (TER-119) were all from eBioscience. Anti-CD150 (TC15-12F12.2), anti-CD117 (2B8), anti-CD11b (M1/70), anti-CD31 (MEC13.3), anti-CD144 (BV13) and anti-CD34 (MEC14.7) were from Biolegend. Anti-Lineage panel cocktail (TER-119, RB6-8C5, RA3-6B2, M1/70, 145-2C11 at 1:50 dilution) was from BD Biosciences. Streptavidin eFluor 450 and APC eFluor 780 from eBioscience and streptavidin BV 570 from Biolegend were used for biotinylated antibodies. Unless otherwise specified, all antibodies and streptavidin cocktails were used at a 1:100 dilution.

Flow Cytometry and Cell Sorting

Flow cytometric analyses were carried out in single-cell suspensions of nucleated cells enriched from the peripheral blood or flushed bone marrow using an LSRII flow cytometer (BD Biosciences). Cell sorting experiments were performed using a FACSARIA Cell Sorter (BD Biosciences). Dead cells and debris were excluded by FSC, SSC and DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) staining profiles. Data were analysed with FlowJo (Tree Star) or FACS Diva 6.1 software (BD Biosciences).

Cell Cycle Analyses

For cell cycle analyses, cells were stained with HSC surface markers, fixed and permeabilized with the Foxp3/Transcription factor staining buffer set from eBioscience according to manufacturer's instructions, and stained with anti-Ki-67 antibody and Hoechst 33342 (Sigma) at $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ for 30 min. After washing, cells were immediately analyzed in a LSRII Flow Cytometer (BD Biosciences).

Cell Culture

For *in vitro* analyses of HSCs, lineage-depleted bone marrow cells were isolated using streptavidin microbeads (Miltenyi Biotech) and cultured for 4 days in StemSpan medium (StemCell Technologies) supplemented with SCF (10 ng ml^{-1}) and fibroblast growth factor 1 (FGF-1) (10 ng ml^{-1} all PeproTech). Recombinant mouse CXCL4 (100 ng ml^{-1} ; ProsPec) or PBS was added to assess CXCL4 effects on lineage-biased HSCs.

Bone Marrow Transplantation

Competitive repopulation assays were performed using the CD45.1/CD45.2 congenic system. Recipient mice were lethally irradiated (12 Gy, two split doses) in a Cesium Mark 1 irradiator (JL Shepherd & Associates). $100 vWF^-$ or vWF^+ CD45.2⁺ HSCs (defined as LSK CD48⁻ CD150⁺) were isolated from the bone marrow of *Cxcl4-cre;iDTR;Vwf-eGFP* or from *NG2-cre^{ERTM};iDTR;Vwf-eGFP* and respective littermate control *iDTR;Vwf-eGFP* mice. Sorted HSCs were intravenously transplanted together with 0.25×10^6 competitor CD45.1⁺ total bone marrow mononuclear cells (BMNCs). Before transplantation, dead cells and debris were excluded by FSC, SSC and DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) staining profiles. CD45.1/CD45.2 chimerism of recipient blood was analysed up to 4 months after transplantation using FACS. Blood was harvested by submandibular route and collected in polypropylene tubes containing EDTA. Mice showing more than 1% donor reconstitution in the myeloid (CD11b⁺), B-cell (B220⁺) and T-cell (CD4⁺ CD8⁺) lineages after 16 weeks were considered engrafted. The percentage of platelet chimerism was calculated as previously described (Sanjuan-Pla et al., 2013) briefly whole peripheral blood was centrifuged for 10 min at 100g and platelet-containing supernatant was stained. Plasma-derived platelets were identified based on scatter properties, absence of Ter119 and CD41, CD150 and eGFP expression.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

All data are represented as mean \pm S.E.M. Comparisons between two samples were done using the unpaired Student's *t* tests. One-way ANOVA analyses followed by Tukey's multiple comparison tests were used for multiple group comparisons. Two-sample Kolmogorov–Smirnov (KS) tests were used for comparisons of distribution patterns. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001. Specific statistical parameters (e.g., number of animals used) can be found in the figure legends.

Developmental Cell, Volume 44

Supplemental Information

**Lineage-Biased Hematopoietic Stem Cells
Are Regulated by Distinct Niches**

Sandra Pinho, Tony Marchand, Eva Yang, Qiaozhi Wei, Claus Nerlov, and Paul S. Frenette

Figure S1. Related to Figure 1

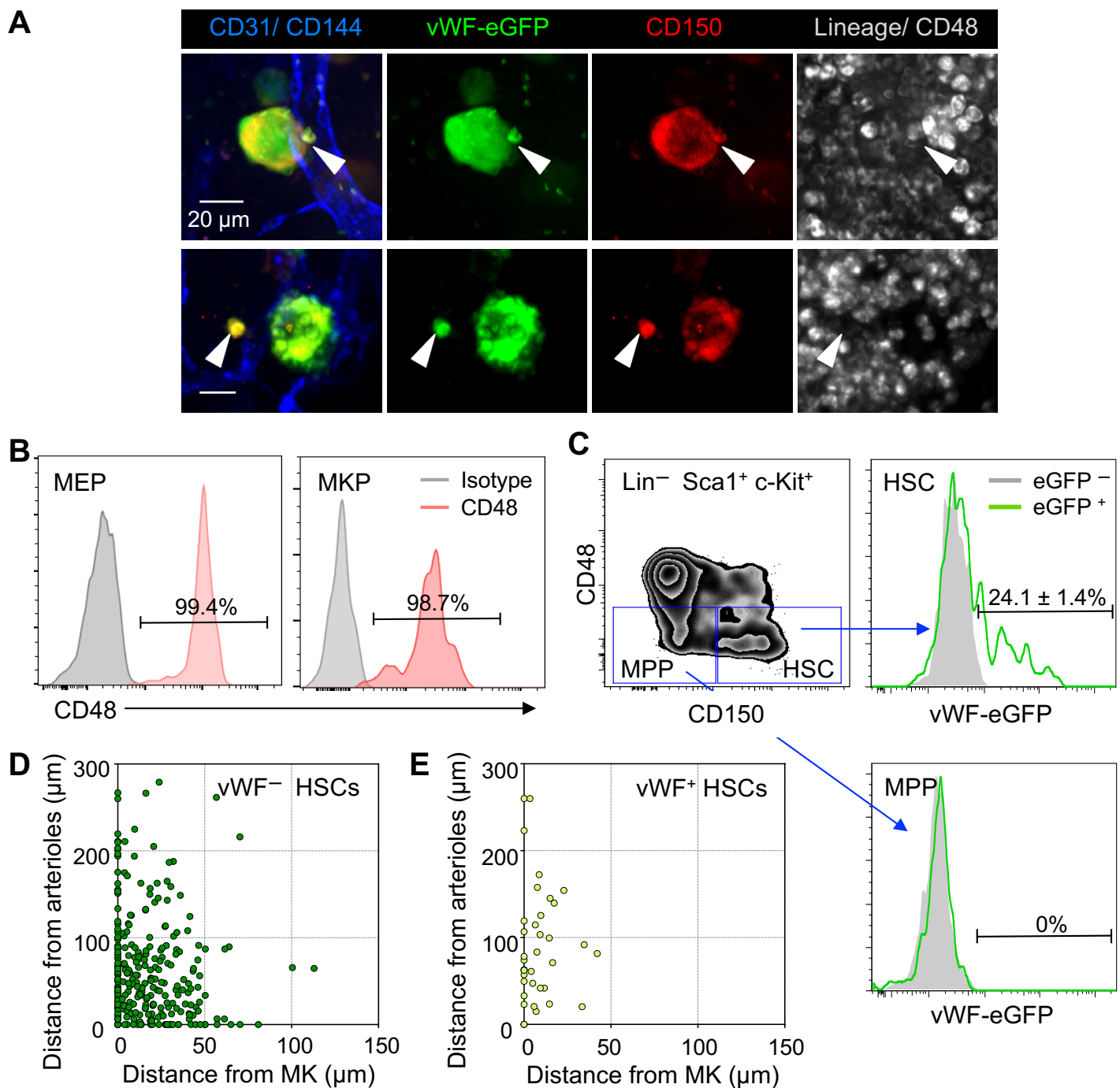


Figure S1, related to Figure 1. vWF -eGFP⁺ cells constitute a small fraction of the LSK CD48⁻ CD150⁺ HSC population in the mouse BM

(A) Representative whole-mount images of vWF -eGFP⁺ HSCs in the mouse sternal BM. White arrowheads denote phenotypic Lineage (Lin)⁻ CD48⁻ CD150⁺ vWF -eGFP⁺ HSCs. MK are distinguished by their size, morphology and CD150 and vWF expression. Vascular endothelial cells are stained intravenously with antibodies to CD31 and CD144. (B) Bone marrow FACS analysis of CD48 expression in MK/erythroid progenitors (MEP; Lin⁻ Sca1⁻ c-Kit⁺ FcR2/3⁻ CD34⁻) and MK progenitors (MKP; Lin⁻ Sca1⁻ c-Kit⁺ CD150⁺ CD41⁺) (C) FACS gating strategy for the isolation of phenotypic Lin⁻ Sca1⁺ c-Kit⁺ CD48⁻ CD150⁺ vWF -eGFP⁺ HSCs from the BM of *Vwf-eGFP* mice. (D) 2D distribution of the distances between vWF -eGFP⁻ (D) and vWF -eGFP⁺ HSCs (E) and MK or arterioles in the mouse sternal BM. $n = 282$ vWF ⁻ HSCs and $n = 37$ vWF ⁺ HSCs (related to Figure 1C and 1D).

Figure S2. Related to Figure 2

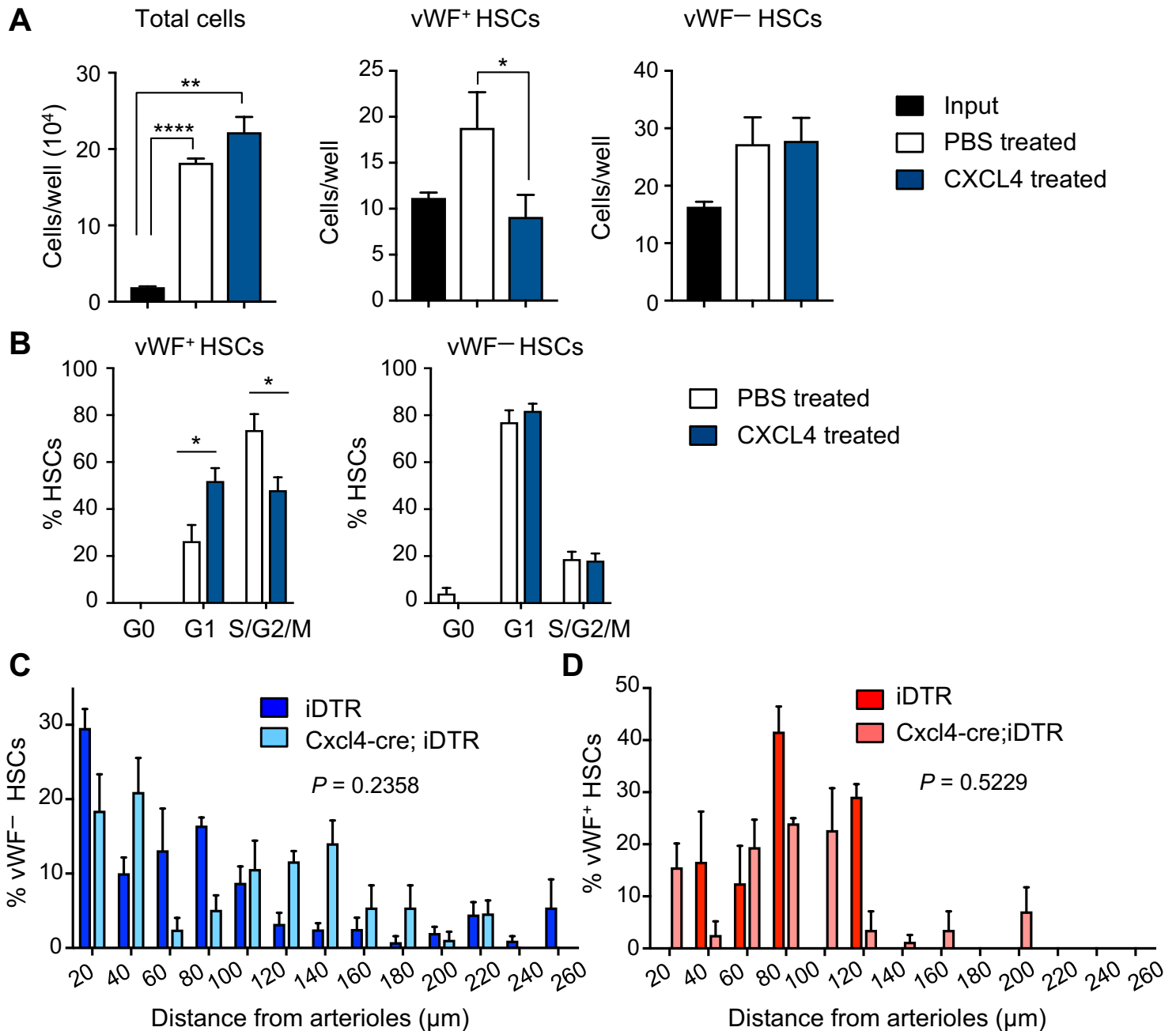


Figure S2, related to Figure 2. Distribution of lineage-biased HSCs in the mouse BM after MK depletion

(A) Absolute number of cells per well in cultures of Lineage (Lin)⁻ cells isolated from *Vwf-eGFP* mice and cultured *in vitro* during 4 days in the presence or absence of recombinant CXCL4. Input indicates the number of cells on day 0. $n = 10$ wells per group (B) Cell cycle analysis by FACS using anti-Ki-67 and Hoechst 33342 staining of vWF⁻ and vWF⁺ HSCs *in vitro* cultured in the presence or absence of CXCL4. $n = 8$ (PBS) and $n = 5$ (CXCL4) wells per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$. Error bars S.E.M.. Unpaired Student's *t* tests. Localization of phenotypic Lin⁻ CD48⁻ CD150⁺ vWF-eGFP⁻ (C) and vWF-eGFP⁺ (D) HSCs in the mouse BM relative to arterioles in control (*iDTR*; *Vwf-eGFP*) and *Cxcl4-cre*; *iDTR*; *Vwf-eGFP* mice, 7 days after DT treatment. $n = 142$ vWF⁻ and $n = 14$ vWF⁺ HSCs from control *iDTR*; *Vwf-eGFP*; $n = 83$ vWF⁻ and $n = 35$ vWF⁺ HSCs from *Cxcl4-cre*; *iDTR*; *Vwf-eGFP*. P values were determined by two-sample KS test. Error bars S.E.M.

