



HAL
open science

Etude phénotypique et fonctionnelle des macrophages issus de l'hématopoïèse du tissu adipeux dans un contexte de réparation tissulaire

Adèle Arlat

► **To cite this version:**

Adèle Arlat. Etude phénotypique et fonctionnelle des macrophages issus de l'hématopoïèse du tissu adipeux dans un contexte de réparation tissulaire. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2023. Français. NNT : 2023TOU30073 . tel-04198615

HAL Id: tel-04198615

<https://theses.hal.science/tel-04198615>

Submitted on 7 Sep 2023

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

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

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Adèle ARLAT

Le 24 mars 2023

**Etude phénotypique et fonctionnelle des macrophages issus de
l'hématopoïèse du tissu adipeux dans un contexte de réparation
tissulaire**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHYSIOPATHOLOGIE**

Unité de recherche :

RESTORE

Thèse dirigée par

Béatrice COUSIN

Jury

Mme Isabelle WOLOWCZUK, Rapporteur

M. Alexandre BOISSONNAS, Rapporteur

Mme Farida DJOUAD, Rapporteur

M. Louis CASTEILLA, Examineur

Mme Sandrine SARRAZIN, Examinatrice

Mme Béatrice COUSIN, Directrice de thèse

Remerciements

Dans un premier temps, je souhaite remercier **Alexandre Boissonnas**, **Farida Djouad** et **Isabelle Wolowczuk** d'avoir accepté d'évaluer et de corriger ce manuscrit ainsi que les travaux effectués durant ces trois ans et demi de thèse. Je remercie également **Sandrine Sarrazin** et **Louis Casteilla** d'avoir accepté de faire partie du jury et d'avoir examiné ce travail.

Béatrice, je te remercie de m'avoir fait confiance depuis le M1 et tout au long de cette thèse. Merci d'avoir partagé ces cinq années avec moi. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir encouragée à m'engager dans cette thèse. Merci de m'avoir soutenue même dans les moments difficiles. Merci d'avoir confronté tes idées aux miennes et de m'avoir fait autant grandir sur le plan scientifique. Merci pour ton implication (sans limite) dans ce projet et merci de m'avoir également impliquée dans d'autres projets qui m'ont permis de conserver une très grande ouverture d'esprit et une vision globale de la science. J'espère que tu continueras à être cette oreille attentive pour les étudiants et que tu continueras à les pousser dans leurs projets.

Louis Casteilla et **Philippe Valet** merci d'avoir été d'abord mes professeurs à l'université. Vous êtes de ces professeurs que l'on n'oublie pas et qui donnent envie de faire de la science. Merci **Louis**, de m'avoir ensuite ouvert les portes du STROMALab et de m'avoir soutenue, motivée et écoutée dans ce moment difficile qu'est le passage du concours de l'école doctorale. **Philippe**, merci d'avoir ensuite dirigé RESTORE avec autant de bienveillance, d'écoute, de belle science et de blagues (même à 7h du matin au café !).

A tous les anciens StromaLabiens, vous avez tous participé à ce travail, depuis mon M1 et jusqu'à la fin de cette thèse. **Coralie** et **Amandine** merci d'avoir toujours le sourire, de répandre la bonne humeur et de m'avoir écoutée et conseillée au moins mille fois pour m'aider à préparer mes différents oraux, toujours de manière très enrichissante et bienveillante. **Isa A.**, merci d'être toujours motivée pour faire de la science et pour la partager. **Audrey C.**, merci pour ta douceur qui remonte toujours le moral, ta bienveillance et ton sourire. Merci aussi pour ton aide dans la compréhension du métabolisme, tout s'éclairci quand c'est toi qui l'expliques ! **Corinne B.** merci pour ton aide en imagerie et ta gentillesse. **Valérie**, merci pour tes conseils et ton aide pour les répétitions de l'école doctorale. **Jenny**, merci d'avoir toujours le sourire et d'avoir toujours répondu à toutes mes questions même les plus embêtantes depuis les TD à la fac jusqu'à la rédaction de ce manuscrit en passant par les manips de sphéroïde. **Laurence**, merci pour ton aide, pour la culture 3D même en temps de pénurie. **Yannick**, merci pour ta bienveillance et tes conseils multiples en manip. **Fred**, merci pour toutes ces blagues, tu égayes toujours une pause-café. **Mel**, merci d'être toujours motivée et de bonne humeur, ça a toujours été agréable de partager des moments avec toi. Tu es maintenant passée du côté des thésards, félicitations et bon courage pour cette thèse... **Nico**, merci pour ta bonne humeur constante, ton rire communicatif et surtout pour ce magnifique pull de Noël (pas merci pour la recherche désespérée de paddle haha) !!! Merci aussi pour tous tes précieux conseils de culture de moelle osseuse et pour ton implication dans mon projet.

Je veux aussi remercier,

Anne, merci d'abord de m'avoir fait découvrir StromaLab en M1 et de m'avoir fait confiance pour le M2 Physiopathologie. Merci d'avoir été là pour le concours de l'école doctorale... même les

dimanches ! Merci d'être toujours présente pour les étudiants et de transmettre autant ta passion. Merci d'avoir relu ce manuscrit et de m'avoir aidé à le corriger. Merci d'être toujours aussi à l'écoute, merci pour ta bienveillance, tes encouragements et tous tes conseils.

Cécile, merci d'avoir éveillé en moi la passion de la régénération à la fac. Merci ensuite d'avoir été présente durant mes stages et dans la préparation de tous mes oraux. Merci d'avoir été mon mentor d'enseignement à la fac, pour les petits trucs et astuces. Merci pour les discussions scientifiques mais aussi personnelles qui m'ont beaucoup, beaucoup apporté. Enfin merci pour ton sourire et ta bonne humeur qui sont toujours tellement agréables.

Marielle, merci pour ton implication : de la préparation des oraux articles flash en M2 jusqu'à ton aide précieuse pour la biblio de ce manuscrit en passant par la préparation du concours de l'école doc. Merci aussi d'avoir partagé la galère du single cell RNAseq avec moi... Merci, d'être toujours présente, d'être toujours de bonne humeur et toujours prête à aider (surtout pour les lipectomies en pharmacie.....). Merci de m'avoir aidé tout au long de cette préparation de thèse : de la rédaction du manuscrit jusqu'à la préparation de l'oral. Merci aussi pour les franches rigolades et moments partagés qui dépassent le côté scientifique.

Audrey V., merci d'avoir répondu à touuuuutes mes questions sur les macrophages et autre... avant et pendant ma thèse, pour toutes les astuces de culture, pour tous les microlitres que tu m'as dépanné. Merci d'être aussi drôle et franche, il faut le dire on s'est souvent bien marré ! Enfin, merci pour la relecture et corrections de ce manuscrit ainsi que pour les répétitions de l'oral qui m'ont été d'une aide précieuse encore une fois.

Mimi, ma bible de la culture et du labo. Merci d'avoir tout le temps une solution pour tous problèmes de manip. Merci d'être aussi bienveillante avec chacun des étudiants qui croisent ta route. Merci de m'avoir écouté toutes les fois où j'ai râlé en salle de culture, merci d'être aussi patiente et d'avoir autant partagé avec moi sur le plan scientifique autant que sur le plan personnel.

Manue, merci pour ton aide précieuse lors de l'analyse du single cell RNAseq et pour les manips de qPCR. Merci d'être toujours aussi sereine, de toujours vouloir trouver une solution et d'avoir été aussi patiente avec moi pour m'expliquer les mystères de la biologie moléculaire...

Jean Gérard, merci pour tes mots d'encouragements qui font vraiment chaud au cœur. Merci d'être toujours aussi calme, fort, et de prendre la vie avec une telle philosophie. Tu es un exemple à suivre pour nous tous.

Philippe K. et **Paul**, parce que vous êtes la team dentistes inséparables je dois vous remercier ensemble. Merci pour votre bonne humeur (Paul, tu ne dois jamais perdre ce rire si communicatif !), pour votre écoute et vos conseils lors de la préparation du concours de l'école doctorale. Merci encore de m'avoir permis de soutenir ma thèse dans les locaux de chirurgie dentaire.

Suzy, merci de toujours nous sortir des galères administratives et merci pour tes petites astuces pour l'avenir. Merci pour tes mots d'encouragements, ton sourire et ta gentillesse qui font vraiment du bien au moral.

Christophe, merci pour toutes les formations en chirurgie et en expérimentation animale de manière plus générale depuis mon M1, et merci d'être toujours prêt à aider de quelque manière que ce soit. Merci d'avoir fait aussi bien tourner StromaLab, sans jamais te plaindre. Merci d'être tout le temps de bonne humeur et d'avoir partagé autant de moments de rigolade avec moi. Merci aussi d'avoir partagé avec nous ta passion du chien de traîneau et merci pour ce magnifique tour en chien de

traineau que tu nous as fait faire avec Lise un soir de pleine lune, ce souvenir restera gravé pour toujours.

Clément, impossible de savoir par où commencer. Tout simplement que ce soit StromaLab ou RESTORE, sans toi, le labo s'écroule. Merci d'être toujours disponible pour TOUS les pépins qui nous arrivent par jour à chacun. Merci de m'avoir aidé pour mes multiples galères informatiques, pour la fabrication des seringues avec la musique à fond, pour les préparations de toutes les solutions, les autoclaves de dernière minute... Enfin merci pour ta bonne humeur communicative, pour tous les repas partagés au CRCT puis à Pierre Fabre, qu'est-ce qu'on a pu rire !

Ceux qui sont partis depuis maintenant un moment mais qui ont été indispensables à tout point de vue :

Virginie, merci d'avoir été mon encadrante de M1 et de M2. C'est grâce à toi que j'ai pris goût aux macrophages et aux chimères hématopoïétiques. Merci de m'avoir transmis ce projet avec toute ta pédagogie, ta bienveillance et ta patience. Tu es, de toutes les personnes que je connais celle qui ne se plaint jamais, qui a toujours une solution et qui ne recule devant rien. Tout simplement, merci d'avoir été la meilleure encadrante que l'on puisse rêver avoir.

Damien tu as fait partie de l'aventure Stromalab, merci d'avoir été le pitre de service, d'avoir partagé autant de temps en culture avec moi et partagé des conseils (parfois intéressants). Merci aussi pour tous les moments hors science qui ont fait tellement de bien : à boire des cafés, à s'envoyer des balles dans la tête, à faire des courses chenilles de fauteuil et j'en passe... Merci d'avoir été là tout simplement. **Lisette**, ta présence durant ma première année de thèse a fait de cette année-là une des plus belles. Merci pour tous tes conseils concernant les oraux, les manips et j'en passe... Merci de m'avoir remonté le moral, fait rire à en tomber de ma chaise, d'avoir partagé tous ces moments avec moi bien au-delà du laboratoire. Tu resteras pour toujours la best partner in science EVER. Le monde a besoin de personne comme toi. **Silveric**, même si ta présence au labo a été de courte durée (COVID et tout le bordel) on a partagé des moments incroyables (comme la recherche désespérée de tes échantillons, non je rigole...) et ton départ du labo ne nous a pas empêché de continuer à en passer et je l'espère pour encore un long moment. Merci d'être cette personne toujours de bonne humeur, motivée pour tout et sincère.

Et puis le laboratoire s'est agrandi et nous sommes devenus les RESTORIENS, je vous remercie tous d'avoir fait partie de cette nouvelle aventure :

La totalité de l'équipe 1 et tout particulièrement **Jean-Louis** (déjà pour ton rire très communicatif) mais aussi de m'avoir aidé à mieux comprendre le mystère des drosophiles.

L'ensemble de l'équipe 3, **Armelle**, merci pour tes mots d'encouragements. **Mylène**, merci pour les pauses et les debriefs de stress. **Aurélié**, merci pour ta bonne humeur, les heures partagées en salle de bactério et nos échanges sur le poisson zèbre. **Jean-Philippe** (alias JPP), merci d'être un amoureux de la science et de communiquer cette passion. Merci pour toute la biblio, pour les manips foie et de toujours avoir le smile. **Cédric**, merci pour les TP métabo à la fac, de m'avoir transmis ta pédagogie et ton savoir d'enseignant. **Isabelle C.**, merci d'avoir partagé tous ces moments d'enseignements à la fac. Merci de m'avoir fait m'épanouir dans cette discipline et de m'avoir toujours fait confiance. Merci aussi pour les échanges personnels qui m'ont beaucoup apporté. Les étudiants ont beaucoup de chance de t'avoir.

Enfin et surtout, l'équipe 2, ma nouvelle équipe d'accueil : **Agnès, Victorine, Hélène** et **Lise** merci de m'avoir aidé à évoluer dans mon projet et d'avoir amené votre œil tout neuf sur mes résultats. **Bénédicte** et **Philippe** merci pour votre aide précieuse durant les manips.

Merci aussi aux super héros de l'imagerie. **Mathieu**, merci de toujours trouver une solution pour les problèmes d'analyse, de logiciel... **Margot**, merci d'être toujours aussi souriante et bienveillante avec tout le monde. Merci pour ton initiation à l'operetta, tu es la best formatrice du monde, Perkin n'a qu'à bien se tenir. **Laetitia**, merci pour les manips de dernières minutes pour lesquelles tu as toujours dis oui et avec le sourire... Merci d'avoir été aussi patiente avec ma peur de l'histo et mon incompréhension de l'imagerie et de m'avoir accompagnée à chaque fois que j'en ai eu besoin.

Camille, merci pour ta douceur et ta gentillesse. Merci aussi d'avoir résolu les mystères de DHL avec moi.

Jacques, merci d'être aussi à l'écoute des étudiants et de diriger cette superbe équipe qu'est le CERT avec autant de bienveillance. Merci pour ton aide pour mon futur et merci pour ce repas de Noël plutôt mémorable.

Enfin, les étudiants (et autres mais on ne fera aucune distinction ici), merci à tous d'avoir formé la grande RESTORE Family, cette ambiance entre nous, au bureau ou en week-end a clairement fait la différence !

Marion, la chimiste du groupe, même si tu n'es pas souvent là, à chaque fois que tu es présente, tu égaye la journée par ta bonne humeur. **Mélissa**, merci pour ton aide sur les manips et pour ton rire communicatif. **Mouna**, merci de m'avoir accompagnée même après ton départ du labo pour les manips de candida. **Khaddouj**, merci d'être une aussi belle personne, toujours attentive et à l'écoute des autres. Merci aussi d'être une As de la science et de toujours être prête à aider. Tu es une magnifique personne, ne laisse personne te faire penser le contraire et reste aussi forte que tu l'es déjà. **Clément**, merci d'avoir répondu à mes milliards de questions sur la bilbio, les macrophages péritonéaux... merci pour ton aide précieuse et pour les grands moments de rire même à 7h du matin en dissection. Merci pour tes mots d'encouragement jusqu'à la fin de cette thèse, force et honneur à toi pour la fin, tu vas briller ! **Marie Salon**, merci de m'avoir aidé un nombre incalculable de fois, merci pour nos discussions hors science qui ont toujours été tellement agréables. Merci d'être aussi drôle et surtout pour ton tourné infernal de queue de cheval. Tu vas être une super maman et une super scientifique. **Anastasia**, merci pour les cafés à 7h du matin au labo, merci pour ta gentillesse et ta douceur. Quoi que tu fasses après cette thèse, tu réussiras tout ce que tu entreprends, c'est certain. **Agnès E.**, merci pour ta gentillesse et nos moments de pauses sur la terrasse. **Selma**, merci d'être aussi douce avec tout le monde et de toujours avoir le sourire. **Marie Sallese**, merci pour ton sourire même à 7h du matin et pour nos repas partagés à Pierre Fabre, toujours agréables. **Rémy**, merci de faire tourner le labo avec Clément, merci de toujours dépanner tout le monde pour à peu près tout, sans jamais te plaindre. Merci d'être toujours de bonne humeur et d'avoir toujours des solutions à nous proposer. Merci aussi pour les vendanges, ce souvenir sera toujours mémorable... BERTRAAAAND. **Marie KT**, merci pour ton soutien jusqu'à la fin de cette thèse (je pense notamment au moment de l'envoi des mails, haha), merci pour ta gentillesse, j'espère que tu vas te régaler dans ta nouvelle vie au Canada. **Chloé**, merci pour ton aide pour les manips de Seahorse, et tous les moments partagés hors science, passer un moment avec toi est toujours super agréable. **Miguel**, merci d'avoir toujours le smile, merci d'être aussi gentil et de m'avoir aidé avec le mystère des PCA... **Emmanuel**, merci pour ces moments partagés au moment des repas où tu m'as toujours appris pleins de choses notamment sur l'espace, j'ai adoré partager ces moments-là. Merci d'être aussi pédagogue

pour nous expliquer les mystères de l'IA. **Maxime**, merci d'être le pitre de l'open space, on s'est bien marré depuis ton M1 et jusqu'à la fin de cette thèse. Merci d'avoir toi aussi passé des moments interminables en salle de culture souris et d'avoir fait passer ces heures beaucoup plus vite. **Garance**, merci d'être tout le temps motivée pour tout, tu es de ces personnes qui ne râlent jamais et sont toujours de bonne humeur, c'est un bonheur de partager des moments avec toi. **Clémence B.**, merci d'avoir été dans ma rangée de bureau et d'avoir toujours répondu à toutes mes questions pénibles d'orthographe, d'informatique... haha. Merci pour ta gentillesse et d'avoir autant partagé à la fois scientifiquement et personnellement avec moi, j'ai adoré nos discussions. **Mélanie E.**, merci d'avoir partagé avec moi la galère des sphéroïdes et des longs moments tard le soir en manip. Accroche-toi, ne doute jamais de tes idées, elles sont toujours super ! **Elena**, merci pour ta folie depuis la licence, prend bien soin de toi, tu vas tellement être une queen de la science ! **Clémence** alias Balou, merci pour tes mots doux et d'avoir chanté avec moi qu'il en faut peu pour être heureux. Merci d'être toujours là pour reconforter tout le monde. Reste cette personne franche et drôle que tout le monde adore. **Rémi**, « mon petit Rémi », merci pour ton calme légendaire, ta présence au labo est vraiment apaisante. Merci pour tous nos moments partagés dans et hors du labo, reste un dieu de la danse sur les années 80.