Figure S3. Related to Figure 2

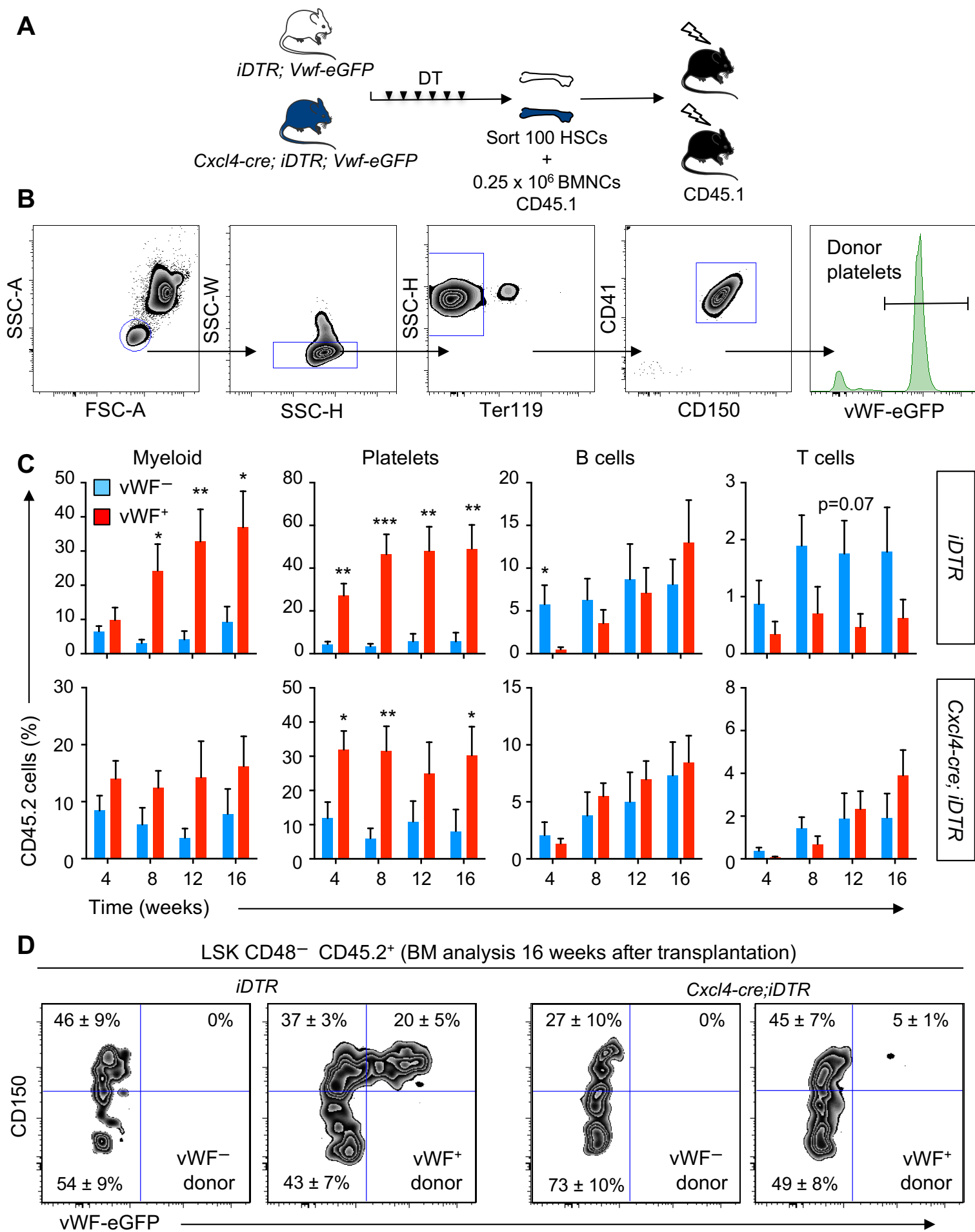


Figure S3, related to Figure 2. Reconstitution potential of lineage-biased HSCs after MK depletion

(A) Experimental design of the competitive reconstitution assays used to determine the effect of MK depletion in the lineage potential of purified vWF⁻ and vWF⁺ HSCs. (B) Gating strategy for peripheral blood platelet reconstitution analysis in mice 16 weeks after competitive transplantation of CD45.2 vWF⁺ HSCs. (C) Quantification of tri-lineage (myeloid, B cell and T cell) and platelet engraftment in the peripheral blood of mice analyzed in **Figure 2H-J**. $n = 8$ (iDTR vWF⁻ and vWF⁺ groups); $n = 9$ (Cxcl4-cre,iDTR vWF⁻ group); $n = 8$ (Cxcl4-cre,iDTR vWF⁺ group). (D) Representative BM FACS plots showing donor HSCs contribution to recipient CD45.2⁺ LSK CD48⁻ CD150⁺ vWF-eGFP⁻ or vWF-eGFP⁺ HSC compartment, at 16 weeks from the mice analyzed in **Figure 2H-J**. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Error bars S.E.M. Unpaired Student's t tests (C).

Figure S4. Related to Figure 3

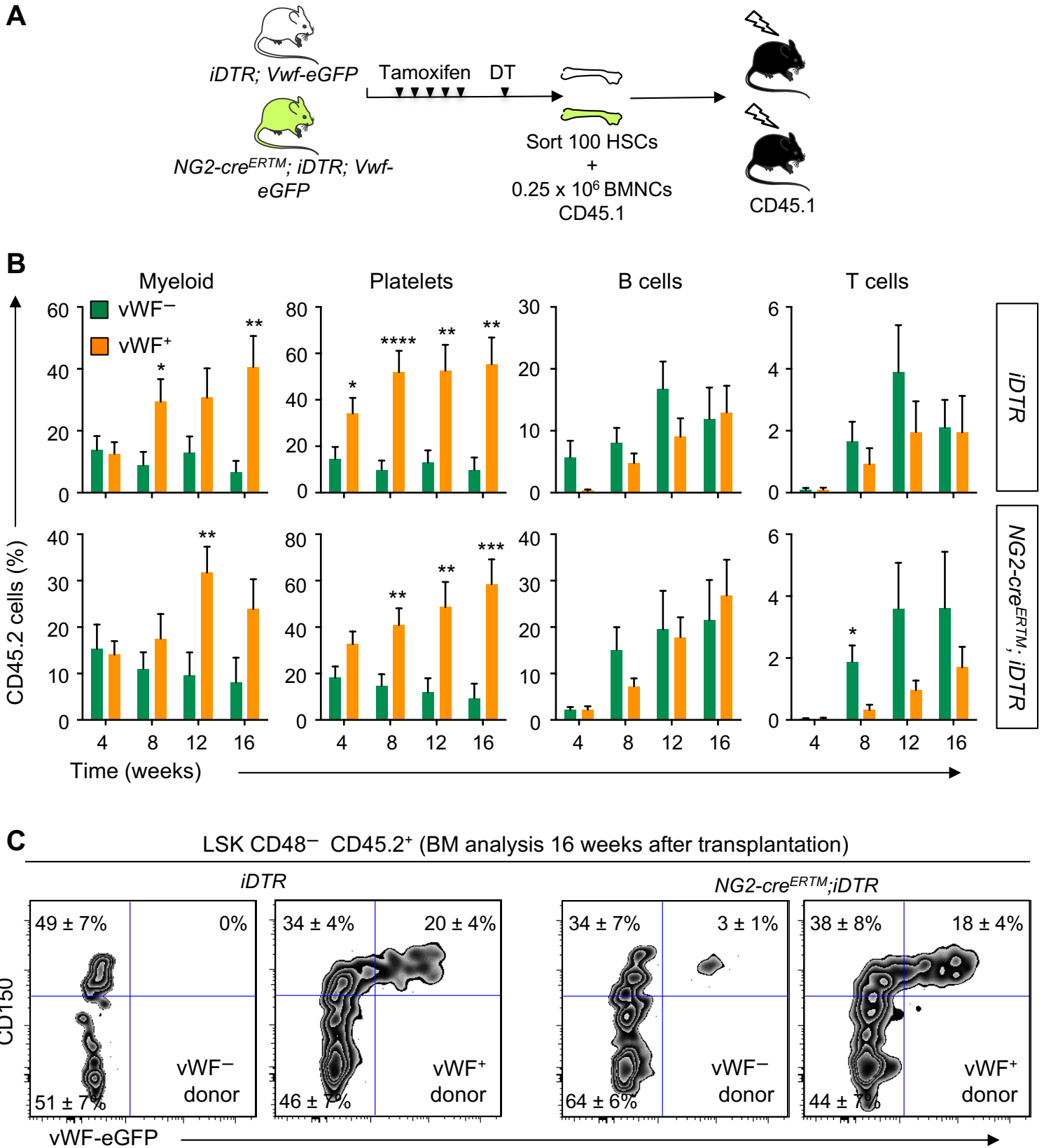


Figure S4, related to Figure 3. Reconstitution potential of lineage-biased HSCs after NG2⁺ cells depletion

(A) Experimental design of the competitive reconstitution assays used to determine the effect of NG2⁺ cells depletion in the lineage potential of purified vWF⁻ and vWF⁺ HSCs. (B) Quantification of tri-lineage (myeloid, B cell and T cell) and platelet engraftment in the peripheral blood of mice analyzed in **Figure 3F-H**. $n = 8$ (*iDTR* groups) and $n = 9$ (*NG2-cre^{ERTM};iDTR* groups). (C) Representative BM FACS plots showing donor HSCs contribution to recipient CD45.2⁺ LSK CD48⁻ CD150⁺ vWF-eGFP⁻ or vWF-eGFP⁺ HSC compartment at 16 weeks from the mice analyzed in **Figure 3F-H**. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Error bars S.E.M. Unpaired Student's *t* tests (B).

ARTICLE 3

Leukemic Stem Cells: From Leukemic Niche Biology to Treatment Opportunities

Tony Marchand and Sandra Pinho

Front. Immunol. 15 October 2021

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.775128>



Leukemic Stem Cells: From Leukemic Niche Biology to Treatment Opportunities

Tony Marchand^{1,2,3*} and Sandra Pinho⁴

¹ Service d'Hématologie Clinique, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Rennes, France, ² Faculté de médecine, Université Rennes 1, Rennes, France, ³ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1236, Rennes, France, ⁴ Department of Pharmacology & Regenerative Medicine, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL, United States

OPEN ACCESS

Edited by:

Dominique Bonnet,
Francis Crick Institute,
United Kingdom

Reviewed by:

Andre Larochelle,
National Institutes of Health (NIH),
United States
Robert Welner,
University of Alabama at Birmingham,
United States

*Correspondence:

Tony Marchand
tony.marchand@chu-rennes.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Cytokines and Soluble
Mediators in Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 13 September 2021

Accepted: 28 September 2021

Published: 15 October 2021

Citation:

Marchand T and Pinho S (2021)
Leukemic Stem Cells: From
Leukemic Niche Biology to
Treatment Opportunities.
Front. Immunol. 12:775128.
doi: 10.3389/fimmu.2021.775128

Acute myeloid leukemia (AML) is one of the most common types of leukemia in adults. While complete remission can be obtained with intensive chemotherapy in young and fit patients, relapse is frequent and prognosis remains poor. Leukemic cells are thought to arise from a pool of leukemic stem cells (LSCs) which sit at the top of the hierarchy. Since their discovery, more than 30 years ago, LSCs have been a topic of intense research and their identification paved the way for cancer stem cell research. LSCs are defined by their ability to self-renew, to engraft into recipient mice and to give rise to leukemia. Compared to healthy hematopoietic stem cells (HSCs), LSCs display specific mutations, epigenetic modifications, and a specific metabolic profile. LSCs are usually considered resistant to chemotherapy and are therefore the drivers of relapse. Similar to their HSC counterpart, LSCs reside in a highly specialized microenvironment referred to as the “niche”. Bidirectional interactions between leukemic cells and the microenvironment favor leukemic progression at the expense of healthy hematopoiesis. Within the niche, LSCs are thought to be protected from genotoxic insults. Improvement in our understanding of LSC gene expression profile and phenotype has led to the development of prognosis signatures and the identification of potential therapeutic targets. In this review, we will discuss LSC biology in the context of their specific microenvironment and how a better understanding of LSC niche biology could pave the way for new therapies that target AML.

Keywords: leukemic stem cell (LSC), acute myeloid leukemia, stem cell niche, genetic heterogeneity, therapeutic targets

INTRODUCTION

Acute myeloid leukemia (AML) is the most common type of acute leukemia in adults. AML is characterized by the clonal proliferation of abnormal hematopoietic progenitors leading to blood and bone marrow infiltration and consequently hematopoietic failure (1). Over the past decades, intensive research has significantly improved our understanding of AML biology, highlighting the role of clonal evolution and identifying potential therapeutic targets based on recurrent molecular abnormalities (2, 3). However, therapeutic progress has been limited (4). Despite a promising initial

response to intensive chemotherapy, relapse occurs in the majority of patients and prognosis remains poor with a long-term overall survival of 40–50% in patients younger than 60 years old (5–8). In older patients not able to endure intensive chemotherapy, therapeutic options are limited, and long-term overall survival remains low at 15% (9, 10).

Leukemic stem cells (LSCs), also sometimes referred to as leukemic initiating cells, were first described 25 years ago, when Lapidot et al. showed that a small subset of leukemic cells could be transplanted and give rise to leukemia in immunocompromised recipient mice (11). The same group later identified the CD34^{pos}CD38^{neg} phenotype as a way to enrich the LSC population. Similar to normal hematopoietic stem cells (HSCs), LSCs are able to differentiate and self-renew suggesting a leukemic hierarchy (12–16).

Like their normal counterpart, LSCs reside in the bone marrow in a specialized microenvironment termed “niche”. Schofield first described the concept of niche in 1978 and defined it as a limited specific anatomical site where stem cells could be maintained, undergo self-renewal, and where differentiation is inhibited (17). Over the past 20 years, the development of transgenic mice and the improvement of imaging techniques has led to several breakthrough discoveries suggesting that the bone marrow microenvironment plays a central role in normal and pathological hematopoiesis (18). Within the niche, LSCs are thought to be protected from chemotherapy (19–22). Therefore, targeting the LSCs niche represents a promising option to cure AML.

LEUKEMIC STEM CELLS ONTOGENY AND PHENOTYPE

The concept of LSCs is based on the idea that a small subset of cells is able to continually replenish the bulk of leukemic cells. Leukemic stem cells are defined by their capacity to self-renew, incompletely differentiate, and reinitiate leukemia upon serial transplantation in immunocompromised mice (11, 23). Initially thought to originate from the healthy HSC compartment, recent studies have shown that LSCs may instead emerge from committed progenitors (24, 25). Most of human AMLs have at least two molecularly hierarchically ordered distinct LSCs populations (24). Interestingly, the more mature LSC population most closely mirrors normal granulocyte-macrophages progenitors (GMP) whereas the immature LSC population is functionally similar to lymphoid-primed multipotent progenitors (LMPPs). Leukemia originates from the acquisition of driver mutations by HSC or early progenitors (26–28). Identification of clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) has recently generated a significant interest (29). The sequential acquisition of mutations in HSCs and progenitors over a lifetime is suspected to favor hematological malignancies. However, given the high frequency of CHIP in the general population, the exact significance of these mutations and implication in leukemogenesis still needs clarification. To add more

complexity, LSCs ontogeny seems to be reversible as opposed to the previously accepted idea that LSCs unidirectionally differentiate into mature AML cells. Indeed, PU.1 gene suppression in differentiated AML-derived cells has been shown to revert AML cells to an immature, clonogenic leukemogenic state (30).

Following the pioneering work done by John Dick's group, showing that LSCs are enriched within the CD34^{pos}CD38^{neg} fraction, several surface markers have been described. Indeed, studies showed that when compared to normal HSCs, LSCs displayed a higher expression of CD25 (31), CD32 (31), CD44 (32), CD96 (33), CD123 (34–36), GPR56 (37), C-type lectin-like molecule-1 (38), IL1RAP (Interleukin 1 Receptor Accessory Protein) (39, 40), N-cadherin, and Tie2 (41). However, a high intra and inter-patients' heterogeneity prevents the use of a single surface marker to easily isolate LSCs.

THE HEALTHY HEMATOPOIETIC NICHE

Hematopoietic stem cells reside in a highly specialized microenvironment or niche within the bone marrow (18). Cellular and molecular interactions between niche constituents and HSCs tightly control their self-renewal, proliferation, and differentiation properties. The development of reporter mice and the improvement of imaging techniques has led to a better understanding of the niche since the concept was first proposed in 1978 (17). Studies have identified several cell populations, sometimes redundant, implicated in homeostatic and pathologic hematopoiesis. Similar to the heterogeneity of the hematopoietic system, niche cells are also highly heterogeneous (42–46).

Early studies have suggested a major role of osteoblasts in hematopoiesis by showing hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) and osteolineage cells in close proximity at steady state and after bone marrow transplantation, additionally osteoblasts have the capacity to support HSPCs *in vitro* (47–50). Other studies showed a correlation between the number of osteoblasts and Lin^{neg}Sca1^{pos}c-Kit^{pos} HSPCs (51, 52). However, the specific genetic deletion in osteoblast of two key cytokines required for HSC maintenance, *stem cell factor* (*Scf*) and *CXC-chemokine ligand 12* (*Cxcl12*), did not have a major effect on HSCs (53–55). In addition, 3-D imaging of the bone marrow revealed that HSCs were preferentially localized close to the vascular network but not to the endosteal surface (56, 57). However, osteolineage cells form a niche for early lymphoid progenitors (53, 54, 58), and are implicated in the development and progression of several hematological malignancies like leukemia (54, 58–61).

The identification of the SLAM cell surface markers allowed the imaging of purified HSCs in their native niche (62). This study and others revealed the close proximity of HSCs and blood vessels suggesting the existence of a vascular niche composed by different types of blood vessels and associated perivascular cells (18). Bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) represent a rare and heterogeneous population of stromal cells

characterized by their ability to self-renew and differentiate into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes (63). In the bone marrow, MSCs are located around the blood vessels where they closely interact with HSCs and support hematopoiesis. The development of new transgenic mice models led to the identification of several MSC subsets with significant overlap between the different populations identified (53, 55, 64–68). BM-MSCs are major sources of key niche factors important for the maintenance, proliferation and retention in the mouse bone marrow of HSCs (69). Deletion of *Scf* or *Cxcl12* in stromal cells directly affects HSC number and localization (67, 70, 71). Recent single cell RNA sequencing-based studies have confirmed the high heterogeneity among stromal cells in the bone marrow in particular within the MSC compartment at an unprecedented resolution (42, 44, 45).

The bone marrow is highly vascularized which provides nutrients and oxygen and furthermore allows HSCs and newly generated hematopoietic cells to leave the bone marrow and circulate throughout the body. Bone marrow vascularization is composed of thin-walled arterioles paralleled to the long bone axis and mostly closed to the endosteal region. Arteriolar vessels are connected to the dense network of highly branched sinusoids by type-H vessels at the proximity of the bone (72). Endothelial cells are also key regulators of HSC maintenance and function, and most HSCs localize within 5 μ m of a bone marrow vessel (56, 62). Indeed, endothelial cells express several factors that regulate HSC function such as SCF, CXCL12, and Notch ligands among others. Depletion of these factors has a dramatic effect on HSC number at steady state and hematopoietic recovery following myeloablative treatment (53–55, 73, 74).

The nervous system plays a crucial role in bone and bone marrow homeostasis (75). Whereas parasympathetic fibers only innervate the compact bone, the bone marrow cavity is innervated by both sympathetic and sensory nerves (76, 77). Although sympathetic nerves do not regulate HSC directly, they are important regulators of HSC mobilization from the bone marrow in response to G-CSF (78). HSCs are also released into the circulation in a circadian manner in response to adrenergic signals from the sympathetic nervous system (SNS) that regulate the synthesis of MSC derived CXCL12, critical for the retention of HSCs inside the bone marrow (65, 78, 79). Interestingly, nociceptive nerves collaborate with the SNS in HSC maintenance and G-CSF-induced mobilization *via* the secretion of calcitonine gene-related peptide (80). Bone marrow neuropathy observed in aging or after the administration of genotoxic drugs induced a profound remodeling of the HSC niche and affected bone marrow regeneration (81–83). Non-myelinating Schwann cells are also involved in HSCs maintenance by converting the latent Transforming Growth Factor β (TGF β) into the active form inducing HSCs quiescence (84).

In addition to bone marrow stromal cells, healthy HSCs are also directly and indirectly regulated by their own hematopoietic progeny including megakaryocytes, macrophages, regulatory T cells, neutrophils and other myeloid cells, reviewed elsewhere (18).

THE LEUKEMIC NICHE

Although the exact location of LSCs within the bone marrow niche still needs to be clarified, it is now clear that the microenvironment plays a role in leukemogenesis and that leukemic cells can also alter the bone marrow at the expense of physiological hematopoiesis.

A Potential Role of the Microenvironment in Leukemogenesis

Leukemogenesis was long regarded as a cell autonomous process. This dogma was challenged by the early description of donor cell derived leukemia in bone marrow transplanted patients (85). These observations supported the “seed and soil” theory proposed by Paget in 1889 who suggested that tumor metastasis required favorable interactions between tumor cells (the “seed”) and their microenvironment (the “soil”) (86). The role of non-hematopoietic cells in leukemogenesis was first demonstrated by the development of transgenic mice and the capacity to delete genes in a cell-specific manner. In the context of hematological malignancies, the proof of concept came from the description of a myeloproliferative disorder induced by deregulated expression of Jagged 1 in $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ deficient hepatocytes. In contrast, mice with a conditional deletion of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ specifically in the myeloid lineage did not develop any myeloproliferative neoplasm (MPN) (87), suggesting that premalignant hematopoietic disorders can be initiated by nonhematopoietic cells. Walkley, et al. demonstrated the role of the retinoic acid receptor- γ (RAR γ) in niche-driven MPN. Mice deficient in RAR γ developed a MPN-like phenotype even when transplanted with wild-type cells (88). The same group investigated the role of the retinoblastoma protein (RB) in hematopoiesis and demonstrated that the deletion of *Rb* induced a MPN-like phenotype only when deleted in both the hematopoietic and non-hematopoietic compartments (89). These studies support the role of the interaction between hematopoietic cells and their microenvironment in the development of hematological malignancies.

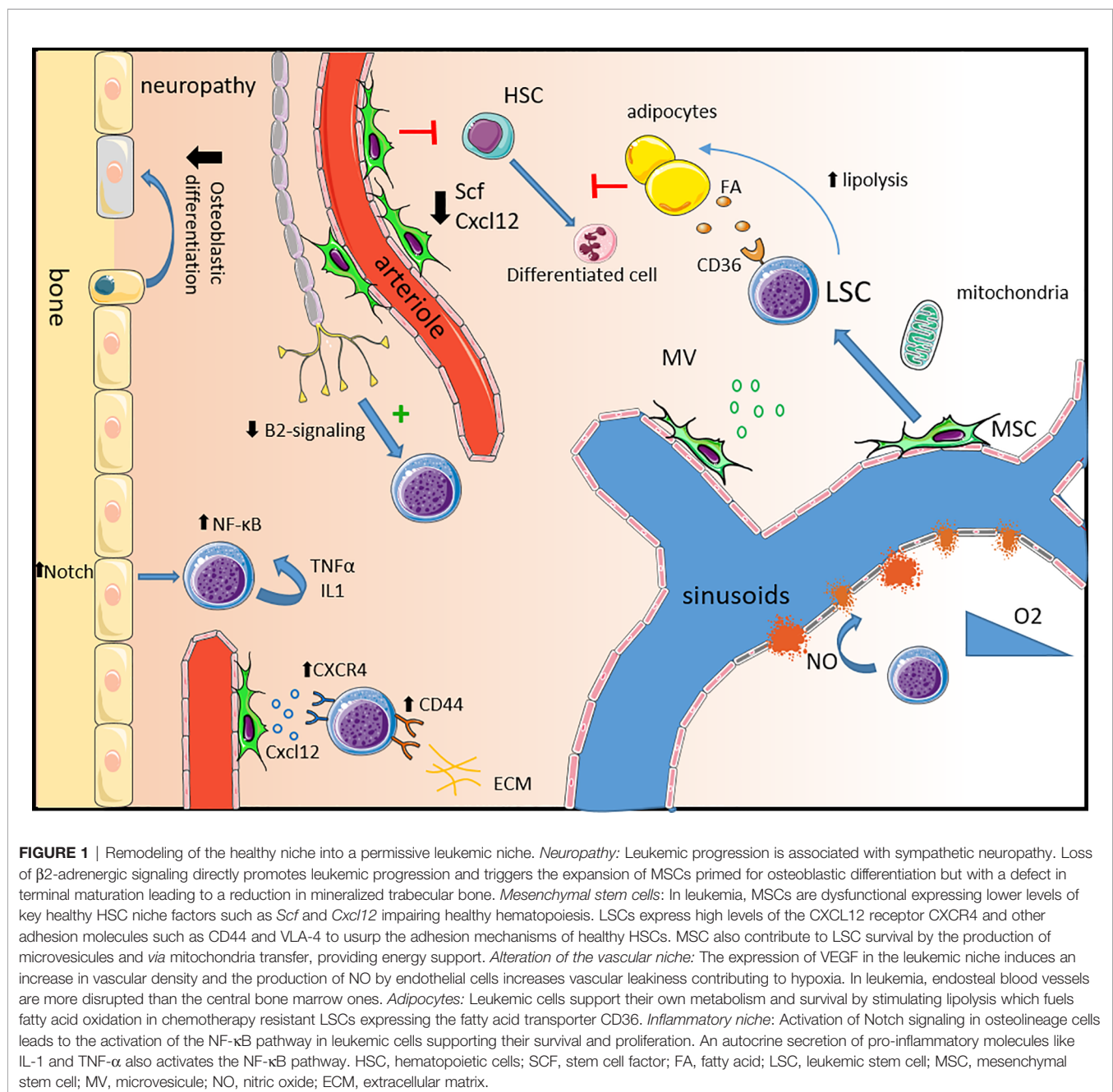
Bone marrow MSCs play a central role in the regulation of HSCs during homeostatic hematopoiesis while also involved in the development of myelodysplasia and leukemia. Indeed, specific deletion of the gene encoding Dicer 1, an enzyme involved in micro-RNA processing in osteoprogenitors induces myelodysplasia and sporadic secondary leukemia (59). This phenotype was not observed when *Dicer1* was deleted in the hematopoietic cells demonstrating that the myelodysplasia was environmentally induced. Deletion of *Dicer1* induced the downregulation of *Sbds*, a gene mutated in Schwachman-Bodian-Diamond syndrome, which is a rare human disease characterized by bone marrow failure and a predisposition to leukemia. Specific deletion of *Sbds* in MSCs induced mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and activation of the DNA damage response in HSPCs ultimately impairing hematopoiesis and favoring leukemogenesis (90). This effect is a consequence of the secretion of the pro-inflammatory

molecules, S100A8 and S100A9, by MSCs. Conditional expression of a mutated form of *Ptpn11*, the gene encoding for the protein tyrosine phosphatase SHP2, in MSCs and osteoprogenitors also induced a MPN-like phenotype (91). To further support the role of the osteolineage compartment in leukemogenesis, activating mutation of beta-catenin in osteoblasts induced AML by activation of Notch signaling in HSPCs (92). By contrast, the defective activation of Notch in the microenvironment leads to myeloproliferative disease (93). This effect is attributed to a Notch-dependent repression of the micro-RNA miR-155, regulating the inflammatory state of the bone marrow niche (94).