Jean, Merci pour ta positivité et ton humour. Alors que je déteste le métabolisme, les manips de seahorse avec toi ont été parmi mes meilleures manip, c'est tellement agréable de travailler avec toi. Merci de m'avoir soutenu et d'avoir répondu à toutes mes questions sur le métabolisme même les plus stupides. Merci d'avoir partagé aussi tous ces moments hors du labo durant lesquels on a tellement rigolé. Tu es une personne en or et tu brilles tellement que tu enrichis toutes les personnes qui croisent ton chemin. (J'ai trop hâte d'ouvrir une fleuristerie avec toi haha)

Kimmy, merci d'avoir intégré RESTORE tout simplement. Tu as été pendant plusieurs mois mon repère dans ce labo à tout point de vue, personnel mais aussi pour les manips. Ta générosité et ton envie d'aider sont sans aucun doute inégalables. Merci aussi d'être aussi folle, on a pris tellement de fous rires. Nos petites réunions matinales ont été pour moi la motivation de chaque journée. Mme l'ambassadrice merci pour tout.

Laulau, merci d'avoir été ma voisine de bureau, je n'aurai pas pu rêver mieux. Ta joie est tellement communicative, tu embellis les journées de nous tous. Merci d'être une personne à qui on peut tout dire et qui est toujours de bon conseil. Merci d'avoir répondu à mes milliers de questions couleurs quand je n'arrivais plus à ouvrir les yeux. Merci d'avoir passé des samedis entiers avec moi au labo quand j'avais clairement besoin d'une présence. Merci d'être aussi rayonnante. Ne doute jamais de toi tu pourras faire tout ce que tu veux avec une telle énergie. « Who run the world ? Laulau ! »

Jessica, merci pour ton soutien et tes blagues douteuses qui ont si souvent permis de décompresser. Merci pour ton implication avec tous les étudiants que ça soit dans nos projets, dans nos vies personnelles ou juste pour organiser des super week-end/ thèse... Merci d'avoir partagé un peu de ton île avec moi, j'espère pouvoir venir t'y voir très rapidement.

Léa, saucisette, on a commencé le même jour et terminé le même jour cette thèse. T'avoir eu à mes côtés au Stromalab, puis à RESTORE a été tellement chouette. Merci d'avoir partagé avec moi la galère des projets, la rédaction de thèse et la préparation de l'oral ça a été vraiment un soutien que peu de gens ont la chance d'avoir. Merci d'être toujours calme et reconfortante. Merci pour ces soirées de fous rires, pour tous nos moments partagés, au labo ou en dehors. Je ne peux pas énumérer tous nos moments de rigolade tellement il y en a eu, mais en tant que photographe officielle tu pourras facilement te les remémorer. Merci d'avoir partagé toute cette aventure avec moi, les hauts, les bas et les intermédiaires haha.

Marie-Laure, je ne sais même pas par où commencer pour te remercier. Tu as été mon pilier durant 5 ans, du M1 à la fin de cette thèse. Merci d'avoir écouté les pleurs, les remises en question et les doutes et d'avoir toujours apporté une solution à mes problèmes. Merci d'avoir été d'un soutien sans faille pour les manips, d'avoir partagé toutes ces journées de l'enfer avec moi (sacrifice, tri et j'en passe) et toujours avec tellement de motivation. Merci d'avoir toujours été disponible quand j'avais besoin de toi, de n'avoir jamais rechigné pour finir à des heures qui frôlent l'incompréhensible. Merci d'avoir partagé les bières de secours avec moi quand on les méritait clairement. Garde ton énergie et ton envie de rapprocher les gens, tu es clairement l'une des plus grandes forces de ce laboratoire, ignore ceux qui ne s'en rendent pas compte. Merci d'être toi tout simplement.

Et puis il y a toutes ces personnes hors du labo qui ont elles aussi participé à ce travail.

A tous mes amis proches **Meritxell, Margot, Julien, Marie, Elise, Laure, Ingrid, Bastien et Tristan**. Je ne vais pas m'étendre ici car vous savez déjà ce que je ressens pour vous. Merci d'être là depuis toujours de m'avoir toujours soutenue et écoutée. Merci d'avoir fait semblant de comprendre ce que je vous racontais sur cette thèse pendant ces 3 ans et demi (sauf Elise qui a tout compris la pauvre...). Merci de m'avoir changé les idées durant les vacances, soirées, week-ends endiablés. Je suis infiniment reconnaissante de vous avoir à mes côtés. Vous êtes les meilleurs amis du monde et pour toujours.

Je remercie également profondément ma famille. Tout d'abord mes parents, merci pour votre soutien indéfectible, vos sacrifices et pour avoir toujours cru en moi. Votre confiance en mes capacités m'a permis de surmonter les obstacles et de poursuivre mes rêves. Je suis profondément reconnaissante pour tout ce que vous avez fait et continuez de faire pour moi. Merci de m'avoir toujours poussé à faire ce que j'avais envie de faire sans jamais baisser les bras. **Papa**, merci de m'avoir rendu curieuse et de m'avoir transmis ton amour de la science. **Maman**, merci pour ton amour enveloppant qui m'a donné confiance en mes capacités. Je remercie également **Vincent** et **Olivier** d'avoir été mes compagnons de route depuis l'enfance. Merci pour votre soutien et vos encouragements surtout autour de (quelques) bières. Merci de m'avoir inspiré et d'avoir (presque toujours) cru en moi. A **mes grands parents** paternels et maternels, merci pour vos encouragements. Merci de m'avoir transmis vos valeurs de tolérance et de courage. Merci d'avoir partagé avec moi vos expériences qui ont été une source d'inspiration constante.

Je souhaite également adresser mes remerciements à mes oncles, tantes, cousins et cousines, qui ont toujours été là pour me soutenir et me rappeler l'importance de la famille. Votre présence lors de mes étapes importantes a été un cadeau précieux et je suis reconnaissante pour les liens que nous partageons.

Enfin, **Maxime**, mon amour, merci pour ton soutien durant cette thèse. Merci d'avoir été mon pilier. Tu as été là à chaque étape du processus, me rappelant constamment que je n'étais pas seule et que tu avais foi en mes capacités. Merci d'avoir toujours écouté, et t'être intéressé à mes problèmes de manips alors que clairement tu ne pouvais pas m'aider. Merci d'avoir fait de la fin de cette thèse un moment supportable en me changeant les idées et en me mettant dans les meilleures conditions possibles. Ta présence, ton amour et tes encouragements ont été des éléments essentiels de ma réussite, et je ne saurais jamais assez te remercier pour cela. Merci de m'avoir écouté répéter mon oral plus de fois que n'importe qui. Merci d'avoir été là et de me suivre dans mes aventures. Merci d'être celui que tu es tout simplement.

Table des matières

Table des matières	1
Table des abréviations	4
Table des illustrations	7
Table des Tableaux	9
Résumé scientifique	10
Résumé vulgarisé	14
Introduction.....	15
Chapitre I : L'hématopoïèse	15
1. L'hématopoïèse embryonnaire	15
2. L'hématopoïèse adulte.....	18
2.1. L'hématopoïèse médullaire.....	18
2.1.1. Les CSH médullaires.....	18
2.1.2. La niche médullaire	20
2.1.3. La différenciation hématopoïétique.....	22
2.1.4. Des progéniteurs aux cellules matures du sang : la mise en place du système immunitaire.....	25
2.1.4.1. La régulation de la différenciation hématopoïétique	25
2.1.4.2. Le système immunitaire	26
3. L'hématopoïèse extra-médullaire	28
3.1. L'hématopoïèse extra-médullaire en situation pathologique.....	28
3.2. L'hématopoïèse extra-médullaire physiologique : rôle du tissu adipeux	29
Chapitre II : Les macrophages, des cellules sentinelles indispensables au maintien de l'homéostasie tissulaire.....	33
1. Fonctions générales des macrophages	33
1.1. La phagocytose.....	33
1.1.1. Mécanisme général	33
1.1.2. Un large panel de récepteurs pour la reconnaissance des dangers	35
1.1.2.1. Les récepteurs aux opsonines	36
1.1.2.2. Les Pathogen Recognition Receptor (PRR).....	36
1.1.2.3. Les récepteurs scavenger	39
1.2. La sécrétion de médiateurs de l'inflammation	40
1.2.1. Les médiateurs de l'inflammation	40

1.2.2.	Principales voies de signalisation permettant le contrôle de la synthèse des médiateurs de l'inflammation.....	42
1.3.	La présentation de l'antigène.....	43
2.	Les macrophages : des cellules hétérogènes	45
2.1.	Hétérogénéité fonctionnelle : la polarisation des macrophages.....	45
2.2.	Hétérogénéité ontogénique.....	50
2.2.1.	Origine embryonnaire des macrophages.....	50
2.2.2.	La composition des tissus en macrophages après la naissance et leur rôle au sein des tissus ⁵³	
2.2.3.	Quelques exemples de macrophages tissulaires et leurs fonctions	56
2.2.4.	Les macrophages du tissu adipeux.....	57
Chapitre III : Les macrophages des acteurs clés de la réparation tissulaire.....		59
1.	Les différentes issues de la réparation tissulaire	59
1.1.	De la régénération à la cicatrisation/fibrose au cours de l'évolution des espèces et du développement post-natal.....	59
1.2.	Le système immunitaire au cœur de l'orientation vers la régénération ou la cicatrisation/fibrose	60
2.	Le rôle des macrophages dans les différentes phases de la réparation tissulaire chez le mammifère.....	63
2.1.	Hémostase et inflammation.....	64
2.1.1.	Rôle des monocytes/macrophages dans l'inflammation aiguë	65
2.1.2.	Rôle des macrophages dans la résolution de l'inflammation	66
2.2.	La prolifération et le rôle des macrophages.....	69
2.3.	Le remodelage tissulaire et le rôle des macrophages.....	70
2.4.	Origine des macrophages dans la réparation tissulaire	71
Etude expérimentale.....		73
Chapitre I : Etude du rôle des macrophages issus de l'hématopoïèse du TA dans la réparation du TA post-lipectomie et la réparation cardiaque posts-infarctus du myocarde in vivo		74
1.	La construction de chimères hématopoïétique permet le suivi des macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA ou médullaire.....	74
2.	Etude du rôle des macrophages dans différents contextes de lésion aiguë.....	78
2.1.	Les modèles de lésion tissulaire	78
2.1.1.	Modèle de régénération induite dans le TA inguinal sous-cutané chez la souris C57Bl/6 et les chimères hématopoïétiques (la lipectomie)	79
2.1.2.	Modèle de l'infarctus du myocarde	80
2.2.	Résultats.....	81
2.3.	Conclusion	82
3.	Un modèle de lésion particulier : le vieillissement	122

3.1. Résultats	123
3.2. Conclusion	124
Chapitre II : Etude des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA et comparaison avec les macrophages dérivés de l'hématopoïèse médullaire in vitro	126
1. La production de macrophages résidents du TA grâce à un modèle de culture 3D	126
2. Résultats	128
3. Conclusion	129
Discussion	153
Bibliographie	160

Table des abréviations

AGM	Région aorto-gonado mésonéphrotique
AMPK	Adénosine Monophosphate activée par la protéine Kinase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ASC	Cellules stromale/souche mésenchymateuse dérivés du tissu adipeux
ATP	Adenosine triphosphate
CD	Cluster de différenciation
CDK	Cycline dépendante des Kinase
CDKi	Inhibiteur des cyclines dépendante des kinases
CFU	Unité de formation des colonies
CLP	Progéniteur lymphoïde commun
CLR	Récepteur des lectines de type C
CLS	Structure de Type Couronne
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMP	Progéniteur myéloïde commun
COX	Cyclooxygénase
CSF	Facteur de stimulation des colonies
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CSM	Cellule souche mésenchymateuse
DAMP	Motif moléculaire associé aux dommages cellulaires
dT	Dtomato
DT	Toxine diphtérique
DTR	Récepteur à la Toxine Diphtérique
E. Coli	Escherichia coli
EMP	Progéniteur erythro-myéloïde
EPO	Erythropoïétine
FcR	Récepteurs de la Fraction Constante des anticorps
Flt3	Tyrosine Kinase 3 de type Fms
GATA 1	Protéine de liaison 1 à GATA
GF	Facteurs de croissance
GM-CSF	Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages
GMP	Progéniteur des granulocytes et macrophages
G-CSF	Facteur de stimulation de colonie des granulocytes
HFD	Régime gras
HIF	Facteur induit par l'hypoxie
HMGB1	High mobility group box 1
ICAM	Protéine d'adhésion inter-cellulaire
VCAM	Protéine d'adhésion des cellules vasculaires
IFNg	Interféron gamma
Ig	Immunoglobuline
IGF1	Insulin-like Growth Factor
IRF	Facteur de regulation des interférons

IKK	IκB Kinase
IL	Interleukine
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
JAK	Janus kinase
LB	Lymphocytes B
LMP	Progéniteur lympho-myéloïde
LOX	Lipoxygénase
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
LTB4	Leucotriène B4
LT-CSH	Long Term- cellules souches hématopoïétiques
LTreg	Lymphocyte T régulateurs
LXA4	Lipoxine A4
LXB4	Lipoxine B4
M-CSF	Facteur de stimulation des colonies de macrophages
MEC	Matrice extracellulaire
MEP	Progéniteur Erythro-mégacaryocytaire
Mertk	Myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase
Marco	Macrophage receptor with collagenous structure
Mk	Mégacaryocytes
MRL	Murphy roths large
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MO	Moelle osseuse
MPP	Progéniteur multipotent
NaCl	Chlorure de Sodium
NaIM	Naloxone- méthiodide
NF-κB	Facteur nucléaire kappa B
NK	Natural killer
NLR	Récepteur de type NOD
NO	Oxyde nitrique
OXLDL	Lipoprotéine de faible densité oxydée
PAMP	Motif de reconnaissance moléculaire associé aux pathogènes
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
pEMP	Progéniteur érythro-myéloïde précoce
PGD2	Prostaglandine D2
PGE2	Prostaglandine E2
PGI2	Prostaglandine I2
PPARγ	Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma
PRR	Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires
PS	Phosphatidyl sérine
RNS	Espèce réactive de l'azote
ROS	Espèce réactive de l'oxygène
RLR	Récepteurs de type RIG-I
SCF	Facteur de croissance des cellules souches
STAT	Signal transducers and activators of transcription

ST-CSH	Short-term cellules souches hématopoïétiques
SVF	Fraction stroma-vasculaire
TA	Tissu adipeux
tEMP	Progéniteur érythro-myéloïde tardif
TGF-β	Transforming growth factor beta
TLR	Récepteur de type Toll
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TPO	Thrombopoïétine
ULA	Ultra low adherence
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Table des illustrations

Figure 1: Schéma représentant les étapes successives de l'hématopoïèse embryonnaire chez la souris (inspiré de Hoeffel et Ginhoux (Hoeffel & Ginhoux 2015))	17
Figure 2 : Les différentes niches médullaires : les cellules qui les composent et leurs sécrétions forment un environnement complexe (inspiré de (Zhang, Zhang, et al. 2019; De Grandis et al. 2016))	22
Figure 3 : Le modèle linéaire de différenciation hématopoïétique.	23
Figure 4 : Un modèle de la différenciation hématopoïétique non linéaire proposé par Laurenti et Göttgens dans lequel les différents progéniteurs ne sont pas restreints à un lignage unique mais peuvent aussi générer des cellules des autres lignages (Laurenti & Göttgens 2018)	24
Figure 5 : Les différents facteurs de transcription, cytokines et facteurs de croissance impliqués dans la différenciation des cellules hématopoïétiques.	26
Figure 6 : La composition du TA.	29
Figure 7 : Les étapes de la phagocytose.	35
Figure 8 : La voie de l'hydrolyse de l'acide arachidonique.	41
Figure 9 : Les principaux facteurs de transcription activés par la fixation de ligands sur les PRR et les récepteurs des médiateurs de l'inflammation.	43
Figure 10 : La présentation de l'antigène par les macrophages.	44
Figure 11 : Spectre de polarisation des macrophages	46
Figure 12 : Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des polarisations pro- et anti-inflammatoires des macrophages in vitro.	47
Figure 13 : Le métabolisme des macrophages en réponse à une stimulation pro-(gauche) ou anti-inflammatoire (droite) (Wculek et al. 2022)	50
Figure 14 : Les vagues de colonisation de macrophages au cours du développement embryonnaire et après la naissance.	52
Figure 15: Evolution des populations de macrophages au cours du développement dans le cerveau, le foie, la peau, le cœur et l'intestin avant et après la naissance.	53
Figure 16 : Hypothèse de Williams sur la capacité des monocytes à intégrer et persister au sein des tissus adultes en fonction du degrés de déplétion des macrophages	55

Figure 17 : Fonctions et origine des macrophages tissulaires dans le cerveau, le foie et le cœur.	57
Figure 18 : Corrélation inverse entre l'évolution / la complexification du système immunitaire et la capacité de régénération tissulaire.	62
Figure 19 : Cinétique de l'évolution du nombre de publications sur le système immunitaire et la réparation tissulaire (a) et les macrophages et la réparation tissulaire (b).....	63
Figure 20 : Cinétiques de la régénération tissulaire (à gauche) et de la cicatrisation (à droite)	64
Figure 21 : cinétiques d'apparition des différentes populations immunitaires au cours de l'inflammation aiguë et de la résolution de l'inflammation suite à une lésion tissulaire.....	69
Figure 22 : Les principaux dépôts adipeux blanc chez l'Homme et la souris (Luong et al. 2019).....	74
Figure 23 : la composition en macrophages du TA	75
Figure 24 : Schéma représentatif des deux types de constructions de chimères hématopoïétiques (TA ou MO).....	76
Figure 25 : Schéma représentatif des deux types de constructions de chimères hématopoïétiques permettant la déplétion des macrophages (TA-DTR ou MO-DTR).....	78
Figure 26 : Modèle de lipectomie et d'induction de la régénération ou de la cicatrisation .	80
Figure 27 : Modèle de l'infarctus du myocarde et de l'induction du diabète	81
Figure 28 : Quantification de l'évolution des populations de CD45 et de macrophages dans le TA de souris jeunes et âgées et analyse de leur origine.	123
Figure 29 : Modèle de culture in vitro en 3D permettant la production de macrophages du TA.....	128

Table des Tableaux

Tableau 1: Les cellules de l'immunité innée et leurs principaux marqueurs.....	27
Tableau 2 : Les cellules de l'immunité adaptative et leurs principaux marqueurs.....	28
Tableau 3 : Les principaux TLR exprimés par les macrophages murins, leurs ligands et leurs localisations (inspiré de (Takeuchi & Akira 2010; Imani Fooladi et al. 2011))	38
Tableau 4 : Quelques CLR exprimés par les macrophages murins, leurs ligands et l'origine de leurs ligands (inspiré de (Sancho & Reis e Sousa 2012)).....	39

Résumé scientifique

Les macrophages sont les cellules clés de l'immunité innée qui jouent un rôle prépondérant dans la réponse inflammatoire et la réparation tissulaire. En effet, une lésion tissulaire induit une inflammation aiguë suivie d'une phase de résolution finement orchestrée par les macrophages afin d'empêcher la mise en place d'une inflammation chronique, et favoriser la réparation du tissu. Ces macrophages constituent une population cellulaire très hétérogène. Ils possèdent des origines développementales distinctes qui leur confèrent des caractéristiques différentes, et présentent une multitude de phénotypes en réponse à leur environnement. Chez le mammifère adulte, on distingue classiquement les macrophages issus de l'hématopoïèse embryonnaire décrits comme macrophages résidents permettant le maintien de l'homéostasie tissulaire, et les macrophages issus de l'hématopoïèse médullaire adulte décrits comme pro-inflammatoires et intervenant dans la réponse inflammatoire aiguë. Les travaux du laboratoire ont cependant permis d'identifier un processus hématopoïétique spécifique et quantitativement significatif dans le tissu adipeux (TA), reposant sur la présence de cellules souches/progénitrices hématopoïétiques chez la souris adulte. Cette hématopoïèse génère principalement des cellules myéloïdes, dont des macrophages qui sont localisés dans le TA en conditions physiologiques où ils participent à la population de macrophages résidents, et sont impliqués dans le contrôle de l'homéostasie du tissu. **Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle ces macrophages jouent un rôle différent des macrophages médullaires dans la réparation tissulaire endogène et à distance, et qu'une dérégulation de ce processus est impliquée dans les altérations tissulaires observées avec le vieillissement. Ces fonctions différentes seraient expliquées par des caractéristiques intrinsèques spécifiques à chaque type de macrophages.**

Grâce à la construction de chimères hématopoïétiques, nous avons étudié le rôle des macrophages issus de l'hématopoïèse du TA dans la réparation tissulaire dans deux modèles de lésion, une ablation partielle du TA et l'infarctus du myocarde. Nous avons montré que ces macrophages sont indispensables à la régénération du TA grâce à une capacité d'efférocytose supérieure à celle des macrophages dérivés des monocytes circulants. En revanche, bien qu'ils soient présents dans le cœur après un infarctus du myocarde, ils jouent un rôle délétère dans le remodelage et la fonction cardiaque post lésion. Ces résultats nous

ont conduits à étudier les caractéristiques intrinsèques des macrophages du TA et leur réponse à différents stimuli.

Grâce à un modèle de culture 3D nous avons comparé les propriétés intrinsèques de ces macrophages avec celles des macrophages dérivés des monocytes circulants. Nos résultats montrent que les macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA possèdent une réactivité accrue aux signaux de leur environnement par rapport aux macrophages issus de l'hématopoïèse médullaire.

En conclusion, nos travaux montrent que les macrophages issus de l'hématopoïèse du TA ont des propriétés phénotypiques et fonctionnelles différentes de celles des macrophages provenant de l'hématopoïèse médullaire. Ces propriétés en font des acteurs ayant un rôle clé dans la réparation tissulaire, qu'il soit bénéfique ou délétère, non seulement au sein du TA mais aussi dans d'autres tissus.

Macrophages are key cells of innate immunity that play a major role in the inflammatory response and tissue repair. Indeed, a tissue injury induces an acute inflammation followed by a resolution phase finely orchestrated by macrophages in order to prevent the development of a chronic inflammation, and to promote tissue repair. They constitute a very heterogeneous cell population. They belong to distinct developmental origins that give them different characteristics and present a multitude of phenotypes in response to their environment. In adult mammal, two distinct origins have been described: embryonic hematopoiesis that gives rise to resident macrophages involved in the control of tissue homeostasis, and adult medullar hematopoiesis that generates pro-inflammatory macrophages involved in acute inflammatory response. In addition, a specific and quantitatively significant hematopoietic process has been identified in our lab in adipose tissue (AT), based on the presence of hematopoietic stem/progenitor cells in adult mice. This hematopoiesis generates mainly myeloid cells, including macrophages that are localized in the AT under physiological conditions where they contribute to the resident macrophage population and are involved in the control of tissue homeostasis. **We hypothesized that these macrophages play a different role than medullary macrophages in tissue repair, and that a deregulation of this process is involved in the tissue alterations observed with aging. These different functions would be explained by intrinsic characteristics specific to each type of macrophages.**

Using hematopoietic chimeras, we investigated the role of macrophages derived from AT hematopoiesis in tissue repair in two injury models, partial AT ablation and myocardial infarction. We showed that macrophages derived from AT hematopoiesis are essential for AT regeneration because of a higher efferocytosis capacity than macrophages derived from circulating monocytes. On the other hand, although they are present in the heart after myocardial infarction, they play a deleterious role in post-injury cardiac remodeling and function.

Using a 3D culture model, we compared the intrinsic properties of these macrophages with those of macrophages derived from circulating monocytes. Our results show that macrophages derived from AT hematopoiesis have an increased reactivity to signals from their environment compared to macrophages derived from medullar hematopoiesis.

In conclusion, our work shows that macrophages derived from AT hematopoiesis have specific phenotypic and functional properties compared to macrophages derived from the bone marrow. Thanks to these properties, they play crucial positive or negative roles in tissue repair, in the AT and in other tissues.

Résumé vulgarisé

Les macrophages (M ϕ) constituent la première ligne de défense de l'organisme et sont des acteurs clés de la réparation tissulaire à la suite d'une lésion. Ils présentent une hétérogénéité fonctionnelle et proviennent d'origines tissulaires différentes. L'origine la plus décrite est la moelle osseuse (MO). Dans le tissu adipeux (TA), il existe une production endogène de M ϕ fonctionnels, qui ont des propriétés spécifiques. **L'objectif de ce travail est de tester l'hypothèse selon laquelle les M ϕ endogènes du TA jouent un rôle crucial dans le processus de réparation tissulaire chez l'adulte et pourraient être responsables de l'altération de ce processus au cours du vieillissement.** Nos résultats montrent en effet qu'en fonction de leur localisation, les M ϕ endogènes du TA jouent un rôle différent des M ϕ médullaires dans la réparation tissulaire et leur disparition avec l'âge pourrait expliquer au moins en partie l'altération de ce processus.

Macrophages (M ϕ) constitute one of the first lines of defense of the body and are key players in tissue repair following injury. They exhibit functional heterogeneity and belong from different tissue origins. The most described origin is the bone marrow (BM). In adipose tissue (AT), there is an endogenous production of functional M ϕ s, which have specific properties. **The aim of this work is to test the hypothesis that endogenous M ϕ in AT play a crucial role in tissue repair process in adults and could be responsible for the impairment of this process observed with aging.** Our results show that, according to their localization, endogenous AT M ϕ play a different role than medullary M ϕ in tissue repair and their depletion with aging could explain at least in part the alteration of this process.

Introduction

Chapitre I : L'hématopoïèse

L'hématopoïèse est un processus physiologique permettant la production des dix types cellulaires qui composent le sang. Les cellules produites par ce processus sont subdivisées en trois grands sous-types : les leucocytes qui sont impliqués dans l'immunité innée et adaptative, les érythrocytes qui permettent le transport de gaz dans le sang et les plaquettes qui permettent la coagulation lors d'une lésion induisant une brèche vasculaire. Les cellules sanguines ont une durée de vie qui varie de quelques heures à plusieurs années. Elles doivent donc être renouvelées de façon continue. On estime que 200 milliards d'érythrocytes, 10 milliards de leucocytes et 400 milliards de plaquettes sont produits chaque jour en condition physiologique chez un Homme adulte, ce qui démontre une grande capacité de renouvellement des cellules du sang. Ces proportions sont largement modifiables en cas de lésion tissulaire ou d'infection, faisant du sang un des tissus les plus plastiques de l'organisme. Cette production est possible grâce aux cellules souches hématopoïétiques (CSH) desquelles dérive la totalité de ces lignages cellulaires. Les CSH sont retrouvées en grand partie nichées au sein de la moelle osseuse (MO). Cependant, cette localisation varie au cours du développement et n'est également pas exclusive chez le mammifère adulte (Rieger & Schroeder 2012).

1. L'hématopoïèse embryonnaire

Le processus d'hématopoïèse est observé dès les premiers stades de développement chez le mammifère. Elle s'effectue en plusieurs vagues au cours desquelles l'apparition de progéniteurs communs puis des CSH se succèdent au sein des différents tissus de l'embryon et annexes embryonnaires (sac vitellin, placenta). La vague hématopoïétique primitive survient au 7^{ème} jour de vie embryonnaire (E7) au niveau du sac vitellin chez la souris. On retrouve alors des progéniteurs érythro-myéloïdes précoces (pEMP) capables de générer des

érythrocytes primitifs qui assurent l'oxygénation de l'embryon, des mégacaryocytes primitifs qui permettent la mise en place et la maintenance de la vascularisation et des macrophages primitifs qui assurent le remodelage et la surveillance de l'embryon. Aux alentours du jour 8,5 de vie embryonnaire (E8,5) une seconde vague survient au sein du sac vitellin. Les cellules de l'endothélium hémogénique génèrent des progéniteurs érythro-myéloïdes tardifs (tEMP). Ces tEMP rejoignent le foie fœtal aux alentours de E9,5 où ils se multiplient et se différencient en érythrocytes définitifs, mégacaryocytes, macrophages (via un intermédiaire monocytaire), neutrophiles et mastocytes embryonnaires (Palis et al. 1999; Palis 2016). Les cellules produites permettent de répondre aux besoins immédiats de l'embryon. Pendant longtemps considérés comme provenant uniquement d'une source intra-embryonnaire au niveau de la région aorto-gonado-mésonephrotique (AGM) aux alentours du jour 9,5/10 de vie embryonnaire, les progéniteurs des cellules de la lignée lympho-myéloïde (LMP) apparaissent également dans le sac vitellin et le placenta (Böiers et al. 2013) (Figure 1).

L'apparition des CSH matures à E10,5 marque le début de l'hématopoïèse définitive. Il existe encore une controverse sur le site de leur apparition. En effet, certains affirment que l'on ne retrouve des CSH matures, c'est-à-dire capables de reconstituer le système hématopoïétique complet d'une souris adulte irradiée létalement qu'au niveau de l'AGM, et que donc toutes les CSH ont une origine embryonnaire (Kieusseian et al. 2012). D'autres soutiennent que les CSH matures peuvent aussi provenir du sac vitellin et du placenta et auraient donc une double origine (embryonnaire et extra-embryonnaire) (Kumaravelu et al. 2002). Étant donné que la circulation sanguine est déjà mise en place au sein de l'embryon au jour 7,25 de vie embryonnaire il est difficile de déterminer le lieu exact de génération de ces CSH. Quelle que soit l'origine de l'émergence des CSH matures, elles migrent ensuite vers le foie fœtal à E 10,5/ E11 approximativement, où elles s'auto-renouvellent pour former le nombre de CSH nécessaires au développement du système hématopoïétique chez le nouveau-né (Bowie et al. 2007; Ikuta & Weissman 1992). Elles migrent ensuite vers la rate et la MO qui sera le site majeur de l'hématopoïèse adulte (Christensen et al. 2004) (Figure 1).

Il semblerait que ces observations faites chez la souris soient au moins en partie retrouvées aussi chez l'Homme (Julien et al. 2016). Il a été démontré que le sac vitellin est la première source de cellules hématopoïétiques avec l'apparition des érythrocytes, des mégacaryocytes et des macrophages primitifs à partir d'un progéniteur commun (Migliaccio et al. 1986).

Cependant, les progéniteurs lymphoïdes (Tavian et al. 2001) ou les CSH n'ont pas été mis en évidence dans le sac vitellin. Il semblerait que l'intégralité des CSH provienne de l'AGM (Ivanovs et al. 2011; Tavian et al. 1996) donc d'une origine intra-embryonnaire chez l'Homme avant de migrer vers le foie fœtal. Cependant, les études sur l'embryon humain sont plus rares et moins récentes compliquant le parallèle que l'on peut établir entre hématopoïèse embryonnaire chez l'Homme et la souris.

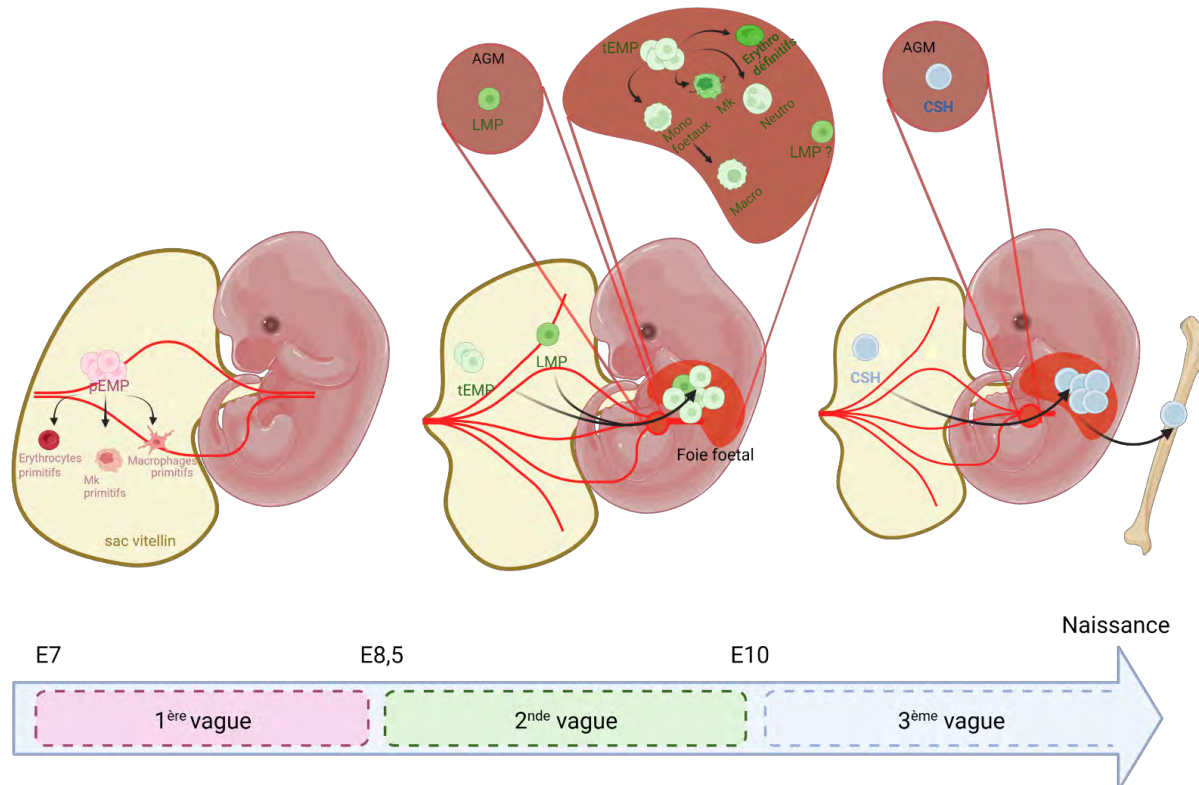


Figure 1: Schéma représentant les étapes successives de l'hématopoïèse embryonnaire chez la souris (inspiré de Hoeffel et Ginhoux (Hoeffel & Ginhoux 2015)).