Healthy hematopoiesis is the consequence of close and highly regulated interactions between HSPCs and their microenvironment. Overall, cumulative evidence suggests that niche constituents can also drive hematopoietic malignancy.

Remodeling of the Hematopoietic Niche by Leukemic Cells

As our knowledge of the normal hematopoietic niche improved in the past 20 years, the role of the microenvironment in leukemia development captured the attention of the field. Leukemic cells can remodel the niche creating a favorable microenvironment at the expense of the normal hematopoiesis



(**Figure 1**) (95). Imaging studies in mice have shown that chemotherapy resistant human LSCs primarily home to and engraft close to the endosteal region where they closely interact with different microenvironmental structures (19).

The bone marrow vascularization is altered in AML with an increased micro-vessel density consequence of the production of pro-angiogenic factors like vascular endothelial growth factor (VEGF) (96–99). AML progression induces the production of nitric oxide (NO) which increases vascular permeability and maintains overall hypoxia (100). Interestingly AML leads to a differential remodeling of vasculature in central and endosteal regions (101). A preferential disruption of the endosteal blood vessels leads to progressive remodeling of the endosteal stroma and the progressive loss of stromal cells. Inhibition of the AML-driven vascular remodeling was shown to improve chemotherapy efficiency in mice (100, 101).

Leukemic cells can reprogram MSCs to create a pro-tumoral niche. MSCs reprogramming can occur following direct cell-to-cell contact, *via* secreted factors, or *via* exosomes (102–104). In addition, human MSCs isolated from AML patients (AML-MS) displayed *in-vitro* reduced proliferative potential and increased levels of apoptosis (105). Compared to MSCs isolated from healthy donors, AML-MSCs have a lower expression of several niche factors such as SCF, THPO, ANGPT1, VCAM1 and BMI1 (106). In mice, MSCs support AML cells by transferring mitochondria to provide additional energy (107, 108). This transfer is enhanced by some chemotherapies and provides a survival advantage to leukemic blasts and LSCs. This transfer occurs through AML-derived nanotubes. Study in mice showed that superoxide produced by AML cells NADPH oxidase-2 (NOX2) stimulates the nanotubes formation in MSCs. Interestingly, inhibition of NOX2 was able to prevent mitochondrial transfer and improved survival in a xenograft model (107). MSCs also help LSCs to cope with increased reactive oxygen species (ROS) levels, consequence of the mitochondrial transfer by providing increased bioenergetics and detoxifying enzymes (109). Furthermore, MSCs protect AML from chemotherapy through increased Notch and Wnt signaling and inhibition of apoptosis (110–113). Dysregulation of the cytokine profile is suspected to create a pro-tumoral niche in AML (114, 115). LSCs reside in a pro-inflammatory environment known to favor LSCs survival and proliferation. As opposed to normal HSCs and differentiated blasts, LSCs exhibit constitutive NF- κ B activity. This activity is partly the consequence of an autocrine tumor necrosis factor- α (TNF- α) secretion, formed by an NF- κ B/TNF- α positive feedback loop (116). Activation of Notch signaling also contributes to the activation of the NF- κ B pathway (111). Similarly, LSCs aberrantly express the co-receptor for interleukine-1 (IL-1), IL1RAP. Downregulation of IL1RAP inhibits the clonogenic activity of AML cells and leads to increased apoptosis (39). Interestingly, LSCs express IL-1 suggesting another pro-inflammatory autocrine loop. Within the leukemic niche, cytokines can be produced by either immune or leukemic cells. Several cytokines and soluble factors have been shown to affect

leukemic cells survival and growth *in-vitro* (117). While pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , GM-CSF, IL-3, TNF- α seem to promote AML cells growth, anti-inflammatory molecules such as IL-1R α , TGF- β and IL-10 have an inhibitory effect (117–119). The function of a specific cytokine is dependent on multiple complex molecular interactions within the microenvironment. Therefore, despite a major improvement in our understanding over the past decade, further studies are needed to clarify the cytokine network in AML.

Adipocytes are classically considered negative regulators of normal hematopoiesis (120). However, this negative action seems to depend on adipocytes anatomical location. Indeed, adipocytes in the active red bone marrow support blood regeneration and myelo-erythroid maturation (121, 122). In the context of AML, leukemic cells repress bone marrow adipocyte maturation impairing myelo-erythroid differentiation (122). Leukemic cells induce the lipolysis of triglyceride to free fatty acids supporting their proliferation and survival (123). Interestingly, outside the bone marrow, gonadal adipose tissue represents a reservoir for LSCs. Within this adipose tissue, leukemic cells create an inflammatory environment triggering lipolysis and the released of fatty acids that fuel LSCs expressing the fatty acid transporter CD36, contributing to chemoresistance (124).

The sympathetic nervous system is a critical regulatory component of the bone marrow microenvironment that controls the plasticity of bone marrow stromal cells under homeostatic conditions (78, 79, 125). Aging, a condition associated with myeloid biased hematopoiesis and an increased risk of myelodysplastic syndromes and leukemia is associated with sympathetic neuropathy and decreased β 3-adrenergic signaling (82, 83). In a MLL-AF9 mouse model, AML infiltration induced sympathetic neuropathy which further promoted AML (60). This neuropathy was associated with an expansion of Nestin-GFP^{pos} MSCs primed for osteolineage differentiation, and HSC exhaustion. Loss of β 2-adrenergic signals directly promotes an expansion of LSCs expressing the β 2-adrenergic receptor. Studies using primary AML cells from patients showed that leukemic cells altered adipogenesis in favor of osteolineage differentiation (122, 126). However, sympathetic neuropathy impairs terminal osteoblastic lineage differentiation leading to a reduction in mineralized bone density (60). Sympathetic neuropathy was also induced by the pro-inflammatory environment observed in a JAK2^{V617F} MPN mouse model (127). In this context, Nestin-GFP^{pos} MSCs are reduced, which in turn led to the expansion of altered HSPCs and disease progression.

Similar to their healthy counterpart, LSC localization is dependent on the expression of cytokines and adhesion receptors. Leukemic cells adhere to the bone marrow through three main receptors: CXCR4, Very Late Antigen-4 (VLA-4) and CD44 (128). The high expression of these adhesion molecules facilitates the homing and retention of leukemic cells in the niche impairing chemosensitivity (32, 129–131). In addition, interactions between VLA-4 expressed by leukemic cells and

VCAM1 expressed at the surface of BM-MSc mediates chemoresistance *via* activation of the NF- κ B pathway in stromal cells (20).

LEUKEMIC STEM CELLS: A THERAPEUTIC OPPORTUNITY

LSCs as a Prognostic Marker

Patients with AML are treated according to a risk stratification aiming to identify the patients with low, intermediate, and high risk of relapse based on the disease characteristics at diagnosis (9). Since LSCs have been implicated in treatment resistance and relapse, quantification of the LSC pool could be an additional prognostic factor beside the traditional genetic and molecular abnormalities. As we discussed before, a clear definition of the LSC phenotype does not exist, and different approaches have been used to estimate the LSC pool in patients. Using flow cytometry, Zeijlemaker W. et al. showed that CD34-positive AML blasts were associated with an increased incidence of relapse compared to CD34-negative AML (132). More recently, the prognostic impact of LSC frequency defined by the CD34^{pos}CD38^{neg} phenotype combined with minimal residual disease (MRD) evaluation was demonstrated in a prospective study (133). High level of CD34^{pos}CD38^{low}/CD123^{pos} blasts at diagnosis is predictive of an adverse outcome (134). Interestingly, a recent study performed in older AML patients showed that this predictive impact is only seen in patients treated by intensive chemotherapy but not by hypomethylating agents (36). Leukemic stem cells frequency seems to be correlated with a lower white blood cell count, an adverse cytogenetic risk, and less frequent NPM1 mutation (36, 135).

Stem cell gene expression signatures have been shown to have a prognostic impact in AML, also highlighting the potential role of leukemia stemness in treatment response (25). Based on this observation, a 17 genes score (LSC17) that compared the gene expression profiles between 138 LSC^{pos} and 89 LSC^{neg} isolated from 78 AML patients was developed (136). A high score is associated with a poor outcome after standard treatment including HSC transplantation (136). The LSC17 was recently challenged by the newly developed AML prognostic score (APS), a 16 gene expression signature score, derived from RNA-sequencing and whole exome sequencing results (137). Interestingly, the authors hypothesized that APS can outperform the LSC17 because of its capacity to capture signal from the microenvironment.

How to Target the Leukemic Stem Cell Niche

Compared with other hematological malignancies, therapeutic progresses have been limited in AML highlighting the need for new strategies. The microenvironment shelters LSCs, protects them from genotoxic drugs and therefore represents a possible cause of treatment failure and relapse. Different strategies have attempted to target the LSC-niche interactions and several studies are currently ongoing (**Figure 2**). LSCs can also be

directly targeted based on their phenotypic and functional differences compared to healthy HSCs. These strategies are beyond the scope of this article and have been reviewed elsewhere (31, 138–140).

Adhesion Molecules

Adhesion molecules maintain LSCs in the hypoxic niche protecting them from cycling-dependent chemotherapies. Targeting adhesion molecules aims to mobilize LSCs out of their protective niche in order to expose them to chemotherapy. LSCs express the receptor CXCR4 and migrate in response to CXCL12 (141). Moreover, high levels of CXCR4 expression are associated with relapse and poor overall survival in patients (142). Plerixafor, a potent inhibitor of CXCR4, is currently used in association with G-CSF to induce HSCs mobilization (143). In an acute promyelocytic leukemia murine model, treatment with plerixafor in combination with cytarabine and daunorubicin improved chemosensitivity and overall survival (144). Since this early study, plerixafor has been tested in phase I-II studies, in combination with various chemotherapies and hypomethylating agents with promising results (145–147). Other CXCR4-CXCL12 axis inhibitors are under clinical development like CX-01, BL-8040 and ulocuplumab. These drugs showed encouraging results in combination with chemotherapy in phase I-II studies (148–151). However, larger phase III studies are needed to confirm the benefit and the exact place of the CXCR4-CXCL12 axis inhibition in AML treatment strategy.

Bromodomain and extra-terminal domain-containing (BET-containing) proteins (BETPs)-inhibitors, can also target adhesion molecules. Sustained degradation of BETPs induced the downregulation of CXCR4 and CD44 expression, decreased the LSC population, and improved overall survival in a patient-derived xenotransplantation model (152). Importantly, BETPs inhibition significantly reduced the number of LSCs when used alone or in combination with chemotherapy. CD44 represents an exciting target since it is differentially expressed between LSCs and normal HSCs (130, 131). Administration of H90, a monoclonal antibody directed to CD44, in immunocompromised mice transplanted with human AML reduced the leukemic burden. Interestingly, H90 seemed to specifically target the LSCs population since no leukemia was observed in serially transplanted mice (32).

Vascularization Remodeling and Hypoxia

VEGF was early identified as a promising target given its pro-angiogenic and anti-apoptotic effects on leukemic cells (153). However, results of clinical studies using bevacizumab, a humanized recombinant monoclonal antibody directed against VEGF have proven disappointing (154, 155). A recent study in mice suggests that inhibition of NO production by endothelial cells could restore the normal vascularization and improve response to cytarabine (100). Targeting NO production by inhibiting the NO synthase could therefore represent a new therapeutic target. The niche represents a hypoxic environment that maintains LSCs in a quiescent state. Moreover, hypoxia inducible factor-1 (HIF-1 α) expression induced by hypoxia