1ère vague : Les pEMP capables de générer des érythrocytes, des mégacaryocytes et des macrophages primitifs apparaissent à E7 dans le sac vitellin. 2ème vague : Les tEMP à E8,5 apparaissent dans le sac vitellin avant de migrer vers le foie fœtal où ils prolifèrent et génèrent les cellules myéloïdes embryonnaires. Peu après (E9,5) les LMP apparaissent dans le sac vitellin et l'AGM. 3ème vague : les CSH se forment dans le sac vitellin et/ou dans l'AGM avant de migrer et proliférer dans le foie fœtal. Avant la naissance (à partir de E 12,5) les CSH migrent vers la MO où elles persistent après la naissance. pEMP : progéniteur érythro-myéloïde précoce ; tEMP : progéniteur érythro-myéloïde tardif ; LMP : progéniteur lympho-myéloïde ; Macro : macrophages ; Mk : mégacaryocytes ; Neutro : neutrophiles ; Erythro : érythrocytes ; CSH : cellules souches hématopoïétiques ; AGM : région aorto-gonado-mésonephrotique. Générer avec BioRender.com.

2. L'hématopoïèse adulte

A la naissance, la MO devient le site principal de l'hématopoïèse. La différenciation des CSH est contrôlée d'une part de manière intrinsèque, grâce à l'expression ou la répression de facteurs de transcription et d'autre part de manière extrinsèque par la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines au sein de la niche médullaire que nous allons détailler au cours des paragraphes suivants (Rieger & Schroeder 2012; Belyavsky et al. 2021; Orkin 1995).

2.1. L'hématopoïèse médullaire

2.1.1. Les CSH médullaires

Les CSH représentent entre 0.05% et 0.1% de la MO totale murine. Comme toutes les cellules souches, les CSH sont caractérisées par leur capacité d'auto-renouvellement et de multipotence.

L'auto-renouvellement est défini comme la capacité d'une cellule à générer une cellule fille identique à la cellule mère et une cellule fille qui se différencie, on parle alors de division asymétrique. Ce processus permet le maintien à l'identique du réservoir de cellules souches dans l'organisme et donc une certaine forme d'homéostasie. L'auto-renouvellement des CSH a été mis en évidence grâce à des expériences de transplantation secondaire chez des souris irradiées létalement (Osawa et al. 1996). Ces expériences consistent à transplanter des CSH dans un premier organisme irradié à une dose sub-létale, puis à isoler les CSH de cet organisme reconstitué et de les transplanter dans un deuxième hôte irradié de manière sub-létale. La survie du premier hôte permet de démontrer la capacité des cellules greffées à régénérer l'ensemble des cellules sanguines, celle du second receveur démontre la capacité d'auto-renouvellement des CSH au sein du premier individu. Cependant à l'âge adulte, la CSH est la majorité du temps quiescente et ne s'auto-renouvelle que lorsque c'est nécessaire.

La multipotence est la capacité des cellules souches à générer un ensemble de cellules différenciées constituant un tissu fonctionnel. Dans le cas des CSH, c'est la capacité à générer l'ensemble des cellules du sang. La multipotence des CSH a été mise en évidence *in vivo* grâce à la transplantation de ces cellules dans des organismes dont le système hématopoïétique a

été déplété (irradiation létale). En effet, ces cellules une fois greffées peuvent renouveler l'entière des lignages hématopoïétiques et à assurer la survie des souris (Spangrude et al. 1988). La multipotence a également été démontrée *in vitro* pour la première fois en 1966 par des expériences de clonogénie aussi appelés colony forming unit (CFU) (Bradley & Metcalf 1966) et ces tests ont été largement utilisés depuis. Ces expériences permettent de tester le potentiel de différenciation des CSH/ progéniteurs par leur capacité à former des colonies des différents lignages (Wasnik et al. 2012).

La caractérisation fonctionnelle par greffe des CSH dans des animaux irradiés a permis de mettre en évidence deux types de CSH qui possèdent des propriétés fonctionnelles distinctes : les LT-CSH pour « long-term hematopoietic stem cells » et les ST-CSH pour « short-time hematopoietic stem cells ». Les LT-CSH ont la capacité de reconstituer le système hématopoïétique pour toute la durée de vie de l'animal. Les ST-CSH dérivent des LT-CSH et peuvent, elles aussi, reconstituer les lignages lymphoïdes et myéloïdes mais ne peuvent pas se maintenir à long terme. Un troisième type cellulaire appelé progéniteur multipotent (MPP) dérive des ST-CSH. Ce progéniteur capable de générer les lignages lymphoïdes et myéloïdes a cependant, perdu sa capacité d'auto-renouvellement (Yang et al. 2005; Colvin et al. 2009; Challen et al. 2009). Ces trois populations cellulaires sont caractérisées par l'expression des marqueurs de surface Sca1 et c-Kit (CD117) ainsi que par l'absence d'expression des marqueurs des cellules hématopoïétiques différenciées regroupés en un cocktail appelé Lin. L'étude par cytométrie de flux de l'expression de marqueurs phénotypiques permet cependant de les distinguer : les LT-CSH sont caractérisées par l'expression du CD150 et l'absence du CD34. La différenciation des LT-CSH en ST-CSH entraîne l'expression du CD34 et les MPP acquièrent l'expression du CD135 (Cheng et al. 2020; Oguro et al. 2013).

On distingue également ces 3 types cellulaires par leur fréquence de prolifération qui augmente avec la différenciation. Les LT-CSH prolifèrent peu, ce qui limite les risques de mutations associés à la division cellulaire mais aussi évite l'exposition de l'ADN aux dommages induits par le stress oxydant. La capacité de prolifération est contrôlée par des propriétés intrinsèques des CSH telles que l'expression de régulateurs du cycle cellulaire (CDK et CDKI) (Matsumoto et al. 2011; Yamada et al. 2012), de facteurs de transcription (Hock et al. 2004; Liu et al. 2009; Tsai et al. 2013), de molécules de régulation épigénétique (Foudi et

al. 2009; Pessoa Rodrigues & Akhtar 2021), d'ARNs non-codants (Hu et al. 2021; Lechman et al. 2012) mais aussi par le métabolisme de la cellule (Chow et al. 2001; Takubo et al. 2013).

En plus de ces mécanismes de régulation intrinsèque, les CSH sont retrouvées dans des environnements particuliers, appelés niches hématopoïétiques qui modulent leurs propriétés. En effet, les acteurs cellulaires et matriciel de la niche constituent des signaux extrinsèques pour les CSH modulant leurs capacités d'auto-renouvellement et de différenciation (Morrison & Scadden 2014; Lucas 2021).

2.1.2. La niche médullaire

Dans la MO, deux types de niches ont été décrites, les niches vasculaires à proximité des vaisseaux sanguins (sinusoïdes et artérioles), et les niches endostéales à proximité de l'os créant deux micro-environnements différents au sein de la MO (Figure 2). Le micro-environnement est défini comme l'ensemble des facteurs solubles, matriciels et cellulaires qui composent une niche. Plusieurs types cellulaires composant la MO sont retrouvés dans ces niches et participent activement au maintien du pool des cellules souches à travers le contrôle de leur quiescence, de leur entrée en prolifération et de leur rétention au sein de la niche. On retrouve principalement, les cellules de Schwann, les cellules stromales/souches mésenchymateuses (CSM), les adipocytes, les cellules endothéliales, les péricytes, les mégacaryocytes, les ostéoblastes et les ostéoclastes. Le microenvironnement joue un rôle crucial dans le contrôle de l'état quiescence ou de division des CSH, notamment à travers la sécrétion de facteurs solubles. Les facteurs tels que le TGF- β , CXCL12, Nestin, Ostéopontine, Angiogénine permettent le maintien de la quiescence (Ding et al. 2012; Greenbaum et al. 2013). A l'inverse, le Stem Cell Factor (SCF), la Thrombopoïétine, Notch, l'Adiponectine les cytokines telles que l'IL-3, l'IL-6 et l'IL-12 sont impliqués dans l'activation de leur prolifération (Zhang & Lodish 2008). En plus de ces facteurs sécrétés, les interactions physiques des CSH avec les cellules du microenvironnement permettent leur rétention au sein de la niche. En effet, certaines études montrent que les CSH à l'état quiescent, sont retrouvées dans les niches vasculaires au niveau des artérioles, en interaction étroite avec les cellules endothéliales et que le clivage de ces interactions entraîne leur entrée en prolifération (Kunisaki et al. 2013; De Grandis et al. 2016). Les CSH en prolifération s'éloignent alors des

artérioles pour se rapprocher des sinusoides (Zhang, Zhang, et al. 2019). D'autres études montrent que les CSH à l'état quiescent sont en intime contact avec les ostéoblastes au niveau de l'endoste (Suzuki et al. 2006). Il existe donc plusieurs niches hématopoïétiques et plusieurs cocktails de facteurs permettant le maintien de la quiescence. La niche médullaire adulte est également composée d'adipocytes dont le rôle a été initialement décrit comme délétère et apparaissant lors de l'obésité, de l'ostéoporose et du vieillissement (Justesen et al. 2001; Yeung et al. 2005; Scheller et al. 2015). Cependant, les adipocytes semblent jouer un rôle important de support pour les CSH via leur sécrétion d'adiponectine. En effet, chez des animaux invalidés pour l'expression de l'adiponectine, la reconstitution du système hématopoïétique à la suite d'une irradiation est lente et peu efficace, à cause d'une mauvaise différenciation des CSH (Masamoto et al. 2017).

Les CSH interagissent également avec les éléments de la matrice extracellulaire (MEC) qui modifient leur état de quiescence et leur survie. Une MEC rigide permet le maintien à l'état quiescent des CSH alors qu'une MEC plus permissive entraîne leur entrée en prolifération (Gvaramia et al. 2017).

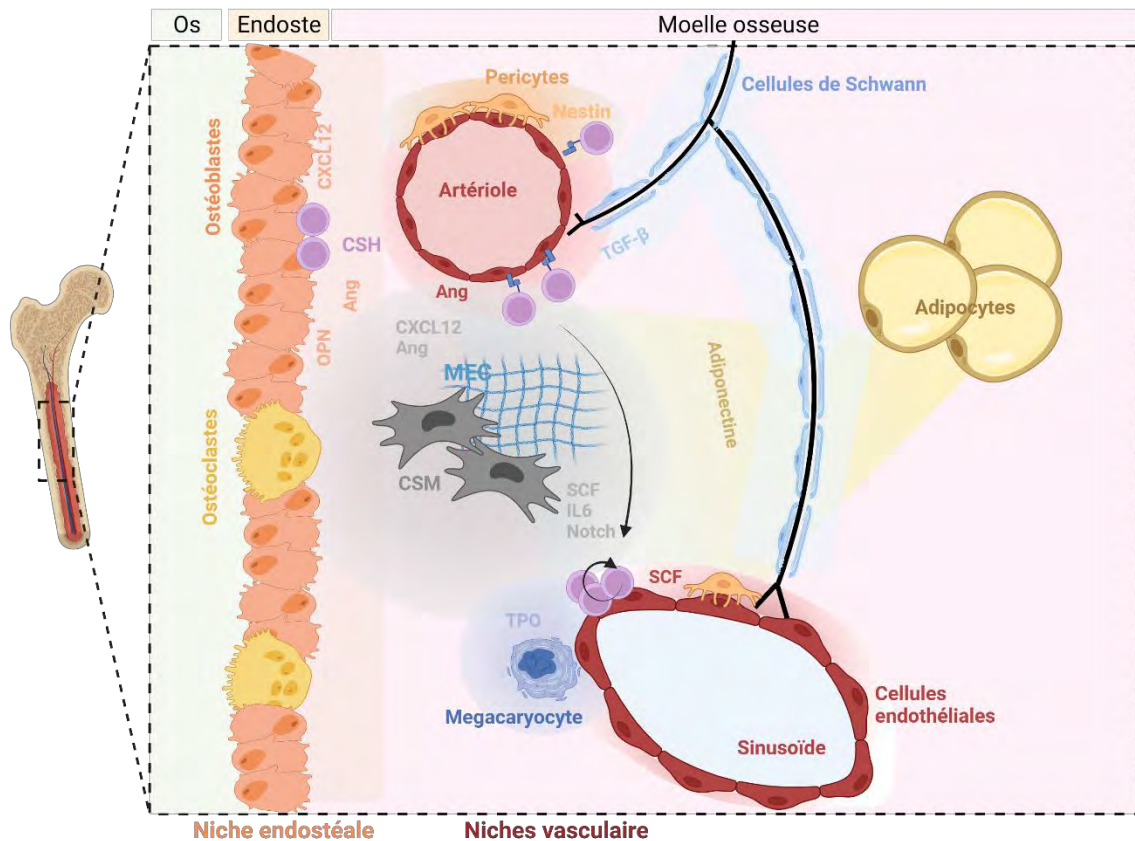


Figure 2 : Les différentes niches médullaires : les cellules qui les composent et leurs sécrétions forment un environnement complexe (inspiré de (Zhang, Zhang, et al. 2019; De Grandis et al. 2016))
 Les cellules bordantes de la moelle osseuse (ostéoblastes et ostéoclastes) forment la niche endostéale et libèrent de l'ostéopontine (OPN), de l'angiogénine (Ang), et du CXCL12 impliqués dans le maintien de la quiescence des CSH. Les niches vasculaires sont de deux types artériolaire et sinusoidal. Elles sont composées de cellules endothéliales et de péricytes. Les péricytes produisent de la Nestin et les cellules endothéliales artérielaires de l'angiogénine et expriment des Selectines qui interagissent avec les CSH permettant leur rétention au sein de la niche et le maintien de leur quiescence. Au contraire la production de SCF entraîne leur différenciation au niveau sinusoidal. La niche est également composée de cellules souches mésenchymateuses (CSM) productrices de matrice extracellulaire (MEC) mais également de CXCL12 et d'angiogénine impliqués dans la quiescence des CSH et de SCF, d'IL-6 et du facteur Notch impliqués dans la différenciation des CSH. Les cellules de Schwann, productrices de TGF- β , les mégacaryocytes producteurs de thrombopoïétine (TPO) et les adipocytes producteurs d'adiponectine composent également la niche médullaire. Générer avec BioRender.com.

2.1.3. La différenciation hématopoïétique

Pendant très longtemps, le modèle de la différenciation hématopoïétique a été considéré comme linéaire partant d'un précurseur commun qui devient de plus en plus restrictif dans sa capacité de production des cellules sanguines. On parle de hiérarchie arborescente où une cellule multipotente devient progressivement bipotente puis unipotente. Selon ce modèle, les MPP se différencient en progéniteurs spécifiques d'un lignage, CMP pour progéniteur

myéloïde commun et CLP pour progéniteur lymphoïde commun. Les CLP donnent naissance aux lymphocytes T, B et aux Natural Killer (NK). Les CMP quant à eux donnent naissance aux progéniteurs des mégacaryocytes et érythrocytes (MEP) et aux progéniteurs des granulocytes et macrophages (GMP). Les MEP vont eux même générer des érythrocytes (globules rouges) et des mégacaryocytes qui donneront les plaquettes. Les GMP se différencient en basophiles, éosinophiles, neutrophiles et monocytes. Les monocytes sont à l'origine des cellules dendritiques et des macrophages (Passegué et al. 2003; Wang & Wagers 2011) (Figure 3)

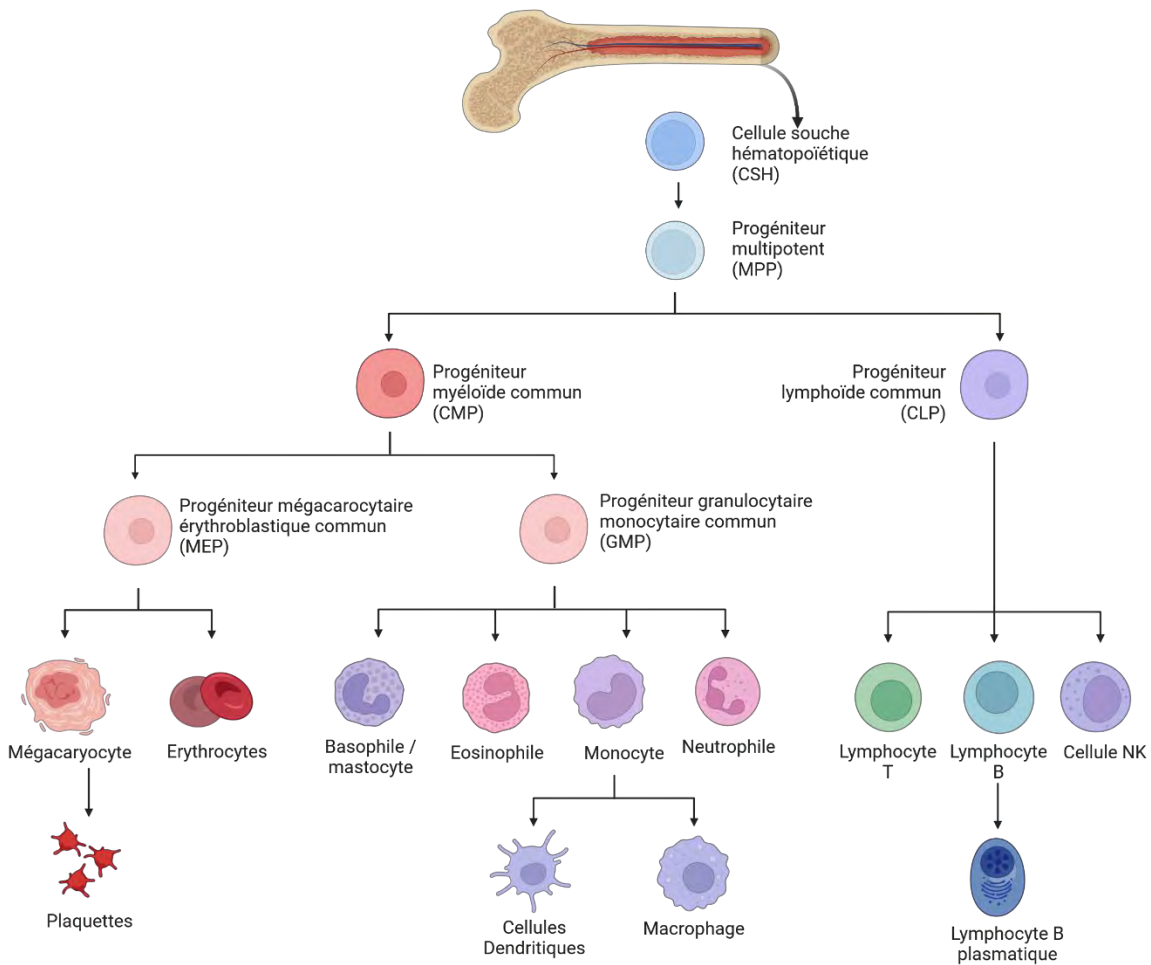


Figure 3 : Le modèle linéaire de différenciation hématopoïétique.

Inspiré de (Lai & Kondo 2006; Castillo et al. 2007). Générer avec BioRender.com

Ce modèle linéaire et hiérarchique a été contesté par plusieurs auteurs. En effet, les progéniteurs MPP sont subdivisés en 3 populations distinctes sur la base de l'expression de Flt3 et VCAM-1, et ces 3 populations ne sont pas capables de générer *in vivo* les mêmes

lignages cellulaires. Ainsi les MPP Flt3^{low}, VCAM-1⁺ sont capables de générer toutes les lignées immunitaires, les MPP Flt3^{hi} VCAM-1⁺ perdent la capacité de différenciation vers le lignage mégacaryocytaire et les MPP Flt3^{hi}, VCAM-1⁻ ne peuvent se différencier qu'en cellules de la lignée lymphoïde (Adolfsson et al. 2005; Lai et al. 2005; Lai & Kondo 2006). Yamamoto et al en 2013 ont démontré l'existence de progéniteurs myéloïdes dotés de capacités d'auto-renouvellement, comme les CSH (Yamamoto et al. 2013). De plus, certains progéniteurs bipotents tels que les MEP peuvent être issus directement des CSH sans passer par des stades successifs intermédiaires, semblant donc être restreints vers un lignage bien plus en amont que ce qui était proposé (Naik et al. 2013). En effet, il a été montré que des CSH exprimant fortement le marqueur c-Kit sont capables de générer directement des cellules de la lignée mégacaryocytaire sans passer par les différents stades de progéniteurs décrits plus haut (Shin et al. 2014). Cette hiérarchisation est de plus en plus remise en cause par l'arrivée du séquençage sur cellule unique et l'étude *in vivo* des progéniteurs hématopoïétiques (Perié & Duffy 2016) qui ont permis de mettre en évidence des progéniteurs multipotents déjà très engagés dans un lignage, caractérisés par l'expression simultanée de gènes caractéristiques des CSH et des précurseurs myéloïdes (Olsson et al. 2016). Ces données montrent que la perte de l'auto-renouvellement et la progression à travers des stades de différenciation successifs ne sont pas des étapes essentielles pour la différenciation des CSH et remettent en cause le modèle strictement linéaire de la différenciation hématopoïétique (Figure 4).

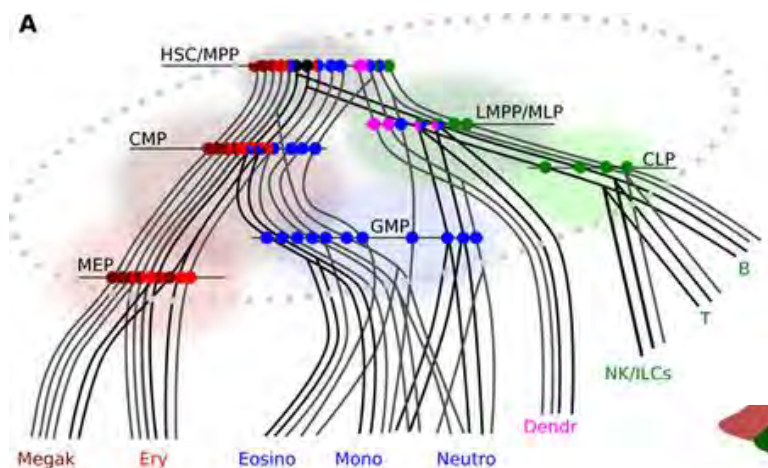


Figure 4 : Un modèle de la différenciation hématopoïétique non linéaire proposé par Laurenti et Göttgens dans lequel les différents progéniteurs ne sont pas restreints à un lignage unique mais peuvent aussi générer des cellules des autres lignages (Laurenti & Göttgens 2018)

2.1.4. Des progéniteurs aux cellules matures du sang : la mise en place du système immunitaire

2.1.4.1. *La régulation de la différenciation hématopoïétique*

L'orientation vers l'une ou l'autre des lignées hématopoïétiques est déterminée par l'expression ou la répression de facteurs de transcription, par des cytokines et des facteurs de croissance (Orkin & Zon 2008; Cheng et al. 2020; Metcalf 2008). La première cytokine découverte impliquée dans la différenciation hématopoïétique est l'érythropoïétine (EPO). En 1950, son implication dans la formation des érythrocytes a été démontrée *in vivo* (Dunjic et al. 1956). Ces études ont entraîné la mise en place d'une recherche active sur l'existence d'autres facteurs permettant la régulation de la différenciation hématopoïétique. Ces recherches ont permis la découverte des « Colony stimulating Factors » (CSF) capables de contrôler la formation des cellules de la lignée granulocytaire (Stanley et al. 1975). Actuellement, les études *in vivo* ont montré qu'il existe plusieurs sous-catégories de CSF et qu'une multitude d'autres facteurs solubles contrôle la différenciation des CSH vers les différents lignages (Zhu & Emerson 2002; Seita & Weissman 2010). Ces facteurs agissent sur l'expression ou la répression de facteurs de transcription qui sont des marqueurs décisifs de la différenciation dans les différents lignages (Robb 2007; Cantor & Orkin 2001). Ainsi par exemple, le M-CSF agit directement sur les CSH et entraîne l'expression du facteur de transcription PU.1. L'expression de PU.1 permet la différenciation des CSH vers le lignage monocytaire (Mossadegh-Keller et al. 2013). En parallèle, PU.1 se lie directement au facteur de transcription GATA-1 empêchant sa fixation à l'ADN et l'activation de la différenciation mégacaryocytaire ou érythrocytaire (Rekhtman et al. 1999). Les différentes molécules et facteurs de transcription sont décrits dans la figure ci-dessous de manière non exhaustive (Figure 5).

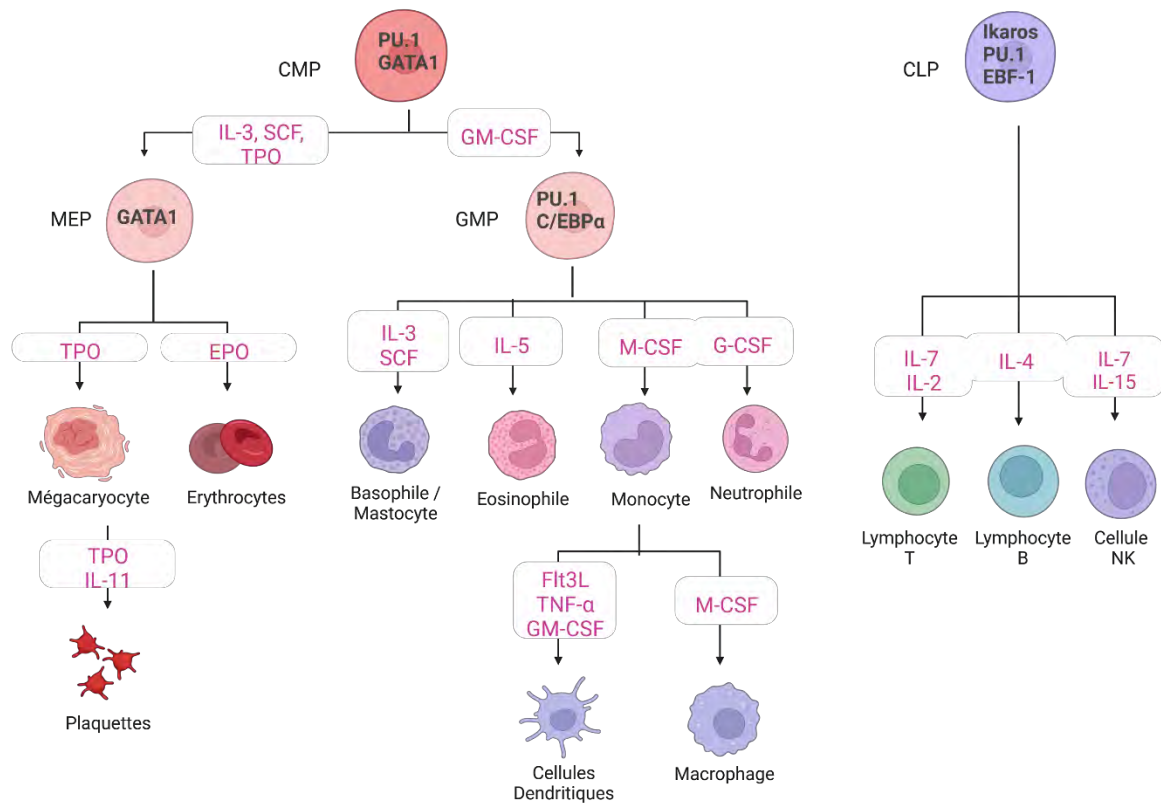


Figure 5 : Les différents facteurs de transcription, cytokines et facteurs de croissance impliqués dans la différenciation des cellules hématopoïétiques

(Cheng et al. 2020; Robb 2007; Cantor & Orkin 2001; Orkin & Zon 2008) Générer avec BioRender.com

2.1.4.2. Le système immunitaire

Le processus d'hématopoïèse aboutit à la production de l'ensemble de ces cellules matures qui constituent le système immunitaire (SI). Le SI est divisé en deux grandes branches : le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. Les cellules de l'immunité innée représentent la première ligne de défense contre les infections. Elles défendent l'organisme à travers des mécanismes peu spécifiques mais sont armées pour reconnaître des familles de molécules souvent présentes sur les pathogènes ou les cellules de l'organisme à éliminer. Elles sont produites puis en partie stockées dans la MO (neutrophiles, éosinophiles et monocytes) avant de patrouiller dans l'organisme. La maturation des monocytes s'effectue dans les tissus lors de leur conversion en macrophages ou cellules dendritiques. En revanche, les cellules du système immunitaire adaptatif ne constituent pas une ligne de défense rapide puisqu'elles nécessitent une phase de maturation dans le thymus

et de prolifération qui se produit dans les organes lymphoïdes secondaires (rate et nœuds lymphatiques) leur permettant une reconnaissance très spécifique des antigènes dans l'organisme. Elles permettent aussi de garder en mémoire la rencontre spécifique avec un pathogène. La communication entre ces deux systèmes est indispensable pour une régulation efficace du statut inflammatoire de l'organisme, notamment à travers la présentation de l'antigène (cf. chapitre II, 1.3) et le maintien de l'homéostasie tissulaire (Nicholson 2016; Parkin & Cohen 2001). Il existe d'autres types cellulaires intermédiaires entre ces deux lignages qui ont une morphologie de cellules du système adaptatif (lymphoïde) mais ne possèdent pas de récepteur antigéniques spécifiques tels que les Lymphocytes T $\gamma\delta$, les cellules « Natural killer T », ou les cellules lymphoïdes innées, qui jouent également des rôles importants dans la réponse immunitaire. Ces cellules de même que celles du système adaptatif ne seront pas détaillées dans ce manuscrit.

Les cellules du SI inné (Tableau 1) ou adaptatif (Tableau 2) sont bien caractérisées et sont identifiables par l'expression de marqueurs de surface et intracellulaires spécifiques détaillés dans les tableaux ci-dessous.








Cellules de l'immunité innée	
Populations cellulaires	Marqueurs de surface
 Basophiles/ Mastocytes	CD45 ⁺ , CD11b ⁺ , FcεR1 ⁺
 Eosinophiles	CD45 ⁺ , CD11b ⁺ , SiglecF ⁺
 Neutrophiles	CD45 ⁺ , CD11b ⁺ , Ly6G ⁺
 Monocytes	CD45 ⁺ , CD11b ⁺ , Ly6C ⁺
 Cellules dendritiques	CD45 ⁺ , CD11b ⁺ , CD11c ⁺ , CMHII ⁺ F4/80 ⁺
 Macrophages	CD45 ⁺ , CD11b ⁺ , F4/80 ⁺
 NK	CD45 ⁺ , NK1.1 ⁺

Tableau 1: Les cellules de l'immunité innée et leurs principaux marqueurs








Cellules de l'immunité adaptative		
Populations cellulaires	Marqueurs de surface	Sous-populations et marqueurs (intra et extra-cellulaires)
 Lymphocytes T (LT)	CD45 ⁺ , CD3 ⁺	 LT CD8 ou cytotoxique CD8 ⁺
		 LT CD4 ou helper CD4 ⁺
		 LT Th1 Tbet ⁺ , IFN γ ⁺
		 LT Th2 GATA3 ⁺ , IL4 ⁺
		 LT régulateurs FoxP3 ⁺ IL10 ⁺
 Lymphocytes B (LB)	CD45 ⁺ , CD19 ⁺ , B220 ⁺	

Tableau 2 : Les cellules de l'immunité adaptative et leurs principaux marqueurs

3. L'hématopoïèse extra-médullaire

3.1. L'hématopoïèse extra-médullaire en situation pathologique

Nous avons vu dans les chapitres précédents que l'hématopoïèse a lieu principalement dans la MO. Cependant, lors de pathologies hématologiques ou nécessitant une forte expansion des cellules immunitaires les CSH peuvent quitter la MO et rejoindre principalement le foie et la rate pour assurer le renouvellement des cellules sanguines (Yang et al. 2020; Mende & Laurenti 2021).

Des pathologies telles qu'une aplasie médullaire, une infection microbienne (Shahbazian et al. 2004), une tumeur (Wu et al. 2018), une anémie (Zhao et al. 2018) ou des stress métaboliques (cholestérol par exemple) (Westerterp et al. 2012) peuvent entraîner un dysfonctionnement de la MO, qui a pour conséquence la mobilisation des CSH et des progéniteurs dans la circulation sanguine et la colonisation d'autres organes. La plupart du temps, les sites d'hématopoïèse extra-médullaire sont le foie, la rate et les nœuds lymphatiques (Serrano-Lopez et al. 2021; Chiu et al. 2015). Cependant, certaines pathologies entraînent la relocalisation des CSH dans de multiples organes tels que l'intestin (colite), ou le cerveau (glioblastome) (Griseri et al. 2012; Lu et al. 2021). La mobilisation des CSH dans la

circulation sanguine est initiée par l'arrêt de leur rétention au sein de la MO (Lévesque et al. 2001), l'augmentation de la perméabilité des sinusoides de la MO (Zhang, Supakorndej, et al. 2019) et l'augmentation de signaux de recrutement des CSH vers des sites extra-médullaires (Katayama et al. 2006). Même si l'hématopoïèse extra-médullaire peut être une solution à court terme pour remplacer en partie l'hématopoïèse médullaire, elle entraîne cependant des complications à long terme, comme par exemple la compression des organes dans lesquels elle se développe, ce qui peut entraîner des hémorragies ou la rupture de l'organe (Yang et al. 2020).

3.2.L'hématopoïèse extra-médullaire physiologique : rôle du tissu adipeux

L'existence d'une hématopoïèse extra-médullaire physiologique a été démontrée au sein du tissu adipeux (TA) chez le mammifère adulte, remettant en cause le dogme de l'origine strictement médullaire des CSH chez l'adulte en l'absence de pathologie.

Le TA blanc est décrit comme l'organe principal du stockage des acides gras mais aussi comme un organe endocrine. C'est un tissu vascularisé et innervé, composé d'adipocytes blancs, mais également d'une fraction stroma-vasculaire. Celle-ci contient notamment des cellules stromales mésenchymateuses ou ASC (Adipose derived stromal cells) qui sont les précurseurs d'adipocytes, des cellules endothéliales, des cellules immunitaires, et une petite population de CSH (Figure 6).