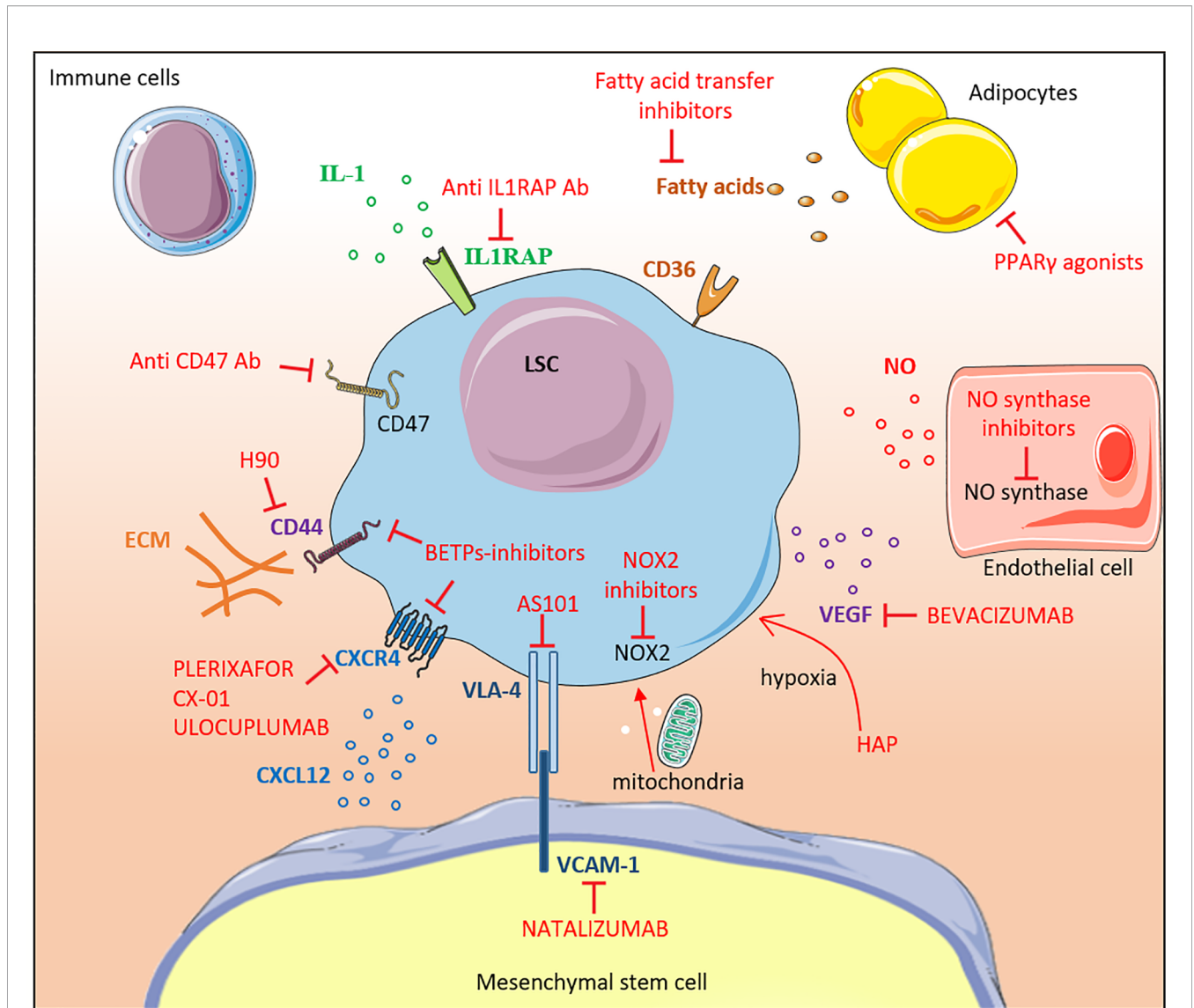


FIGURE 2 | Therapeutic targeting of the leukemic niche. The different molecular interactions between LSCs and the bone marrow niche constituents are shown. Inhibitors are labeled in red. Most of the drugs shown in the figure are under pre-clinical or early clinical development. IL-1, interleukine-1; Ab, antibody; CD, cluster of differentiation, FA, fatty acid; LSC, leukemic stem cell; MSC, mesenchymal stem cell; NOX2, NADPH oxidase 2; NO, nitric oxide; ECM, extracellular matrix; VEGF, vascular endothelial growth factor; HAP, Hypoxia-activated prodrugs; PPAR γ , Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma; VCAM-1, Vascular Cell Adhesion Molecule-1; BETPs, Bromodomain Extra-Terminal Protein.

upregulates CXCR4 expression at the membrane surface of LSCs (19). However, the exact impact of HIF-1 α inhibition is still debated (156, 157). Another way to target the hypoxic microenvironment is to use hypoxia-activated prodrugs (HAPs) (158) specifically designed to form cytotoxic agents under hypoxic conditions while limiting the toxicity on normal tissues. Evofosfamide (also known as TH-302) is a 2-nitroimidazole-linked prodrug. *In vitro*, evofosfamide treatment promotes a dose- and hypoxia-dependent apoptosis and cell death in AML cells. Interestingly, in a xenograft model, evofosfamide reduces LSC pool with limited toxicity on normal hematopoiesis (159, 160). However, a phase I study conducted in

49 patients with advanced leukemia showed disappointing results with an overall response rate of only 6% only (161). Other HAPs are currently under development.

Cytokines and Soluble Factors

Targeting the pro-inflammatory environment represents another interesting strategy considering the importance of cytokines like IL-1, IL-6 and TNF α for LSC survival and proliferation. IL-1 and IL-6 inhibitors are already commercially available for the treatment of autoimmune disease and cytokine released syndromes (162, 163). It would be interesting to test these inhibitors in combination with chemotherapy even if caution is

needed regarded the risk of infections. Given the higher expression of IL1RAP at the surface of LSCs compared with normal HSCs, targeting IL1RAP is an attractive option. Indeed, in a preclinical study, targeting IL1RAP using a monoclonal antibody induced selective killing of AML CD34^{pos}CD38^{pos}, and CD34^{pos}CD38^{neg} cells both *in vitro* and in a xenograft model (164).

Since leukemic cells trigger lipolysis and use fatty acids as a source of energy, targeting the adipose tissue represents another possible strategy. Studies in mice have shown that restoring normal adipocyte maturation using PPAR γ agonists inhibits leukemic growth. Similarly, inhibiting fatty acids transfer to leukemic cells improved survival in a xenograft model (123). However, further studies in human are warranted.

CONCLUSION

According to the cancer stem cell theory, LSCs sit at the top of the hierarchy and are the source of the more differentiated leukemic blasts. Even if these cells represent an attractive target, eradicating LSCs is highly complex, notably due to the lack of specific markers. AML is associated with a remodeling of the hematopoietic niche where HSCs and LSCs reside, however, modifications of the microenvironment also contribute to leukemia development at the expense of normal hematopoiesis. Since the first description of LSCs more than 25 years ago, our

understanding of this small subset of leukemic cells has greatly improved with the identification of potential therapeutic targets paving the way for the development of new treatment strategies in a still deadly disease.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

TM and SP conceptualized and finalized the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

TM is supported by the “association pour le développement de l’hématologie oncologie/ADHO”.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors apologize to investigators whose work could not be cited owing to space limitations. The authors thank Anna Di Staulo and Charles Ayemoba for helpful discussions.

REFERENCES

- Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* (2015) 373(12):1136–52. doi: 10.1056/NEJMra1406184
- Cancer Genome Atlas Research N, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, et al. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* (2013) 368(22):2059–74. doi: 10.1056/NEJMoa1301689
- DiNardo CD, Wei AH. How I Treat Acute Myeloid Leukemia in the Era of New Drugs. *Blood* (2020) 135(2):85–96. doi: 10.1182/blood.2019001239
- Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and Management of AML in Adults: 2017 ELN Recommendations From an International Expert Panel. *Blood* (2017) 129(4):424–47. doi: 10.1182/blood-2016-08-733196
- Burnett A, Wetzler M, Lowenberg B. Therapeutic Advances in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* (2011) 29(5):487–94. doi: 10.1200/JCO.2010.30.1820
- Ganzel C, Sun Z, Cripe LD, Fernandez HF, Douer D, Rowe JM, et al. Very Poor Long-Term Survival in Past and More Recent Studies for Relapsed AML Patients: The ECOG-ACRIN Experience. *Am J Hematol* (2018) 00:1–8. doi: 10.1002/ajh.25162
- Marcucci G, Haferlach T, Dohner H. Molecular Genetics of Adult Acute Myeloid Leukemia: Prognostic and Therapeutic Implications. *J Clin Oncol* (2011) 29(5):475–86. doi: 10.1200/JCO.2010.30.2554
- Breems DA, Van Putten WL, Huijgens PC, Ossenkoppele GJ, Verhoef GE, Verdonck LF, et al. Prognostic Index for Adult Patients With Acute Myeloid Leukemia in First Relapse. *J Clin Oncol* (2005) 23(9):1969–78. doi: 10.1200/JCO.2005.06.027
- Dombret H, Seymour JF, Butrym A, Wierzbowska A, Selleslag D, Jang JH, et al. International Phase 3 Study of Azacitidine vs Conventional Care Regimens in Older Patients With Newly Diagnosed AML With >30% Blasts. *Blood* (2015) 126(3):291–9. doi: 10.1182/blood-2015-01-621664
- Song X, Peng Y, Wang X, Chen Y, Jin L, Yang T, et al. Incidence, Survival, and Risk Factors for Adults With Acute Myeloid Leukemia Not Otherwise Specified and Acute Myeloid Leukemia With Recurrent Genetic Abnormalities: Analysis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Database, 2001–2013. *Acta Haematol* (2018) 139(2):115–27. doi: 10.1159/000486228
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A Cell Initiating Human Acute Myeloid Leukaemia After Transplantation Into SCID Mice. *Nature* (1994) 367(6464):645–8. doi: 10.1038/367645a0
- Farge T, Saland E, De Toni F, Aroua N, Hosseini M, Perry R, et al. Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells But Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discovery* (2017) 7(7):716–35. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0441
- Lagadinou ED, Sach A, Callahan K, Rossi RM, Neering SJ, Minhajuddin M, et al. BCL-2 Inhibition Targets Oxidative Phosphorylation and Selectively Eradicates Quiescent Human Leukemia Stem Cells. *Cell Stem Cell* (2013) 12(3):329–41. doi: 10.1016/j.stem.2012.12.013
- Ma J, Liu B, Yu D, Zuo Y, Cai R, Yang J, et al. SIRT3 Deacetylase Activity Confers Chemoresistance in AML via Regulation of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. *Br J Haematol* (2019) 187(1):49–64. doi: 10.1111/bjh.16044
- Shih A, Jiang Y, Meydan C, Shank K, Pandey S, BarreYRO L, et al. Mutational Cooperativity Linked to Combinatorial Epigenetic Gain of Function in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* (2015) 27(4):502–15. doi: 10.1016/j.ccr.2015.03.009
- Jung N, Dai B, Gentles AJ, Majeti R, Feinberg AP. An LSC Epigenetic Signature is Largely Mutation Independent and Implicates the HOXA Cluster in AML Pathogenesis. *Nat Commun* (2015) 6(1):8489. doi: 10.1038/ncomms9489
- Schofield R. The Relationship Between the Spleen Colony-Forming Cell and the Haemopoietic Stem Cell. *Blood Cells* (1978) 4(1-2):7–25.
- Pinho S, Frenette PS. Haematopoietic Stem Cell Activity and Interactions With the Niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2019) 20(5):303–20. doi: 10.1038/s41580-019-0103-9

19. Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, Hijikata A, Kitamura H, Tanaka S, et al. Chemotherapy-Resistant Human AML Stem Cells Home to and Engraft Within the Bone-Marrow Endosteal Region. *Nat Biotechnol* (2007) 25 (11):1315–21. doi: 10.1038/nbt1350
20. Jacamo R, Chen Y, Wang Z, Ma W, Zhang M, Spaeth EL, et al. Reciprocal Leukemia-Stroma VCAM-1/VLA-4-Dependent Activation of NF- κ B Mediates Chemoresistance. *Blood* (2014) 123(17):2691–702. doi: 10.1182/blood-2013-06-511527
21. Schelker RC, Iberl S, Müller G, Hart C, Herr W, Grassinger J. TGF- β 1 and CXCL12 Modulate Proliferation and Chemotherapy Sensitivity of Acute Myeloid Leukemia Cells Co-Cultured With Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *Hematology* (2018) 23(6):337–45. doi: 10.1080/10245332.2017.1402455
22. Mendez-Ferrer S, Bonnet D, Steensma DP, Hasserjian RP, Ghibrial IM, Gribben JG, et al. Bone Marrow Niches in Haematological Malignancies. *Nat Rev Cancer* (2020) 20(5):285–98. doi: 10.1038/s41568-020-0245-2
23. Bonnet D, Dick JE. Human Acute Myeloid Leukemia is Organized as a Hierarchy That Originates From a Primitive Hematopoietic Cell. *Nat Med* (1997) 3(7):730–7. doi: 10.1038/nm0797-730
24. Goardon N, Marchi E, Atzberger A, Quek L, Schuh A, Soneji S, et al. Coexistence of LMPP-Like and GMP-Like Leukemia Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* (2011) 19(1):138–52. doi: 10.1016/j.ccr.2010.12.012
25. Eppert K, Takenaka K, Lechman ER, Waldron L, Nilsson B, van Galen P, et al. Stem Cell Gene Expression Programs Influence Clinical Outcome in Human Leukemia. *Nat Med* (2011) 17(9):1086–93. doi: 10.1038/nm.2415
26. Jan M, Snyder TM, Corces-Zimmerman MR, Vyas P, Weissman IL, Quake SR, et al. Clonal Evolution of Preleukemic Hematopoietic Stem Cells Precedes Human Acute Myeloid Leukemia. *Sci Transl Med* (2012) 4(149):149ra18. doi: 10.1126/scitranslmed.3004315
27. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Brandwein JM, Gupta V, et al. Identification of Pre-Leukaemic Haematopoietic Stem Cells in Acute Leukaemia. *Nature* (2014) 506(7488):328–33. doi: 10.1038/nature13038
28. Corces-Zimmerman MR, Hong WJ, Weissman IL, Medeiros BC, Majeti R. Preleukemic Mutations in Human Acute Myeloid Leukemia Affect Epigenetic Regulators and Persist in Remission. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (2014) 111(7):2548–53. doi: 10.1073/pnas.1324297111
29. Jaiswal S, Ebert BL. Clonal Hematopoiesis in Human Aging and Disease. *Sci* (2019) 366(6465):eaan4673. doi: 10.1126/science.aan4673
30. McKenzie MD, Ghisi M, Oxley EP, Ngo S, Cimmino L, Esnault C, et al. Interconversion Between Tumorigenic and Differentiated States in Acute Myeloid Leukemia. *Cell Stem Cell* (2019) 25(2):258–72 e9. doi: 10.1016/j.stem.2019.07.001
31. Saito Y, Kitamura H, Hijikata A, Tomizawa-Murasawa M, Tanaka S, Takagi S, et al. Identification of Therapeutic Targets for Quiescent, Chemotherapy-Resistant Human Leukemia Stem Cells. *Sci Transl Med* (2010) 2(17):17ra9. doi: 10.1126/scitranslmed.3000349
32. Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. Targeting of CD44 Eradicates Human Acute Myeloid Leukemic Stem Cells. *Nat Med* (2006) 12(10):1167–74. doi: 10.1038/nm1483
33. Hosen N, Park CY, Tatsumi N, Oji Y, Sugiyama H, Gramatzki M, et al. CD96 is a Leukemic Stem Cell-Specific Marker in Human Acute Myeloid Leukemia. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (2007) 104(26):11008–13. doi: 10.1073/pnas.0704271104
34. Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, Guzman ML, Howard DS, Pettigrew AL, et al. The Interleukin-3 Receptor Alpha Chain is a Unique Marker for Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells. *Leukemia* (2000) 14(10):1777–84. doi: 10.1038/sj.leu.2401903
35. Jin L, Lee EM, Ramshaw HS, Busfield SJ, Peopel AG, Wilkinson L, et al. Monoclonal Antibody-Mediated Targeting of CD123, IL-3 Receptor Alpha Chain, Eliminates Human Acute Myeloid Leukemic Stem Cells. *Cell Stem Cell* (2009) 5(1):31–42. doi: 10.1016/j.stem.2009.04.018
36. Vergez F, Nicolau-Travers ML, Bertoli S, Rieu JB, Tavtiani S, Bories P, et al. CD34(+)/CD38(-)/CD123(+) Leukemic Stem Cell Frequency Predicts Outcome in Older Acute Myeloid Leukemia Patients Treated by Intensive Chemotherapy But Not Hypomethylating Agents. *Cancers (Basel)* (2020) 12(5):1174. doi: 10.3390/cancers12051174
37. Pabst C, Bergeron A, Lavallee VP, Yeh J, Gendron P, Norrdahl GL, et al. GPR56 Identifies Primary Human Acute Myeloid Leukemia Cells With High Repopulating Potential In Vivo. *Blood* (2016) 127(16):2018–27. doi: 10.1182/blood-2015-11-683649
38. van Rhenen A, van Dongen GA, Kelder A, Rombouts EJ, Feller N, Moshaver B, et al. The Novel AML Stem Cell Associated Antigen CLL-1 Aids in Discrimination Between Normal and Leukemic Stem Cells. *Blood* (2007) 110(7):2659–66. doi: 10.1182/blood-2007-03-083048
39. Barreyro L, Will B, Bartholdy B, Zhou L, Todorova TI, Stanley RF, et al. Overexpression of IL-1 Receptor Accessory Protein in Stem and Progenitor Cells and Outcome Correlation in AML and MDS. *Blood* (2012) 120(6):1290–8. doi: 10.1182/blood-2012-01-404699
40. Mitchell K, Barreyro L, Todorova TI, Taylor SJ, Antony-Debré I, Narayanagari SR, et al. IL1RAP Potentiates Multiple Oncogenic Signaling Pathways in AML. *J Exp Med* (2018) 215(6):1709–27. doi: 10.1084/jem.20180147
41. Qiu S, Jia Y, Xing H, Yu T, Yu J, Yu P, et al. N-Cadherin and Tie2 Positive CD34(+)/CD38(-)/CD123(+) Leukemic Stem Cell Populations can Develop Acute Myeloid Leukemia More Effectively in NOD/SCID Mice. *Leuk Res* (2014) 38(5):632–7. doi: 10.1016/j.leukres.2014.03.007
42. Baccin C, Al-Sabah J, Velten L, Helbling PM, Grünschlager F, Hernández-Malmierca P, et al. Combined Single-Cell and Spatial Transcriptomics Reveal the Molecular, Cellular and Spatial Bone Marrow Niche Organization. *Nat Cell Biol* (2020) 22(1):38–48. doi: 10.1038/s41556-019-0439-6
43. Wolock SL, Krishnan I, Tenen DE, Matkins V, Camacho V, Patel S, et al. Mapping Distinct Bone Marrow Niche Populations and Their Differentiation Paths. *Cell Rep* (2019) 28(2):302–11.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.06.031
44. Tikhonova AN, Dolgalev I, Hu H, Sivaraj KK, Hoxha E, Cuesta-Dominguez A, et al. The Bone Marrow Microenvironment at Single-Cell Resolution. *Nature* (2019) 569(7755):222–8. doi: 10.1038/s41586-019-1104-8
45. Baryawno N, Przybylski D, Kowalczyk MS, Kfoury Y, Severe N, Gustafsson K, et al. A Cellular Taxonomy of the Bone Marrow Stroma in Homeostasis and Leukemia. *Cell* (2019) 177(7):1915–32 e16. doi: 10.1016/j.cell.2019.04.040
46. Severe N, Karabacak NM, Gustafsson K, Baryawno N, Courties G, Kfoury Y, et al. Stress-Induced Changes in Bone Marrow Stromal Cell Populations Revealed Through Single-Cell Protein Expression Mapping. *Cell Stem Cell* (2019) 25(4):570–83 e7. doi: 10.1016/j.stem.2019.06.003
47. Ellis SL, Grassinger J, Jones A, Borg J, Camenisch T, Haylock D, et al. The Relationship Between Bone, Hemopoietic Stem Cells, and Vasculature. *Blood* (2011) 118(6):1516–24. doi: 10.1182/blood-2010-08-303800
48. Lord BI, Testa NG, Hendry JH. The Relative Spatial Distributions of CFUs and CFUc in the Normal Mouse Femur. *Blood* (1975) 46(1):65–72. doi: 10.1182/blood.V46.1.65.65
49. Gong JK. Endosteal Marrow: A Rich Source of Hematopoietic Stem Cells. *Science* (1978) 199(4336):1443–5. doi: 10.1126/science.75570
50. Taichman RS, Reilly MJ, Emerson SG. Human Osteoblasts Support Human Hematopoietic Progenitor Cells In Vitro Bone Marrow Cultures. *Blood* (1996) 87(2):518–24. doi: 10.1182/blood.V87.2.518.bloodjournal872518
51. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic Cells Regulate the Haematopoietic Stem Cell Niche. *Nature* (2003) 425(6960):841–6. doi: 10.1038/nature02040
52. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, et al. Identification of the Haematopoietic Stem Cell Niche and Control of the Niche Size. *Nature* (2003) 425(6960):836–41. doi: 10.1038/nature02041
53. Greenbaum A, Hsu YM, Day RB, Schuettelpelz LG, Christopher MJ, Borgerding JN, et al. CXCL12 in Early Mesenchymal Progenitors is Required for Haematopoietic Stem-Cell Maintenance. *Nature* (2013) 495(7440):227–30. doi: 10.1038/nature11926
54. Ding L, Morrison SJ. Haematopoietic Stem Cells and Early Lymphoid Progenitors Occupy Distinct Bone Marrow Niches. *Nature* (2013) 495(7440):231–5. doi: 10.1038/nature11885
55. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and Perivascular Cells Maintain Haematopoietic Stem Cells. *Nature* (2012) 481(7382):457–62. doi: 10.1038/nature10783
56. Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, Ahmed J, Pinho S, Zhang D, et al. Arteriolar Niches Maintain Haematopoietic Stem Cell Quiescence. *Nature* (2013) 502(7473):637–43. doi: 10.1038/nature12612
57. Nombela-Arrieta C, Pivarnik G, Winkel B, Cauty KJ, Harley B, Mahoney JE, et al. Quantitative Imaging of Haematopoietic Stem and Progenitor Cell

- Localization and Hypoxic Status in the Bone Marrow Microenvironment. *Nat Cell Biol* (2013) 15(5):533–43. doi: 10.1038/ncb2730
58. Zhu J, Garrett R, Jung Y, Zhang Y, Kim N, Wang J, et al. Osteoblasts Support B-Lymphocyte Commitment and Differentiation From Hematopoietic Stem Cells. *Blood* (2007) 109(9):3706–12. doi: 10.1182/blood-2006-08-041384
59. Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, et al. Bone Progenitor Dysfunction Induces Myelodysplasia and Secondary Leukaemia. *Nature* (2010) 464(7290):852–7. doi: 10.1038/nature08851
60. Hanoun M, Zhang D, Mizoguchi T, Pinho S, Pierce H, Kunisaki Y, et al. Acute Myelogenous Leukemia-Induced Sympathetic Neuropathy Promotes Malignancy in an Altered Hematopoietic Stem Cell Niche. *Cell Stem Cell* (2014) 15(3):365–75. doi: 10.1016/j.stem.2014.06.020
61. Asada N, Katayama Y. Regulation of Hematopoiesis in Endosteal Microenvironments. *Int J Hematol* (2014) 99(6):679–84. doi: 10.1007/s12185-014-1583-1
62. Kiel MJ, Yilmaz ÖH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells. *Cell* (2005) 121(7):1109–21. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.026
63. Frenette PS, Pinho S, Lucas D, Scheiermann C. Mesenchymal Stem Cell: Keystone of the Hematopoietic Stem Cell Niche and a Stepping-Stone for Regenerative Medicine. *Annu Rev Immunol* (2013) 31:285–316. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095919
64. Zhou BO, Yue R, Murphy MM, Peyer JG, Morrison SJ. Leptin-Receptor-Expressing Mesenchymal Stromal Cells Represent the Main Source of Bone Formed by Adult Bone Marrow. *Cell Stem Cell* (2014) 15(2):154–68. doi: 10.1016/j.stem.2014.06.008
65. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and Haematopoietic Stem Cells Form a Unique Bone Marrow Niche. *Nature* (2010) 466(7308):829–34. doi: 10.1038/nature09262
66. Mizoguchi T, Pinho S, Ahmed J, Kunisaki Y, Hanoun M, Mendelson A, et al. Osterix Marks Distinct Waves of Primitive and Definitive Stromal Progenitors During Bone Marrow Development. *Dev Cell* (2014) 29(3):340–9. doi: 10.1016/j.devcel.2014.03.013
67. Asada N, Kunisaki Y, Pierce H, Wang Z, Fernandez NF, Birbrair A, et al. Differential Cytokine Contributions of Perivascular Haematopoietic Stem Cell Niches. *Nat Cell Biol* (2017) 19(3):214–23. doi: 10.1038/ncb3475
68. Pinho S, Lacombe J, Hanoun M, Mizoguchi T, Bruns I, Kunisaki Y, et al. PDGFR α and CD51 Mark Human Nestin+ Sphere-Forming Mesenchymal Stem Cells Capable of Hematopoietic Progenitor Cell Expansion. *J Exp Med* (2013) 210(7):1351–67. doi: 10.1084/jem.20122252
69. Crippa S, Bernardo ME. Mesenchymal Stromal Cells: Role in the BM Niche and in the Support of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Hemasphere* (2018) 2(6):e151. doi: 10.1097/HS9.0000000000000151
70. Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K, et al. The Essential Functions of Adipo-Osteogenic Progenitors as the Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Niche. *Immunity* (2010) 33(3):387–99. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.017
71. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity* (2006) 25(6):977–88. doi: 10.1016/j.immuni.2006.10.016
72. Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of Angiogenesis and Osteogenesis by a Specific Vessel Subtype in Bone. *Nature* (2014) 507(7492):323–8. doi: 10.1038/nature13145
73. Poulos MG, Guo P, Kofler NM, Pinho S, Gutkin MC, Tikhonova A, et al. Endothelial Jagged-1 is Necessary for Homeostatic and Regenerative Hematopoiesis. *Cell Rep* (2013) 4(5):1022–34. doi: 10.1016/j.celrep.2013.07.048
74. Xu C, Gao X, Wei Q, Nakahara F, Zimmerman SE, Mar J, et al. Stem Cell Factor is Selectively Secreted by Arterial Endothelial Cells in Bone Marrow. *Nat Commun* (2018) 9(1):2449. doi: 10.1038/s41467-018-04726-3
75. Maryanovich M, Takeishi S, Frenette PS. Neural Regulation of Bone and Bone Marrow. *Cold Spring Harb Perspect Med* (2018) 8(9). doi: 10.1101/cshperspect.a031344
76. Mach DB, Rogers SD, Sabino MC, Luger NM, Schwei MJ, Pomonis JD, et al. Origins of Skeletal Pain: Sensory and Sympathetic Innervation of the Mouse Femur. *Neuroscience* (2002) 113(1):155–66. doi: 10.1016/S0306-4522(02)00165-3
77. Bellingier DL, Lorton D, Felten SY, Felten DL. Innervation of Lymphoid Organs and Implications in Development, Aging, and Autoimmunity. *Int J Immunopharmacol* (1992) 14(3):329–44. doi: 10.1016/0192-0561(92)90162-E
78. Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, et al. Signals From the Sympathetic Nervous System Regulate Hematopoietic Stem Cell Egress From Bone Marrow. *Cell* (2006) 124(2):407–21. doi: 10.1016/j.cell.2005.10.041
79. Mendez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. Haematopoietic Stem Cell Release is Regulated by Circadian Oscillations. *Nature* (2008) 452(7186):442–7. doi: 10.1038/nature06685
80. Gao X, Zhang D, Xu C, Li H, Caron KM, Frenette PS. Nociceptive Nerves Regulate Haematopoietic Stem Cell Mobilization. *Nature* (2021) 589(7843):591–6. doi: 10.1038/s41586-020-03057-y
81. Lucas D, Scheiermann C, Chow A, Kunisaki Y, Bruns I, Barrick C, et al. Chemotherapy-Induced Bone Marrow Nerve Injury Impairs Hematopoietic Regeneration. *Nat Med* (2013) 19(6):695–703. doi: 10.1038/nm.3155
82. Maryanovich M, Zahalka AH, Pierce H, Pinho S, Nakahara F, Asada N, et al. Adrenergic Nerve Degeneration in Bone Marrow Drives Aging of the Hematopoietic Stem Cell Niche. *Nat Med* (2018) 24(6):782–91. doi: 10.1038/s41591-018-0030-x
83. Ho YH, Del Toro R, Rivera-Torres J, Rak J, Korn C, Garcia-Garcia A, et al. Remodeling of Bone Marrow Hematopoietic Stem Cell Niches Promotes Myeloid Cell Expansion During Premature or Physiological Aging. *Cell Stem Cell* (2019) 25(3):407–18 e6. doi: 10.1016/j.stem.2019.06.007
84. Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, et al. Nonmyelinating Schwann Cells Maintain Hematopoietic Stem Cell Hibernation in the Bone Marrow Niche. *Cell* (2011) 147(5):1146–58. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.053
85. Fialkow PJ, Thomas ED, Bryant JJ, Neiman PE. Leukaemic Transformation of Engrafted Human Marrow Cells In Vivo. *Lancet* (1971) 1(7693):251–5. doi: 10.1016/S0140-6736(71)90998-6
86. Paget S. The Distribution of Secondary Growths in Cancer of the Breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* (1989) 8(2):98–101.
87. Rupec RA, Jundt F, Rebholz B, Eckelt B, Weindl G, Herzinger T, et al. Stroma-Mediated Dysregulation of Myelopoiesis in Mice Lacking I Kappa B Alpha. *Immunity* (2005) 22(4):479–91. doi: 10.1016/j.immuni.2005.02.009
88. Walkley CR, Olsen GH, Dworkin S, Fabb SA, Swann J, McArthur GA, et al. A Microenvironment-Induced Myeloproliferative Syndrome Caused by Retinoic Acid Receptor Gamma Deficiency. *Cell* (2007) 129(6):1097–110. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.014
89. Walkley CR, Shea JM, Sims NA, Purton LE, Orkin SH. Rb Regulates Interactions Between Hematopoietic Stem Cells and Their Bone Marrow Microenvironment. *Cell* (2007) 129(6):1081–95. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.055
90. Zambetti NA, Ping Z, Chen S, Kenswil KJG, Mylona MA, Sanders MA, et al. Mesenchymal Inflammation Drives Genotoxic Stress in Hematopoietic Stem Cells and Predicts Disease Evolution in Human Pre-Leukemia. *Cell Stem Cell* (2016) 19(5):613–27. doi: 10.1016/j.stem.2016.08.021
91. Dong L, Yu WM, Zheng H, Loh ML, Bunting ST, Pauly M, et al. Leukaemogenic Effects of Ptpn11 Activating Mutations in the Stem Cell Microenvironment. *Nature* (2016) 539(7628):304–8. doi: 10.1038/nature20131
92. Kode A, Manavalan JS, Mosialou I, Bhagat G, Rathinam CV, Luo N, et al. Leukaemogenesis Induced by an Activating Beta-Catenin Mutation in Osteoblasts. *Nature* (2014) 506(7487):240–4. doi: 10.1038/nature12883
93. Kim YW, Koo BK, Jeong HW, Yoon MJ, Song R, Shin J, et al. Defective Notch Activation in Microenvironment Leads to Myeloproliferative Disease. *Blood* (2008) 112(12):4628–38. doi: 10.1182/blood-2008-03-148999
94. Wang L, Zhang H, Rodriguez S, Cao L, Parish J, Mumaw C, et al. Notch-Dependent Repression of miR-155 in the Bone Marrow Niche Regulates Hematopoiesis in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cell Stem Cell* (2014) 15(1):51–65. doi: 10.1016/j.stem.2014.04.021
95. Boyd AL, Campbell CJ, Hopkins CI, Fiebig-Comyn A, Russell J, Ulemek J, et al. Niche Displacement of Human Leukemic Stem Cells Uniquely Allows Their Competitive Replacement With Healthy HSPCs. *J Exp Med* (2014) 211(10):1925–35. doi: 10.1084/jem.20140131