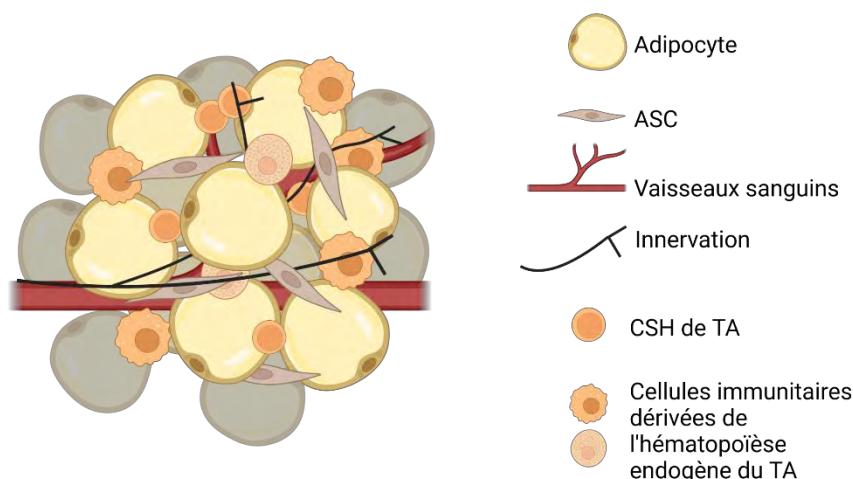


Figure 6 : La composition du TA.

Générer avec BioRender.com

Les cellules de la fraction stroma-vasculaire (SVF) du TA présentent un potentiel de régénération hématopoïétique (Cousin et al. 2003). En effet, leur injection dans des souris irradiées létalement permet la survie des animaux et la reconstitution de taux normaux de cellules sanguines circulantes, suggérant que le TA peut être une source inattendue de progéniteurs hématopoïétiques. L'activité hématopoïétique du TA repose en fait sur la présence d'une population significative de cellules souches/progénitrices hématopoïétiques, comparables à celles de la MO (Poglio et al. 2012; Han et al. 2010). Cette population qui représente chez la souris environ 1% des cellules de la fraction stroma-vasculaire du TA, existe aussi chez l'Homme, et présente les mêmes caractéristiques phénotypiques que les CSH médullaires (Lin^- , Sca1^+ et c-kit^+). Leur capacité d'auto-renouvellement a été évaluée par des expériences de greffes secondaires et leur multipotence démontrée *in vitro* et *in vivo*. Ces cellules sont en effet, capables de se différencier en cellules des lignages lymphoïde et myéloïde dans des systèmes de culture à long terme ainsi que dans des modèles de reconstitution hématopoïétique. Par la suite, cette hypothèse a été confirmée par la démonstration que le TA est un réservoir de progéniteurs mastocytaires, susceptible de générer des mastocytes matures et fonctionnels *in vitro* et *in vivo* (Poglio et al. 2010 ; Paupert et al. 2018).

Les CSH du TA sont cependant différentes de celles de la MO. En effet, dans des modèles de souris chimères transplantées avec des CSH de TA, ces cellules se différencient majoritairement en cellules de la lignée myéloïde et en cellules NK. De plus, elles reconstituent principalement les populations immunes dans le TA. En effet, on ne retrouve pas leur descendance dans le sang ou les organes hématopoïétiques (MO, rate, thymus et nœuds lymphatiques), en conditions physiologiques (Poglio et al. 2012). Cette activité hématopoïétique est présente dans les différents dépôts adipeux blancs (sous-cutané et viscéral) chez la souris. Cependant, elle est différente dans ces deux dépôts avec une activité plus faible dans les dépôts péri-gonadique et viscéral par rapport aux dépôts sous-cutanés révélant un rôle du micro-environnement adipeux dans le contrôle de cette hématopoïèse (Luche et al. 2015).

Dans le TA, le microenvironnement des CSH est composé principalement des adipocytes qui représentent les cellules fonctionnelles de ce tissu. Les adipocytes du TA sont, comme les adipocytes médullaires capables de sécréter de l'adiponectine (Nedvídková et al. 2005), on

peut donc envisager qu'ils permettent la différenciation des CSH du TA. En plus de l'adiponectine, les adipocytes du TA sont connus pour avoir une forte activité sécrétoire (leptine, apeline, adrénomédulline, cortisol, angiotensinogène...) (Wang et al. 2008) qui pourraient également agir sur les CSH et leur différenciation. En outre, comme dans la MO, il pourrait exister dans le TA des niches particulières bien que cela n'ait à ce jour pas été décrit. La présence de cellules endothéliales organisées sous forme de vaisseaux sanguins dans le TA pourrait représenter comme dans la MO des niches vasculaires. Cependant aucune étude n'a montré que les CSH du TA se trouvent à proximité de ces vaisseaux et ne s'est intéressé à l'influence des cellules endothéliales sur les CSH du TA.

Les ASC représentent 40% de la SVF du TA chez la souris ce qui représente beaucoup plus que les CSM dans la MO (0,1%) (Strioga et al. 2012; Prunet-Marcassus et al. 2006). L'effet des ASC sur les CSH de MO a été bien étudié. En effet, la co-culture des ASC avec des CSH médullaires *in vitro* permet une expansion et une prolifération des CSH plus importantes que celles observées dans une co-culture avec des CSM médullaires (De Toni et al. 2011; Nakao et al. 2010; Andreeva et al. 2018). *In vivo* la co-transplantation en série de CSH médullaires et d'ASC en comparaison à une simple transplantation de CSH améliore la vitesse de reconstitution du système sanguin et la prise de greffes secondaires et tertiaires, ce qui prouve l'effet régulateur des ASC à la fois sur la survie et la différenciation des CSH (Fernández-García et al. 2015; Zhang et al. 2016). De plus, les ASC peuvent produire du G-CSF, du GM-CSF et du M-CSF, facteurs indispensables à la différenciation des CSH vers le lignage myéloïde et ceci en plus grande quantité que les adipocytes (Kapur & Katz 2013; Kilroy et al. 2007; Corre et al. 2006).

L'ensemble de ces résultats montre que le TA est une niche à part entière dont les différents composants peuvent permettre le maintien, la survie et la différenciation des CSH. Cette niche pourrait contribuer aux modifications des CSH du TA observées dans des conditions pathologiques telles que le diabète.

En effet, le diabète et l'obésité s'accompagnent de modifications métaboliques notamment dans le TA. On observe ainsi une hypertrophie et une hyperplasie adipocytaires, qui s'accompagnent de l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Frohnert & Bernlohr 2013), mais aussi des modifications du profil sécrétoire des ASC qui deviennent pro-inflammatoires (Acar et al. 2020). Ceci contribue à générer un

environnement pro-inflammatoire, qui, à terme entraîne la fibrose du TA. Ces modifications du microenvironnement pourraient être à l'origine de l'orientation de la différenciation des CSH du TA vers des cellules myéloïde sécrétrices de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- α décrites chez le sujet obèse ou diabétique (Fuster et al. 2016; Karina et al. 2020). Cela pourrait également expliquer les résultats obtenus au laboratoire dans lesquels la transplantation de CSH du TA de souris diabétiques chez des souris saines nourries avec un régime normal suffit à augmenter le nombre de macrophages pro-inflammatoires dans le TA et rendre les souris receveuses diabétiques. Ces résultats montrent que l'environnement modifie les propriétés intrinsèque des CSH du TA, ce qui modifie l'environnement dans lequel elles sont implantées (Luche et al. 2017).

L'ensemble de ces données de la littérature démontre que l'hématopoïèse est un processus complexe débutant dès l'embryogenèse et se poursuivant à l'âge adulte dont l'ensemble des mécanismes n'a pas encore été élucidé. Elle est contrôlée par de multiples acteurs (cellulaires, matriciels et solubles) qui permettent le maintien et la différenciation des CSH afin de garantir la production des cellules sanguines qui sont des acteurs indispensables au fonctionnement de l'organisme. La dérégulation de ce processus conduit à l'apparition de pathologies. La découverte d'une hématopoïèse extra-médullaire au sein du tissu adipeux complexifie encore ce processus et interroge sur la contribution des cellules qui en résultent, en particulier les macrophages, au maintien de l'homéostasie de l'organisme.

Chapitre II : Les macrophages, des cellules sentinelles indispensables au maintien de l'homéostasie tissulaire

Les macrophages littéralement « gros mangeurs » ont initialement été décrits pour leur capacité de phagocytose, c'est-à-dire l'ingestion de particules après une exposition à un pathogène ou à des dommages cellulaires non spécifiques. C'est Elie Metchnikov au XIX^{ème} siècle qui les décrit de la sorte, au départ dans des organismes primitifs puis chez les vertébrés. Il est le premier à mettre en évidence qu'il existe au sein des tissus des cellules impliquées non seulement dans le contrôle de l'homéostasie grâce à leur fonction de résorption tissulaire, mais aussi dans la défense de l'organisme contre les « envahisseurs ». Il remarque une certaine hétérogénéité de la phagocytose en fonction du corps « ingéré » mais aussi en fonction de la localisation tissulaire des cellules (Metchnikoff 1892). Il faudra attendre un siècle avant de connaître les mécanismes moléculaires impliqués dans cette hétérogénéité. Les études de Metchnikov sont à l'origine de toutes les observations futures sur les macrophages qui sont des acteurs clés de l'immunité innée et sont présents dans la totalité des tissus de l'organisme. Ils jouent un rôle de sentinelles en intégrant les signaux de leur environnement, en adaptant leurs réponses à ces signaux et en relayant ces informations aux autres cellules de l'immunité innée et adaptative afin de maintenir l'homéostasie tissulaire.

1. Fonctions générales des macrophages

Le rôle central des macrophages dans le contrôle de l'homéostasie tissulaire et comme sentinelle de l'organisme est lié à leurs trois fonctions principales : la phagocytose, la sécrétion de médiateurs et la présentation de l'antigène. Ces trois fonctions font de ces cellules une des premières lignes de défense de l'organisme.

1.1. La phagocytose

1.1.1. Mécanisme général

La phagocytose est un processus conservé au cours de l'évolution. Chez les organismes multicellulaires, elle est décrite comme permettant la reconnaissance et l'intégration de

particules supérieures à 0.5µm. Les phagocytes « professionnels » (macrophages, cellules dendritiques, monocytes, neutrophiles) sont capables de reconnaître et d'ingérer des micro-organismes pathogènes mais également des débris cellulaires et des cellules apoptotiques (on parle alors d'efférocytose). A travers ce processus, les macrophages permettent donc la défense de l'organisme contre les pathogènes mais aussi le maintien de l'homéostasie tissulaire en participant à la fois à l'organogenèse lors du développement embryonnaire et au remodelage tissulaire adulte.

La phagocytose est subdivisée en trois phases (Uribe-Querol & Rosales 2020; Underhill & Goodridge 2012; Gordon 2016) (Figure 7) :

- La reconnaissance de particules grâce à des récepteurs de surface ou cytosoliques dans le cas où les particules passent la membrane plasmique (détaillé ci-dessous)
- L'activation de ces récepteurs entraîne l'internalisation des particules grâce à un remodelage membranaire permettant la formation du phagosome
- La dégradation des particules : la fusion du phagosome avec le lysosome créant le phagolysosome dont le pH acide, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les enzymes lysosomales hydrolytiques entraînent la dégradation des particules.

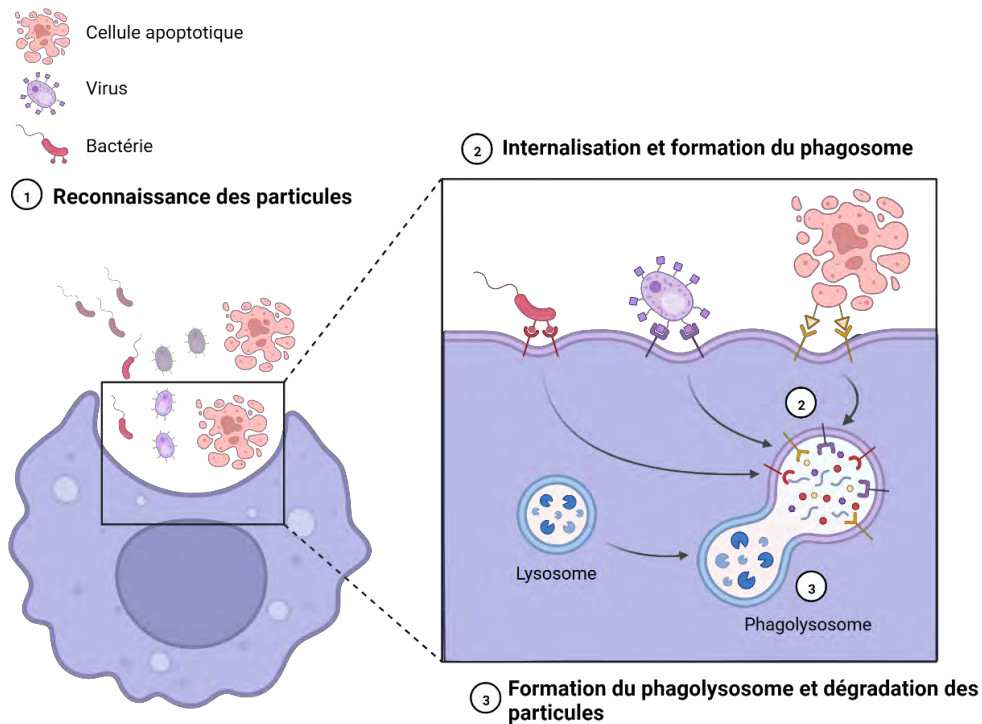


Figure 7 : Les étapes de la phagocytose.

Après une étape de reconnaissance les macrophages internalisent les particules (bactéries, virus, et corps apoptotiques) dans le phagosome. Ce dernier fusionne avec le lysosome formant le phagolysosome menant à l'élimination des particules. (Murphy 2012) Générer avec BioRender.com

1.1.2. Un large panel de récepteurs pour la reconnaissance des dangers

Les macrophages, grâce à l'expression d'un grand nombre de récepteurs extracellulaires et intracellulaires sont capables de reconnaître une grande variété de signaux. On classe ces signaux en deux grandes catégories : les PAMP pour « Pathogen-Associated Molecular Patterns » qui regroupent les molécules issues de pathogènes (bactéries, champignons, levures) et les DAMP pour « Damage-Associated Molecular Patterns » qui regroupent les signaux de lésion tissulaire et cellulaire (apoptose, nécrose, stress) (Tang et al. 2012).

Les macrophages expriment un éventail de récepteurs leur permettant la reconnaissance de ces différents types de signaux, leur intégration de manière spécifique et ainsi une réaction spécifique et adaptée.

Parmi ces récepteurs on distingue trois grands groupes : les récepteurs aux opsonines, les PRR « Pattern Recognition Receptor » et les récepteurs scavenger (Underhill & Goodridge 2012).

1.1.2.1. *Les récepteurs aux opsonines*

Les récepteurs aux opsonines reconnaissent des molécules dérivant de l'hôte ou opsonines (anticorps, complément, fibronectine, lectine). Les opsonines (anticorps et complément) sont produites par les cellules plasmiques, les cellules de l'immunité innée (monocytes, mastocytes, macrophages, cellules NK) et adaptative (LT), mais aussi par les hépatocytes et les cellules endothéliales. Elles circulent dans le sang et se lient à la membrane des cellules cibles à phagocytter via leur reconnaissance des molécules du « non-soi » (Lubbers et al. 2017; Thau et al. 2022). Parmi les récepteurs aux opsonines on compte deux grands types : les récepteurs au complément et les récepteurs du fragment constant (FcR) des Immunoglobulines (Ig) (García-García & Rosales 2002).

Les FcR peuvent reconnaître les Ig de type A, G ou E respectivement Fc α R, Fc γ R et Fc ϵ R. Les plus étudiés dans le processus de phagocytose chez la souris sont les Fc γ R. Ces derniers sont subdivisés en plusieurs groupes, ceux exprimant dans leur partie cytosolique le domaine ITAM, et ceux exprimant le domaine ITIM. Les Fc γ R associés au domaine ITAM stimulent la phagocytose alors que ceux associés au domaine ITIM entraînent l'inhibition de la phagocytose (Bournazos et al. 2020).

Les récepteurs au complément permettent la reconnaissance des opsonines C1q, C3b et C4b. Il existe quatre récepteurs différents : CR1, CR3, CR4 et CRig. Le CR1 (ou CD35) permet la reconnaissance des fragments C1q, C3b et C4b. Le CR3 formé du complexe CD11b/CD18 et le CR4 formé du complexe CD11c/CD18 font partie de la famille des intégrines et peuvent fixer le C3b et ses produits de clivage mais aussi des produits de la matrice extracellulaire. Le CRig est spécifique de certains macrophages résidents (cellules de Kupffer dans le foie et macrophages cardiaques notamment) et permet la clairance des antigènes opsonisés avec le C3b (Van Lookeren Campagne et al. 2007; Freeman & Grinstein 2014).

L'activation de ces récepteurs par reconnaissance des IgG ou du complément induit l'internalisation des pathogènes pour rejoindre la voie de phagocytose (Acharya et al. 2020).

1.1.2.2. *Les Pathogen Recognition Receptor (PRR)*

Les PRR sont des récepteurs exprimés par les cellules de l'immunité innée impliqués dans la phagocytose et l'activation de la réponse inflammatoire. Ils permettent la détection des

motifs hautement conservés exprimés par la plupart des microbes, et de motifs du « soi » (cellules apoptotiques, nécrotiques ou signaux de stress). Ils sont subdivisés en 4 sous-types : Les TLR (Toll Like Receptors), les CLR (C-type Lectin Receptors), les RLR (RIG-I-Like Receptors) et les NLR (NOD-Like Receptors) (Lee & Kim 2007).