96. Chand R, Chandra H, Chandra S, Verma SK. Role of Microvessel Density and Vascular Endothelial Growth Factor in Angiogenesis of Hematological Malignancies. *Bone Marrow Res* (2016) 2016:5043483. doi: 10.1155/2016/5043483
97. Hussong JW, Rodgers GM, Shami PJ. Evidence of Increased Angiogenesis in Patients With Acute Myeloid Leukemia. *Blood* (2000) 95(1):309–13. doi: 10.1182/blood.V95.1.309.001k17_309_313
98. Kampen KR, Ter Elst A, de Bont ES. Vascular Endothelial Growth Factor Signaling in Acute Myeloid Leukemia. *Cell Mol Life Sci* (2013) 70(8):1307–17. doi: 10.1007/s00018-012-1085-3
99. Poulos MG, Gars EJ, Gutkin MC, Kloss CC, Ginsberg M, Scandura JM, et al. Activation of the Vascular Niche Supports Leukemic Progression and Resistance to Chemotherapy. *Exp Hematol* (2014) 42(11):976–86.e3. doi: 10.1016/j.exphem.2014.08.003
100. Passaro D, Di Tullio A, Abarrategi A, Rouault-Pierre K, Foster K, Ariza-McNaughton L, et al. Increased Vascular Permeability in the Bone Marrow Microenvironment Contributes to Disease Progression and Drug Response in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* (2017) 32(3):324–41 e6. doi: 10.1016/j.ccell.2017.08.001
101. Duarte D, Hawkins ED, Akinduro O, Ang H, De Filippo K, Kong IY, et al. Inhibition of Endosteal Vascular Niche Remodeling Rescues Hematopoietic Stem Cell Loss in AML. *Cell Stem Cell* (2018) 22(1):64–77 e6. doi: 10.1016/j.stem.2017.11.006
102. Borella G, Da Ros A, Borile G, Porcu E, Tregnago C, Benetton M, et al. Targeting Mesenchymal Stromal Cells Plasticity to Reroute Acute Myeloid Leukemia Course of Acute Myeloid Leukemia. *Blood* (2021) 138(7):557–70. doi: 10.1182/blood.2020009845
103. Kumar B, Garcia M, Weng L, Jung X, Murakami JL, Hu X, et al. Acute Myeloid Leukemia Transforms the Bone Marrow Niche Into a Leukemia-Permissive Microenvironment Through Exosome Secretion. *Leukemia* (2018) 32(3):575–87. doi: 10.1038/leu.2017.259
104. Waclawiczek A, Hamilton A, Rouault-Pierre K, Abarrategi A, Albornoz MG, Miraki-Moud F, et al. Mesenchymal Niche Remodeling Impairs Hematopoiesis via Stanniocalcin 1 in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Invest* (2020) 130(6):3038–50. doi: 10.1172/JCI133187
105. Corradi G, Baldazzi C, Ocadlikova D, Marconi G, Parisi S, Testoni N, et al. Mesenchymal Stromal Cells From Myelodysplastic and Acute Myeloid Leukemia Patients Display In Vitro Reduced Proliferative Potential and Similar Capacity to Support Leukemia Cell Survival. *Stem Cell Res Ther* (2018) 9(1):271. doi: 10.1186/s13287-018-1013-z
106. Desbourdes L, Javary J, Charbonnier T, Ishac N, Bourgeois J, Iltis A, et al. Alteration Analysis of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells From De Novo Acute Myeloid Leukemia Patients at Diagnosis. *Stem Cells Dev* (2017) 26(10):709–22. doi: 10.1089/scd.2016.0295
107. Marlein CR, Zaitseva L, Piddock RE, Robinson SD, Edwards DR, Shafat MS, et al. NADPH Oxidase-2 Derived Superoxide Drives Mitochondrial Transfer From Bone Marrow Stromal Cells to Leukemic Blasts. *Blood* (2017) 130(14):1649–60. doi: 10.1182/blood-2017-03-772939
108. Moschoi R, Imbert V, Nebout M, Chiche J, Mary D, Prebet T, et al. Protective Mitochondrial Transfer From Bone Marrow Stromal Cells to Acute Myeloid Leukemic Cells During Chemotherapy. *Blood* (2016) 128(2):253–64. doi: 10.1182/blood-2015-07-655860
109. Forte D, Garcia-Fernandez M, Sanchez-Aguilera A, Stavropoulou V, Fielding C, Martin-Perez D, et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Support Acute Myeloid Leukemia Bioenergetics and Enhance Antioxidant Defense and Escape From Chemotherapy. *Cell Metab* (2020) 32(5):829–43 e9. doi: 10.1016/j.cmet.2020.09.001
110. Lane SW, Wang YJ, Lo Celso C, Ragu C, Bullinger L, Sykes SM, et al. Differential Niche and Wnt Requirements During Acute Myeloid Leukemia Progression. *Blood* (2011) 118(10):2849–56. doi: 10.1182/blood-2011-03-345165
111. Takam Kanga P, Bassi G, Cassaro A, Midolo M, Di Trapani M, Gatti A, et al. Notch Signalling Drives Bone Marrow Stromal Cell-Mediated Chemoresistance in Acute Myeloid Leukemia. *Oncotarget* (2016) 7(16):21713–27. doi: 10.18632/oncotarget.7964
112. Carter BZ, Mak PY, Chen Y, Mak DH, Mu H, Jacamo R, et al. Anti-Apoptotic ARC Protein Confers Chemoresistance by Controlling Leukemia-Microenvironment Interactions Through a Nfkb/Ili1 β Signaling Network. *Oncotarget* (2016) 7(15):20054–67. doi: 10.18632/oncotarget.7911
113. Carter BZ, Mak PY, Wang X, Tao W, Ruvolo V, Mak D, et al. An ARC-Regulated Ili1 β /Cox-2/Pge2/ β -Catenin/ARC Circuit Controls Leukemia-Microenvironment Interactions and Confers Drug Resistance in AML. *Cancer Res* (2019) 79(6):1165–77. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0921
114. Karimdadli Sariani O, Eghbalpour S, Kazemi E, Rafiei Buzhani K, Zaker F. Pathogenic and Therapeutic Roles of Cytokines in Acute Myeloid Leukemia. *Cytokine* (2021) 142:155508. doi: 10.1016/j.cyto.2021.155508
115. Binder S, Luciano M, Horejs-Hoeck J. The Cytokine Network in Acute Myeloid Leukemia (AML): A Focus on Pro- and Anti-Inflammatory Mediators. *Cytokine Growth Factor Rev* (2018) 43:8–15. doi: 10.1016/j.cytogfr.2018.08.004
116. Kagoya Y, Yoshimi A, Kataoka K, Nakagawa M, Kumano K, Arai S, et al. Positive Feedback Between NF- κ b and TNF- α Promotes Leukemia-Initiating Cell Capacity. *J Clin Invest* (2014) 124(2):528–42. doi: 10.1172/JCI68101
117. Carey A, Edwards DK, Eide CA, Newell L, Traer E, Medeiros BC, et al. Identification of Interleukin-1 by Functional Screening as a Key Mediator of Cellular Expansion and Disease Progression in Acute Myeloid Leukemia. *Cell Rep* (2017) 18(13):3204–18. doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.018
118. Westermann F, Kube D, Haier B, Bohlen H, Engert A, Zuehlsdorf M, et al. Interleukin 10 Inhibits Cytokine Production of Human AML Cells. *Ann Oncol* (1996) 7(4):397–404. doi: 10.1093/oxfordjournals.annonc.a010607
119. Wu Y, Su M, Zhang S, Cheng Y, Liao XY, Lin BY, et al. Abnormal Expression of TGF- β Type II Receptor Isoforms Contributes to Acute Myeloid Leukemia. *Oncotarget* (2017) 8(6):10037–49. doi: 10.18632/oncotarget.14325
120. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, Daley GQ. Bone-Marrow Adipocytes as Negative Regulators of the Haematopoietic Microenvironment. *Nature* (2009) 460(7252):259–63. doi: 10.1038/nature08099
121. Zhou BO, Yu H, Yue R, Zhao Z, Rios JJ, Naveiras O, et al. Bone Marrow Adipocytes Promote the Regeneration of Stem Cells and Haematopoiesis by Secreting SCF. *Nat Cell Biol* (2017) 19(8):891–903. doi: 10.1038/ncb3570
122. Boyd AL, Reid JC, Salci KR, Aslostovar L, Benoit YD, Shapovalova Z, et al. Acute Myeloid Leukaemia Disrupts Endogenous Myelo-Erythropoiesis by Compromising the Adipocyte Bone Marrow Niche. *Nat Cell Biol* (2017) 19(11):1336–47. doi: 10.1038/ncb3625
123. Shafat MS, Oellerich T, Mohr S, Robinson SD, Edwards DR, Marlein CR, et al. Leukemic Blasts Program Bone Marrow Adipocytes to Generate a Protumoral Microenvironment. *Blood* (2017) 129(10):1320–32. doi: 10.1182/blood-2016-08-734798
124. Ye H, Adane B, Khan N, Sullivan T, Minhajuddin M, Gasparetto M, et al. Leukemic Stem Cells Evade Chemotherapy by Metabolic Adaptation to an Adipose Tissue Niche. *Cell Stem Cell* (2016) 19(1):23–37. doi: 10.1016/j.stem.2016.06.001
125. Hanoun M, Maryanovich M, Arnal-Estape A, Frenette PS. Neural Regulation of Hematopoiesis, Inflammation, and Cancer. *Neuron* (2015) 86(2):360–73. doi: 10.1016/j.neuron.2015.01.026
126. Battula VL, Le PM, Sun JC, Nguyen K, Yuan B, Zhou X, et al. AML-Induced Osteogenic Differentiation in Mesenchymal Stromal Cells Supports Leukemia Growth. *JCI Insight* (2017) 2(13). doi: 10.1172/jci.insight.90036
127. Arranz L, Sanchez-Aguilera A, Martin-Perez D, Isern J, Langa X, Tzankov A, et al. Neuropathy of Haematopoietic Stem Cell Niche is Essential for Myeloproliferative Neoplasms. *Nature* (2014) 512(7512):78–81. doi: 10.1038/nature13383
128. Becker PS. Dependence of Acute Myeloid Leukemia on Adhesion Within the Bone Marrow Microenvironment. *Sci World J* (2012) 2012:856467. doi: 10.1100/2012/856467
129. Matsunaga T, Takemoto N, Sato T, Takimoto R, Tanaka I, Fujimi A, et al. Interaction Between Leukemic-Cell VLA-4 and Stromal Fibronectin is a Decisive Factor for Minimal Residual Disease of Acute Myelogenous Leukemia. *Nat Med* (2003) 9(9):1158–65. doi: 10.1038/nm909
130. Krause DS, Lazarides K, von Andrian UH, Van Etten RA. Requirement for CD44 in Homing and Engraftment of BCR-ABL-Expressing Leukemic Stem Cells. *Nat Med* (2006) 12(10):1175–80. doi: 10.1038/nm1489
131. Avigdor A, Goichberg P, Shvitiel S, Dar A, Peled A, Samira S, et al. CD44 and Hyaluronic Acid Cooperate With SDF-1 in the Trafficking of Human CD34+ Stem/Progenitor Cells to Bone Marrow. *Blood* (2004) 103(8):2981–9. doi: 10.1182/blood-2003-10-3611

132. Zeijlemaker W, Kelder A, Wouters R, Valk PJM, Witte BI, Cloos J, et al. Absence of Leukaemic CD34(+) Cells in Acute Myeloid Leukaemia is of High Prognostic Value: A Longstanding Controversy Deciphered. *Br J Haematol* (2015) 171(2):227–38. doi: 10.1111/bjh.13572
133. Zeijlemaker W, Grob T, Meijer R, Hanekamp D, Kelder A, Carbaat-Ham JC, et al. CD34(+)CD38(-) Leukemic Stem Cell Frequency to Predict Outcome in Acute Myeloid Leukemia. *Leukemia* (2019) 33(5):1102–12. doi: 10.1038/s41375-018-0326-3
134. Vergez F, Green AS, Tamburini J, Sarry JE, Gaillard B, Cornillet-Lefebvre P, et al. High Levels of CD34+CD38low/-CD123+ Blasts are Predictive of an Adverse Outcome in Acute Myeloid Leukemia: A Groupe Ouest-Est Des Leucémies Aigües Et Maladies Du Sang (GOELAMS) Study. *Haematologica* (2011) 96(12):1792–8. doi: 10.3324/haematol.2011.047894
135. Khan N, Freeman SD, Virgo P, Couzens S, Richardson P, Thomas I, et al. An Immunophenotypic Pre-Treatment Predictor for Poor Response to Induction Chemotherapy in Older Acute Myeloid Leukaemia Patients: Blood Frequency of CD34+ CD38 Low Blasts. *Br J Haematol* (2015) 170(1):80–4. doi: 10.1111/bjh.13398
136. Ng SW, Mitchell A, Kennedy JA, Chen WC, McLeod J, Ibrahimova N, et al. A 17-Gene Stemness Score for Rapid Determination of Risk in Acute Leukaemia. *Nature* (2016) 540(7633):433–7. doi: 10.1038/nature20598
137. Docking TR, Parker JDK, Jadersten M, Duns G, Chang L, Jiang J, et al. A Clinical Transcriptome Approach to Patient Stratification and Therapy Selection in Acute Myeloid Leukemia. *Nat Commun* (2021) 12(1):2474. doi: 10.1038/s41467-021-22625-y
138. van Gils N, Denkers F, Smit L. Escape From Treatment; the Different Faces of Leukemic Stem Cells and Therapy Resistance in Acute Myeloid Leukemia. *Front Oncol* (2021) 11:659253. doi: 10.3389/fonc.2021.659253
139. O'Reilly E, Zeinabad HA, Szegezdi E. Hematopoietic Versus Leukemic Stem Cell Quiescence: Challenges and Therapeutic Opportunities. *Blood Rev* (2021) 100850. doi: 10.1016/j.blre.2021.100850
140. Vetrie D, Helgason GV, Copland M. The Leukaemia Stem Cell: Similarities, Differences and Clinical Prospects in CML and AML. *Nat Rev Cancer* (2020) 20(3):158–73. doi: 10.1038/s41568-019-0230-9
141. Möhle R, Bautz F, Rafii S, Moore MA, Brugger W, Kanz L. The Chemokine Receptor CXCR-4 is Expressed on CD34+ Hematopoietic Progenitors and Leukemic Cells and Mediates Transendothelial Migration Induced by Stromal Cell-Derived Factor-1. *Blood* (1998) 91(12):4523–30. doi: 10.1182/blood.V91.12.4523
142. Spoo AC, Lübbert M, Wierda WG, Burger JA. CXCR4 is a Prognostic Marker in Acute Myelogenous Leukemia. *Blood* (2007) 109(2):786–91. doi: 10.1182/blood-2006-05-024844
143. DiPersio JF, Micallef IN, Stiff PJ, Bolwell BJ, Maziarz RT, Jacobsen E, et al. Phase III Prospective Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial of Plerixafor Plus Granulocyte Colony-Stimulating Factor Compared With Placebo Plus Granulocyte Colony-Stimulating Factor for Autologous Stem-Cell Mobilization and Transplantation for Patients With non-Hodgkin's Lymphoma. *J Clin Oncol* (2009) 27(28):4767–73. doi: 10.1200/JCO.2008.20.7209
144. Nervi B, Ramirez P, Rettig MP, Uy GL, Holt MS, Ritchey JK, et al. Chemosensitization of Acute Myeloid Leukemia (AML) Following Mobilization by the CXCR4 Antagonist AMD3100. *Blood* (2009) 113(24):6206–14. doi: 10.1182/blood-2008-06-162123
145. Cooper TM, Sison EAR, Baker SD, Li L, Ahmed A, Trippett T, et al. A Phase I Study of the CXCR4 Antagonist Plerixafor in Combination With High-Dose Cytarabine and Etoposide in Children With Relapsed or Refractory Acute Leukemias or Myelodysplastic Syndrome: A Pediatric Oncology Experimental Therapeutics Investigators' Consortium Study (POE 10-03). *Pediatr Blood Cancer* (2017) 64(8). doi: 10.1002/pbc.26414
146. Uy GL, Rettig MP, Motabi IH, McFarland K, Trinkaus KM, Hladnik LM, et al. A Phase 1/2 Study of Chemosensitization With the CXCR4 Antagonist Plerixafor in Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Blood* (2012) 119(17):3917–24. doi: 10.1182/blood-2011-10-383406
147. Roboz GJ, Ritchie EK, Dault Y, Lam L, Marshall DC, Cruz NM, et al. Phase I Trial of Plerixafor Combined With Decitabine in Newly Diagnosed Older Patients With Acute Myeloid Leukemia. *Haematologica* (2018) 103(8):1308–16. doi: 10.3324/haematol.2017.183418
148. Becker PS, Foran JM, Altman JK, Yacoub A, Castro JE, Sabbatini P, et al. Targeting the CXCR4 Pathway: Safety, Tolerability and Clinical Activity of Ulocuplumab (BMS-936564), an Anti-CXCR4 Antibody, in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Blood* (2014) 124(21):386–. doi: 10.1182/blood.V124.21.386.386
149. Kovacovics TJ, Mims A, Salama ME, Pantin J, Rao N, Kosak KM, et al. Combination of the Low Anticoagulant Heparin CX-01 With Chemotherapy for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Blood Adv* (2018) 2(4):381–9. doi: 10.1182/bloodadvances.2017013391
150. Borthakur G, Ofran Y, Tallman MS, Foran J, Uy GL, DiPersio JF, et al. BL-8040 CXCR4 Antagonist is Safe and Demonstrates Antileukemic Activity in Combination With Cytarabine for the Treatment of Relapsed/Refractory Acute Myelogenous Leukemia: An Open-Label Safety and Efficacy Phase 2a Study. *Cancer* (2021) 127(8):1246–59. doi: 10.1002/cncr.33338
151. Kovacovics T, Levy MY, Cook RJ, Kolitz JE, Westervelt P, Donnellan WB, et al. A Randomized Phase II Trial of CX-01 With Standard Therapy in Elderly Patients With Acute Myeloid Leukemia (AML). *J Clin Oncol* (2019) 37(15_suppl):7001–. doi: 10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.7001
152. Piya S, Mu H, Bhattacharya S, Lorenzi PL, Davis RE, McQueen T, et al. BETP Degradation Simultaneously Targets Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells and the Microenvironment. *J Clin Invest* (2019) 129(5):1878–94. doi: 10.1172/JCI120654
153. Dias S, Shmelkov SV, Lam G, Rafii S. VEGF(165) Promotes Survival of Leukemic Cells by Hsp90-Mediated Induction of Bcl-2 Expression and Apoptosis Inhibition. *Blood* (2002) 99(7):2532–40. doi: 10.1182/blood.V99.7.2532
154. Zahiragic L, Schliemann C, Bieker R, Thoenissen NH, Burow K, Kramer C, et al. Bevacizumab Reduces VEGF Expression in Patients With Relapsed and Refractory Acute Myeloid Leukemia Without Clinical Antileukemic Activity. *Leukemia* (2007) 21(6):1310–2. doi: 10.1038/sj.leu.2404632
155. Ossenkoppele GJ, Stussi G, Maertens J, van Montfort K, Biemond BJ, Breems D, et al. Addition of Bevacizumab to Chemotherapy in Acute Myeloid Leukemia at Older Age: A Randomized Phase 2 Trial of the Dutch-Belgian Cooperative Trial Group for Hemato-Oncology (HOVON) and the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Blood* (2012) 120(24):4706–11. doi: 10.1182/blood-2012-04-420596
156. Velasco-Hernandez T, Hyrenius-Wittsten A, Rehn M, Bryder D, Cammenga J. HIF-1 α can Act as a Tumor Suppressor Gene in Murine Acute Myeloid Leukemia. *Blood* (2014) 124(24):3597–607. doi: 10.1182/blood-2014-04-567065
157. Wang Y, Liu Y, Malek SN, Zheng P, Liu Y. Targeting Hif1 α Eliminates Cancer Stem Cells in Hematological Malignancies. *Cell Stem Cell* (2011) 8(4):399–411. doi: 10.1016/j.stem.2011.02.006
158. Li Y, Zhao L, Li XF. Targeting Hypoxia: Hypoxia-Activated Prodrugs in Cancer Therapy. *Front Oncol* (2021) 11:700407. doi: 10.3389/fonc.2021.700407
159. Portwood S, Lal D, Hsu YC, Vargas R, Johnson MK, Wetzler M, et al. Activity of the Hypoxia-Activated Prodrug, TH-302, in Preclinical Human Acute Myeloid Leukemia Models. *Clin Cancer Res* (2013) 19(23):6506–19. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0674
160. Benito J, Ramirez MS, Millward NZ, Velez J, Harutyunyan KG, Lu H, et al. Hypoxia-Activated Prodrug TH-302 Targets Hypoxic Bone Marrow Niches in Preclinical Leukemia Models. *Clin Cancer Res* (2016) 22(7):1687–98. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-3378
161. Badar T, Handisides DR, Benito JM, Richie MA, Borthakur G, Jabbour E, et al. Phase I Study of Evofosfamide, an Investigational Hypoxia-Activated Prodrug, in Patients With Advanced Leukemia. *Am J Hematol* (2016) 91(8):800–5. doi: 10.1002/ajh.24415
162. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2014) 6(10):a016295. doi: 10.1101/cshperspect.a016295
163. Fajgenbaum DC, June CH. Cytokine Storm. *N Engl J Med* (2020) 383(23):2255–73. doi: 10.1056/NEJMr2026131
164. Askmyr M, Agerstam H, Hansen N, Gordon S, Arvanitakis A, Rissler M, et al. Selective Killing of Candidate AML Stem Cells by Antibody Targeting of IL1RAP. *Blood* (2013) 121(18):3709–13. doi: 10.1182/blood-2012-09-458935

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

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in

this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Marchand and Pinho. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY).

The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Titre : Rôle des cellules stromales périostéales dans la régénération de la niche hématopoïétique

Mots clés : périoste, régénération médullaire, cellule stromale mésenchymateuse, niche hématopoïétique

Résumé : La régénération de la moelle osseuse après chimiothérapie ou irradiation nécessite l'existence de cellules stromales fonctionnelles. Néanmoins, les processus impliqués dans la régénération des cellules stromales après agression restent à ce jour peu connus. Dans ce travail nous avons développé et caractérisé un modèle murin d'étude de la régénération de la niche hématopoïétique basé sur la greffe d'un fémur intact en sous-cutané. Après une destruction initiale de la moelle osseuse, la cavité médullaire est le siège d'une infiltration par des adipocytes puis d'une régénération progressive avec la réapparition d'une niche hématopoïétique fonctionnelle. De manière inattendue, nous avons identifié des cellules stromales localisées au niveau du périoste capables de migrer dans la moelle osseuse et de contribuer à la régénération du compartiment stromal médullaire.

Les cellules stromales issues du périoste sont capables de d'acquérir des caractéristiques de cellules souches mésenchymateuses médullaires avec notamment l'expression de cytokines majeures pour l'hématopoïèse comme *Cxcl12* et *Stem cell factor*. L'observation que les cellules stromales du périoste, contrairement aux cellules stromales médullaires, survivent à la procédure de greffe suggère que ces cellules sont plus résistantes au stress possiblement en lien avec une importante quiescence.

En conclusion, notre travail met en évidence une nouvelle fonction des cellules stromales du périoste soulignant leur importante plasticité et le rôle potentiel du périoste comme une source de cellules stromales mésenchymateuses après agression de la moelle osseuse.

Title : Periosteal skeletal stem cells contribution in hematopoietic stem cell niche regeneration

Keywords: periosteum, bone marrow regeneration, skeletal stem cell, hematopoietic niche.

Abstract: Functional stromal cells are known to be important for bone marrow regeneration after chemotherapy or radiation induced injury to avoid prolonged myelosuppression. However, how the cells within the bone marrow are repopulated post injury is unknown. We have developed a whole bone transplantation model that mimics the initial bone marrow necrosis and fatty infiltration seen after bone marrow injury and the gradual recovery. Unexpectedly, we found that skeletal stem cells from the periosteum are able to migrate into the bone marrow, thereby contributing to bone marrow regeneration. These periosteal skeletal stem cells also give rise to bone marrow mesenchymal stem cells with the expression of hematopoietic stem cell niche factors, such as *Cxcl12* and *Stem cell factor*.

The observation that bone marrow mesenchymal stem cells, but not periosteal skeletal stem cells, die during the transplantation process suggests that periosteal skeletal stem cells are more resistant to stress compared to bone marrow mesenchymal stem cells in part due to a more quiescent phenotype.

Our study uncovers a new function of periosteal stem cells, highlighting their major plasticity and the role of the periosteum as a potential bone marrow mesenchymal stem cells source following bone marrow injury.