Les TLR sont des récepteurs transmembranaires dont les parties extracellulaires reconnaissent différents pathogènes. La partie intracellulaire active les voies de signalisation spécifiques du ligand pour entraîner la réponse cellulaire adéquate, cette réponse est dépendante de l'origine du ligand fixé et de la catégorie de TLR. On dénombre 12 TLR différents chez la souris qui sont impliqués dans la reconnaissance de multiples pathogènes : virus, bactéries, protozoaires, champignons (Tableau 3). Les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6 sont localisés sur la membrane plasmique et reconnaissent principalement des motifs bactériens mais aussi des signaux de dommages cellulaires (y compris de cellules du « soi »). Les TLR3, TLR7 et TLR9 sont exprimés au niveau de la membrane de vésicules intracellulaires et permettent la reconnaissance d'acides nucléiques bactériens ou viraux (Imani Fooladi et al. 2011; Takeuchi & Akira 2010).

Récepteur	Localisation	Ligand	Origine du ligand
TLR1	Membrane plasmique	Triacetyl lipopeptides et facteurs solubles	Bactéries et mycobactéries
TLR2	Membrane plasmique	HSP70, Peptidoglycane, Lipoprotéine, HCV	Hôte, bactéries Gram+, Virus
TLR3	Endolysosome	ARN double brin	Virus
TLR4	Membrane plasmique	LPS, protéines enveloppe, taxol	Bactéries Gram-, virus, hôte, champignon
TLR5	Membrane plasmique	Flagelline	Bactéries
TLR6	Membrane plasmique	Zymozan, acide lipotechoïque, lipopetides diacyl, Facteur soluble de Tuberculosis, OsPA	Champignons, Bactéries Gram+, Mycoplasme
TLR7	Endolysosome	ARN simple brin	Virus, Bactéries, Hôte
TLR9	Endolysosome	ADN CpG	Virus, Bactéries, Protozoaires, Hôte

Tableau 3 : Les principaux TLR exprimés par les macrophages murins, leurs ligands et leurs localisations (inspiré de (Takeuchi & Akira 2010; Imani Fooladi et al. 2011))

Les CLR sont majoritairement transmembranaires et sont impliqués dans la communication et l'adhésion cellulaires mais aussi dans la reconnaissance des PAMP et des DAMP. En effet, ils possèdent un domaine de reconnaissance des hydrates de carbone (sucres) leur permettant de reconnaître les virus, les bactéries et les champignons mais aussi des signaux de mort cellulaire. On compte aujourd'hui plus de mille CLR différents classés en 17 sous-types dans différents types cellulaires, selon la morphologie de leurs domaines et leurs fonctions. Les populations myéloïdes expriment principalement des CLR de type II, V et VI (Hoving et al. 2014) (Tableau 4). Par exemple, le CD209 (ou DC-SIGN), Dectine-2 et MINCLE appartiennent aux CLR de type II, sont dépendants du calcium et sont particulièrement impliqués dans la reconnaissance des motifs sucrés de la paroi des levures, champignons,

bactéries et virus. Dectine-1 est un récepteur de type V impliqué dans la reconnaissance de pathogènes (Levures, champignons, bactéries) mais aussi de cellules apoptotiques. Enfin parmi les récepteurs de type VI, le plus étudié est le CD206 (ou récepteur mannose) qui reconnaît les domaines mannose et fucose des levures, virus et bactéries mais aussi les cellules apoptotiques (Sancho & Reis e Sousa 2012; Li & Wu 2021).

Type	Nom du récepteur	Ligand	Origine du ligand
II	CD209a ou DC-SIGN	Mannose et Fucose	Virus, Bactéries, Levure, Hôte
	Dectine-2	Mannose et Mannane	Virus, Levure, Hôte
	MINCLE	Mannose, glycolipides	Virus, Levure, hôte
V	Dectine-1	β -glucanes	Bactéries, Levures, Champignons, Hôtes
VI	CD206 ou MR	Mannose, Fucose, N-acetylglucosamine	Virus, Levures, Bactéries, Hôtes

Tableau 4 : Quelques CLR exprimés par les macrophages murins, leurs ligands et l'origine de leurs ligands (inspiré de (Sancho & Reis e Sousa 2012))

Les RLR pour « RIG-I-Like Receptor » sont des récepteurs cytosoliques permettant la reconnaissance des ARN et des ADN viraux. Ils possèdent un domaine hélicase permettant l'ouverture des acides nucléiques de manière ATP dépendante (Kawai & Akira 2009; Rehwinkel & Gack 2020).

Les NLR pour « NOD-like Receptor » sont également des récepteurs cytosoliques capables de reconnaître des protéines de la paroi bactérienne grâce à leur domaine NATCH central (Kawai & Akira 2009).

1.1.2.3. Les récepteurs scavenger

En plus de ces PRR on distingue une famille de récepteurs présents à la surface des macrophages qui jouent un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie tissulaire : les récepteurs scavenger. Ils ne sont pas classés parmi les PRR car ils ont été historiquement

décrits comme permettant uniquement l'internalisation des lipoprotéines oxydées à faible densité (oxLDL). On sait aujourd'hui que leur rôle est bien plus vaste car ils ont la capacité de reconnaître des DAMP (les lipides oxydés, les cellules apoptotiques) mais certains sont aussi capables de reconnaître des pathogènes, ils pourraient donc intégrer la famille des PRR. Parmi les plus connus, on compte les récepteurs CD36, MerTK, MARCO et TIM-4 indispensables à la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques (Canton et al. 2013 ; Taban et al. 2022).

La diversité de ces récepteurs, leur redondance et leur activité permet une lutte active contre les dommages tissulaires initiés par des micro-organismes ou par des atteintes tissulaires. En effet, l'internalisation de ces récepteurs et l'élimination des particules qui s'y sont fixées permettent non seulement leur élimination par la phagocytose mais aussi l'initiation de la réponse inflammatoire par la production de médiateurs de l'inflammation.

1.2. La sécrétion de médiateurs de l'inflammation

1.2.1. Les médiateurs de l'inflammation

Les macrophages sont les cellules sécrétrices de l'organisme parmi les plus actives. Les principaux médiateurs de l'inflammation produits par les macrophages sont subdivisés en différentes grandes familles que sont : les cytokines, les chimiokines, les médiateurs lipidiques et les espèces réactives de l'oxygène et réactives de l'azote (ROS et RNS).

Les cytokines sont une famille de protéines à activité paracrine et autocrine permettant la régulation de l'inflammation via la régulation positive ou négative de l'expression de gènes ou facteurs de transcription. Leurs actions cellulaires sont diverses, elles peuvent entraîner la production d'autres médiateurs de l'inflammation par l'activation des récepteurs aux cytokines, moduler l'expression de récepteurs de surface à la membrane de différents types cellulaires, entraîner la prolifération de cellules stromales ou immunitaires, activer des cellules du système immunitaire. Elles sont subdivisées en plusieurs types : les interleukines (IL), les facteurs de stimulation des colonies (CSF), les facteurs de croissances (GF) et les facteurs de nécrose tumorale (TNF). Les différentes cytokines ont des fonctions redondantes faisant de la défense immunitaire un système

robuste (Mosser et al. 2021). Elles peuvent être pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires (détaillé dans le chapitre II – 2.1.).

Les chimiokines sont des molécules sécrétées qui ont un pouvoir d'attraction. Elles peuvent ainsi diriger la migration cellulaire d'autres cellules immunitaires pour renforcer la réponse inflammatoire. Elles peuvent également attirer des cellules non immunes qui pourront se différencier pour remplacer des cellules mortes au sein des tissus. Elles sont divisées en quatre groupes en fonction de leur conformation moléculaire (C, CXC, CC et CX3C) (Mosser et al. 2021).

Les médiateurs lipidiques dérivent de l'hydrolyse de l'acide arachidonique (Figure 8). Ils peuvent moduler la réponse inflammatoire par leur nature pro- ou anti-inflammatoire. On distingue deux grandes voies de production des médiateurs lipidiques : la voie des cyclooxygénases (COX) et la voie des lipoxygénases (LOX) qui permettent la production respectivement de prostaglandines et leucotriènes/lipoxines (Harizi et al. 2008). Parmi les prostaglandines on retrouve les prostaglandines E₂ et I₂ (PGE₂ et PGI₂), impliquées dans la vasodilatation, la sensibilité à la douleur et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Reader et al. 2011). A l'inverse, la prostaglandine D₂ (PGD₂) issue également de la voie des COX est plutôt anti-inflammatoire et favorise le recrutement des lymphocytes Th2 (Matsuoka et al. 2000). Le principal leucotriène produit est le leucotriène B₄ (LTB₄) impliqué dans la production de ROS et de cytokines pro-inflammatoires (Brain & Williams 1990). A l'inverse, les lipoxines A₄ et B₄ (LXA₄ et B₄) issues également de la voie des LOX ont des propriétés anti-inflammatoires en inhibant la production de ROS, la production de chimiokines et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Chandrasekharan & Sharma-Walia 2015).

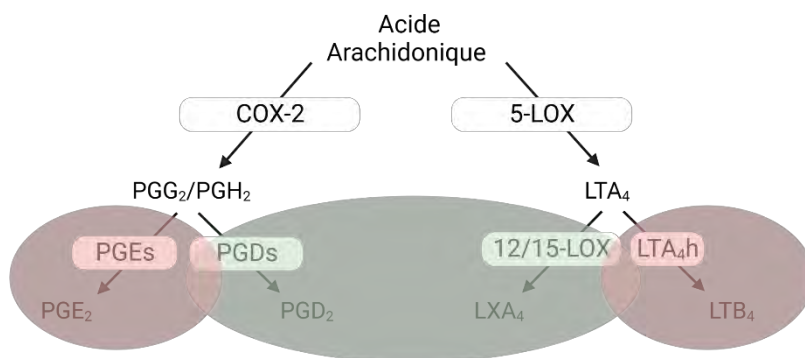


Figure 8 : La voie de l'hydrolyse de l'acide arachidonique.

(Rouge : action pro-inflammatoire ; Vert : action anti-inflammatoire). Inspiré de (Su & O'Connor 2013)

Enfin, la production de ROS est dépendante de la NADPH oxydase située au niveau de la membrane plasmique ou mitochondriale. Les macrophages produisent principalement l' O_2^- et l' H_2O_2 . Les RNS sont produits grâce à l'action de l'oxyde nitrique synthase inducible (iNOS) qui entraîne la production d'oxyde nitrique (NO) (Laskin et al. 2010). Ces médiateurs jouent un rôle important dans la lutte contre l'invasion par les microorganismes mais également dans la régulation de la réponse inflammatoire par l'activation ou l'inhibition de voies de signalisation (IKK, AMPK), ou de facteurs de transcription (NFkB, HIF), ainsi qu'en étant à l'origine de mutations de l'ADN (Canton et al. 2021; Nathan & Cunningham-Bussell 2013).

L'ensemble de ces médiateurs de l'inflammation agit de manière paracrine sur les différents types cellulaires présents à proximité mais aussi de manière autocrine.

1.2.2. Principales voies de signalisation permettant le contrôle de la synthèse des médiateurs de l'inflammation

Outre leur rôle dans la phagocytose des PAMP et des DAMP, les différents récepteurs présentés ci-dessus (chapitre II- 1.1.2) activent de nombreuses voies de signalisation permettant l'activation de facteurs de transcription et la sécrétion des médiateurs de l'inflammation.

Les principales voies de signalisation activées par les TLR passent par le recrutement des adaptateurs MyD88, TRAM et TRIF qui permettent le recrutement et l'activation des facteurs de transcription NFkB, IRF 3 et 7 (Alexopoulou et al. 2012) (Figure 9). Les NLR quant à eux agissent principalement par l'inflammasome qui est un complexe composé d'un NLR, d'une protéine adaptatrice et d'une pro-caspase. L'activation des NLR entraîne le clivage de la pro-caspase I en caspase I qui agit directement sur le clivage de cytokines (notamment du pro-IL-1 β en IL-1 β) et les active (Figure 9) (Xu et al. 2019). Les RLR activent les complexes IKK (IkB Kinase) permettant l'activation des facteurs de transcription NFkB et IRF3 et 7 (Rehwinkel & Gack 2020). Les CLR ont des voies de signalisation très diverses, MAP kinsase, IKK, phospholipases... ce qui leur permet d'activer une multitude de facteurs de transcription tels que AP-1, NFkB... (Sancho & Reis e Sousa 2012) (Figure 9)

Il existe autant de médiateurs de l'inflammation que de récepteurs mais les principales voies de signalisation activées à la suite de la fixation d'un médiateur de l'inflammation sur son

récepteur sont globalement les mêmes que celles activées par les PRR. Elles permettent aussi l'activation des voies JAK/STAT. Ainsi, l'IFN- γ active le facteur de transcription STAT1 alors que l'IL-10 ou l'IL-4 activent les facteurs de transcription STAT3 et 6 respectivement (Sica & Mantovani 2012) (Figure 9).

Les facteurs de transcription activés permettent à leur tour la production de médiateurs pro- ou anti-inflammatoires. Ainsi on accorde un rôle plutôt pro-inflammatoire aux facteurs de transcription NF κ B p50/65, AP1 IRF 3 et 7, STAT 1 et anti-inflammatoire aux facteurs de transcription NF κ B p50/50 STAT 6 et 3, (Liu et al. 2014; Kadomoto et al. 2022).

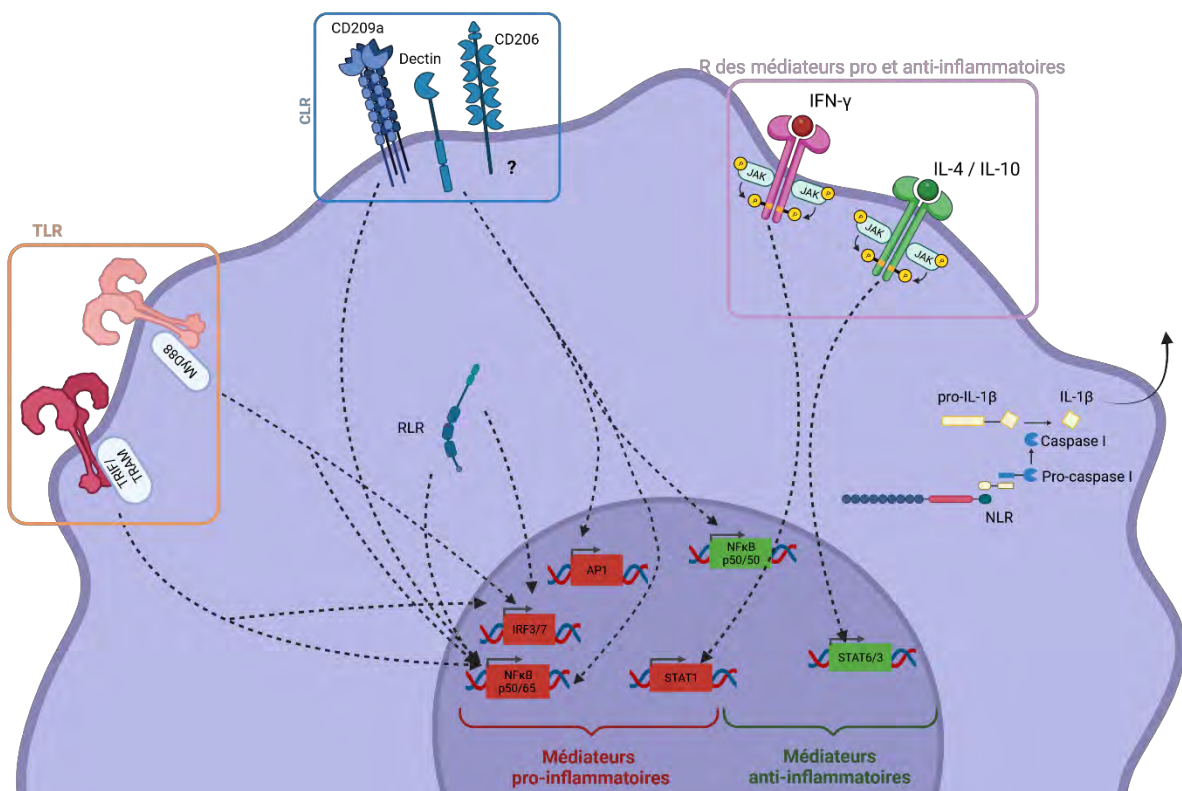


Figure 9 : Les principaux facteurs de transcription activés par la fixation de ligands sur les PRR et les récepteurs des médiateurs de l'inflammation.

Inspiré de (Sancho & Reis e Sousa 2012; Sica & Mantovani 2012; Kadomoto et al. 2022; Alexopoulou et al. 2012; Xu et al. 2019; Rehwinkel & Gack 2020; Liu et al. 2014). Généré avec BioRender.com

1.3. La présentation de l'antigène

Les macrophages sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. Elles expriment non seulement des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH-I) exprimé par la plupart des cellules nucléées et impliqué dans l'activation des LT CD8

mais aussi le CMH de classe II (CMH-II) impliqué dans l'activation des LT CD4. C'est l'expression du CMH-II qui en fait des cellules professionnelles de la présentation d'antigène. Dès lors que du matériel (bactérien, viral, du soi...) est intégré dans le phagolysosome il est digéré en peptides/antigènes (via le processus de phagocytose présenté ci-dessus). Bien qu'une grande partie soit éliminée par voie d'exocytose, certains antigènes sont associés aux molécules du CMH-II et sont transportés à la membrane du macrophage. Ces antigènes sont ensuite présentés aux lymphocytes T CD4 soit au niveau du tissu dans lequel ils ont rencontré l'antigène, soit en transitant par la lymphe jusqu'aux nœuds lymphatiques. La présentation de l'antigène aux LTCD4 entraîne leur polarisation vers un phénotype Th1 ou Th2 (Roche & Furuta 2015) (Figure 10).

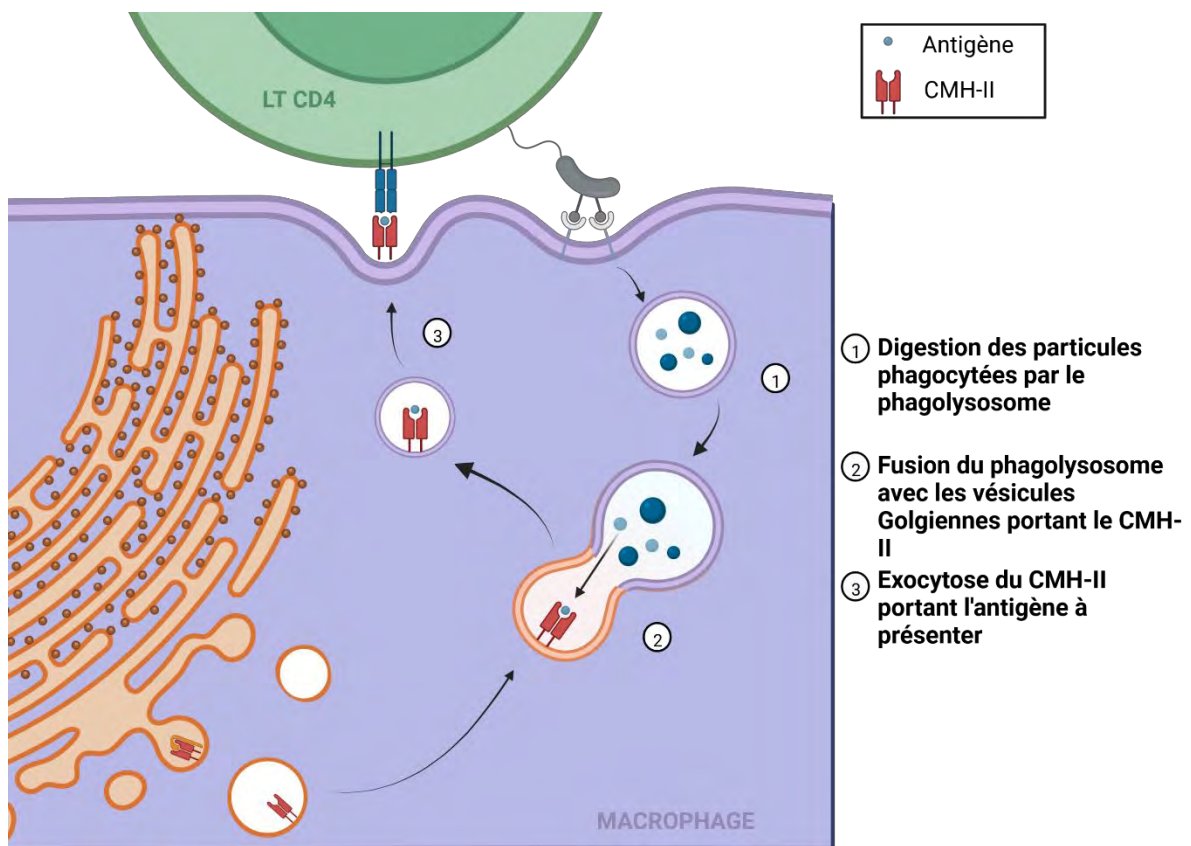


Figure 10 : La présentation de l'antigène par les macrophages.

Après reconnaissance et digestion des particules à phagocyter dans le phagolysosome, celui-ci fusionne avec des vésicules Golgiennes portant le CMH-II. Le CMH-II portant l'antigène à présenter est exocyté et présenté aux lymphocytes T CD4. Inspiré de (Roche & Furuta 2015). Généré avec BioRender.com

2. Les macrophages : des cellules hétérogènes

Malgré des propriétés générales communes, les macrophages n'en demeurent pas moins une population cellulaire très hétérogène. Leur hétérogénéité provient, d'une part, de leurs propriétés fonctionnelles. En effet, l'expression des divers récepteurs (membranaires et cytosoliques) et la production de médiateurs de l'inflammation résultant de l'activation de ces récepteurs en font des cellules pouvant adopter de multiples phénotypes. Cette hétérogénéité est d'autant plus importante que ces cellules sont éminemment plastiques en s'adaptant en permanence à leur environnement. D'autre part, leur hétérogénéité provient de leur origine qui leur procurera des caractéristiques intrinsèques spécifiques. Ainsi, les macrophages résidents sont plutôt impliqués dans l'homéostasie tissulaire et les macrophages dérivés des monocytes plutôt impliqués dans la réponse inflammatoire. Même lorsque les monocytes infiltreront les tissus et se différencieront en macrophages, ils ne sont pas toujours capables d'acquiescer toutes les caractéristiques des macrophages résidents (Locati et al. 2020).

2.1. Hétérogénéité fonctionnelle : la polarisation des macrophages

Classiquement, dans les années 2000 les macrophages ont été décrits comme des cellules capables de se polariser de manière binaire vers un phénotype pro-inflammatoire (macrophages « M1 ») ou anti-inflammatoire (macrophages « M2 ») (Mills et al. 2000). Cette classification repose sur le concept Th1 versus Th2 introduit en 1986 (Mosmann et al. 1986). Ainsi, Mills et ses collègues observent que des macrophages isolés à partir de différentes souches de souris (Balb/c vs C57Bl/6) répondent de manière divergente aux mêmes molécules (LPS et IFN- γ). Chez la souris Balb/c caractérisée par un contexte plutôt anti-inflammatoire (Th2), les macrophages stimulés par le LPS et l'IFN- γ maintiennent une production de cytokines anti-inflammatoires (TGF- β) et l'expression de l'arginase, ce qui n'est pas le cas chez les souris C57Bl/6 qui présentent un contexte plutôt pro-inflammatoire. Ce concept a été fusionné avec les observations de Gordon en 1992 qui décrivaient des macrophages classiquement activés grâce à l'IFN- γ et alternativement activés grâce à l'IL-4. Ces deux types de macrophages présentent un phénotype différent notamment une

augmentation de l'expression des récepteurs mannose et une réduction de la production des cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages stimulés à l'IL-4 (Stein et al. 1992). Même si cette caractérisation *in vitro* reste très utilisée et permet d'évaluer les capacités de polarisation des macrophages, elle est biaisée par le système de culture et ne reflète pas la capacité des macrophages à exprimer une multitude de facteurs pro- et anti-inflammatoires de manière simultanée *in vivo*. *In vivo*, la polarisation des macrophages est en effet contrôlée au moins en partie par l'environnement qui est modifié en permanence et dont les signaux à un instant *t* sont multiples. Chaque environnement possède donc un mélange de macrophage dont le phénotype oscille entre polarisation pro- et anti-inflammatoire en passant par tout un spectre non linéaire de polarisation (Murray 2016; Edholm et al. 2017) (Figure 11). *In vivo*, les deux extrêmes de polarisation n'existent pas au sein des tissus et ne permettent pas d'expliquer l'ensemble des capacités des macrophages à orienter le statut inflammatoire des tissus. En outre, réduire le rôle des macrophages à une expression de marqueurs de l'inflammation ne permet pas de décrire l'étendue de leurs activités. Il serait donc peut être plus juste de les caractériser par leurs fonctions qui pourraient apparaître, disparaître ou même coexister au sein de la même cellule (Nahrendorf & Swirski 2016).

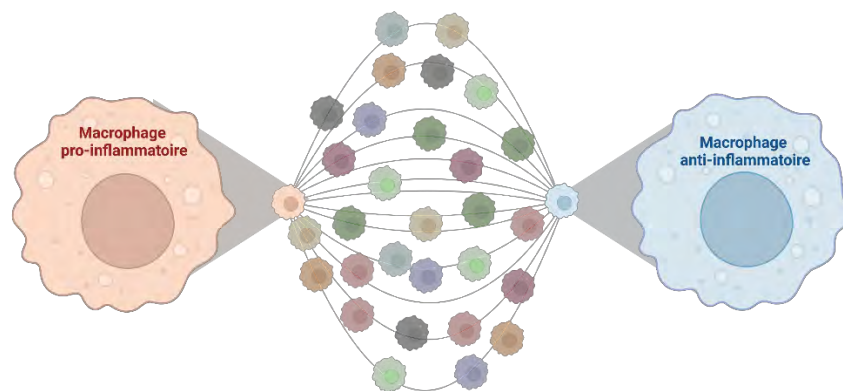


Figure 11 : Spectre de polarisation des macrophages

Les tissus contiennent une population hétérogène de macrophages composés en réalité d'un mélange de différents états de polarisation dépendant de l'environnement. L'existence *in vivo* de macrophages pro- ou anti-inflammatoires tels que définis *in vitro* est très controversée à ce jour. Inspiré de (Murray 2016; Edholm et al. 2017). Généré avec BioRender.com

Cependant, ces extrêmes de polarisation sont toujours utiles *in vitro* et permettent de caractériser les capacités de shift des macrophages vers un phénotype pro ou anti-inflammatoire. Dans le but de simplifier la plasticité des macrophages nous allons décrire les

deux extrêmes de polarisation qui sont observées *in vitro* : le macrophage pro-inflammatoire et le macrophage anti-inflammatoire (Figure 12).

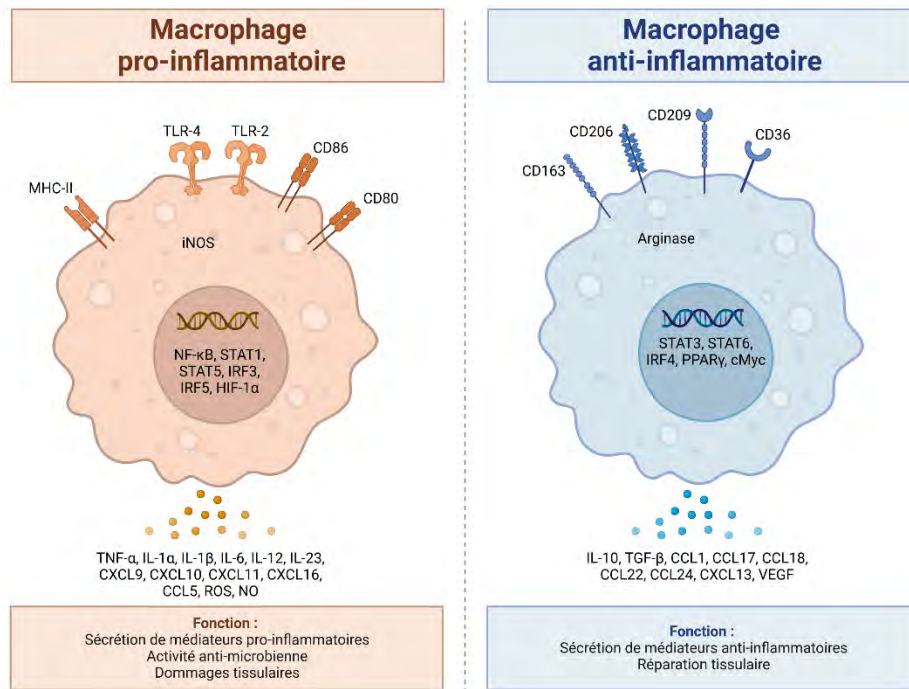


Figure 12 : Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des polarisations pro- et anti-inflammatoires des macrophages *in vitro*.

Inspiré de (Yao et al. 2019). Généré avec BioRender.com

La polarisation pro-inflammatoire apparaît en réponse au TNF-α, à l'IFNγ et/ou au LPS. L'action de ces médiateurs sur les macrophages entraîne l'activation des facteurs de transcription NF-κB, STAT-1 et 5, IRF3 et 5 et HIF-1α, qui est à l'origine des modifications métaboliques observées au sein des macrophages pro-inflammatoires. En effet, HIF-1α est impliqué dans la conversion de la 6-fructose-2-kinase en un isoforme plus actif qui entraîne l'accumulation du fructose-2 biphosphate. Ce dernier induit alors une pression sur l'utilisation du flux glycolytique rendant les macrophages dépendants de la respiration glycolytique (Rodríguez-Prados et al. 2010). L'activation des facteurs de transcription entraîne également la production de ROS et l'expression de la iNOS permettant la production de NO (Galván-Peña & O'Neill 2014), et la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12, l'IL-1β, l'IL-18, l'IL-23, l'IL-6 et le TNF-α, de chimiokines CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL16 et CCL5 et la surexpression des récepteurs TLR-4 et 2, CD80, CD86 et CMH-II à leur membrane (Yao et al. 2019; Lee 2019). Ces macrophages pro-inflammatoires jouent un rôle

essentiel dans la défense de l'organisme contre les pathogènes et les cellules tumorales, en initiant et en soutenant l'inflammation (Figure 11).

La polarisation anti-inflammatoire apparaît quant à elle en réponse à l'IL-4 et l'IL-13. Ces cytokines induisent l'expression des facteurs de transcription STAT3 et 6, PPAR γ et cMyc. L'augmentation de l'expression de ces facteurs participe à la mise en place d'un métabolisme aérobie via la phosphorylation oxydative ainsi que la production de l'arginase une enzyme impliquée dans la production des composés du collagène (Munder et al. 1999; Galván-Peña & O'Neill 2014). L'activation de ces facteurs de transcription entraîne également l'augmentation de l'expression des récepteurs mannose CD206 et CD209a (Stein et al. 1992) et des récepteurs scavenger tels que CD36 (Ferracini et al. 2013). De plus, les macrophages anti-inflammatoires produisent des chimiokines telles que CCL1, CCL17, CCL18, CCL22, CCL24 et CXCL13 mais aussi des cytokines comme le TGF- β , le VEGF et l'IL-10, ce qui leur confère une action immunosuppressive et pro-angiogénique, et les implique plutôt dans la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire (Cassetta et al. 2011; Yao et al. 2019) (Figure 11).

L'immuno-métabolisme est de plus en plus étudié pour caractériser les macrophages. Non seulement ce métabolisme fournit l'énergie nécessaire à l'activité des cellules immunitaires, mais il peut également orienter les fonctions de ces cellules à travers le contrôle d'évènements transcriptionnels et post-transcriptionnels. In vitro, les macrophages présentent une très grande plasticité métabolique. Ainsi, une stimulation pro-inflammatoire (LPS, IFN- γ) entraîne une augmentation de la glycolyse via l'augmentation de l'absorption de glucose. Celle-ci s'accompagne de ruptures dans le cycle de Krebs entraînant l'accumulation de citrate et de succinate (Jha et al. 2015; Lauterbach et al. 2019). Le citrate converti en acétyl-coenzyme A permet la transcription de gènes pro-inflammatoires par modification épigénétique puis sert de substrat pour la synthèse des acides gras (Wellen et al. 2009). Le succinate entraîne la stabilisation du facteur de transcription HIF-1 α (qui entraîne la production d'IL-1 β (Tannahill et al. 2013) et la production de NO participant au maintien du statut pro-inflammatoire du macrophage (Peyssonnaud et al. 2005). La production de NO entraîne la diminution de la respiration mitochondriale participant ainsi au maintien du métabolisme glycolytique (Van den Bossche et al. 2016) (Figure 13, gauche). En revanche, les stimulations anti-inflammatoires de macrophages non polarisés n'ont pas d'effet majeur sur

leur métabolisme (Figure 13, droite). Ces macrophages anti-inflammatoires sont caractérisés par une augmentation de la respiration mitochondriale, une production de cytokines anti-inflammatoires et une forte expression de l'arginase-1 (cf. chapitre II 2.1 et chapitre III 2.2). Ils utilisent la glutamine pour alimenter le cycle de Krebs, et l'oxydation des acides gras permet la production de NADPH, H⁺ qui alimente la phosphorylation oxydative (Wang et al. 2018; Huang et al. 2014). L'endocytose de lipides exogènes grâce à l'expression de CD36, et l'augmentation de l'activité de la synthèse des acides gras induisent une augmentation de l'oxydation des acides gras et la biogenèse mitochondriale menant à l'augmentation du taux de consommation d'oxygène (Huang et al. 2014). Le métabolisme de la glutamine entraîne l'expression du coenzyme UDP-GlcNac (Uridine Diphosphate N-acétylglucosamine) permettant l'activation de récepteurs de surface typiques du macrophage anti-inflammatoire tels que le CD206 (Figure 13, droite) (Jha et al. 2015).

In vivo, ces observations ne sont pas aussi claires et suggèrent que l'identité métabolique des macrophages dépend non seulement des multiples signaux environnementaux comme présenté précédemment (cf. chapitre II - 2.1) mais aussi de la disponibilité des métabolites et des nutriments au sein des tissus (Wculek et al. 2022).

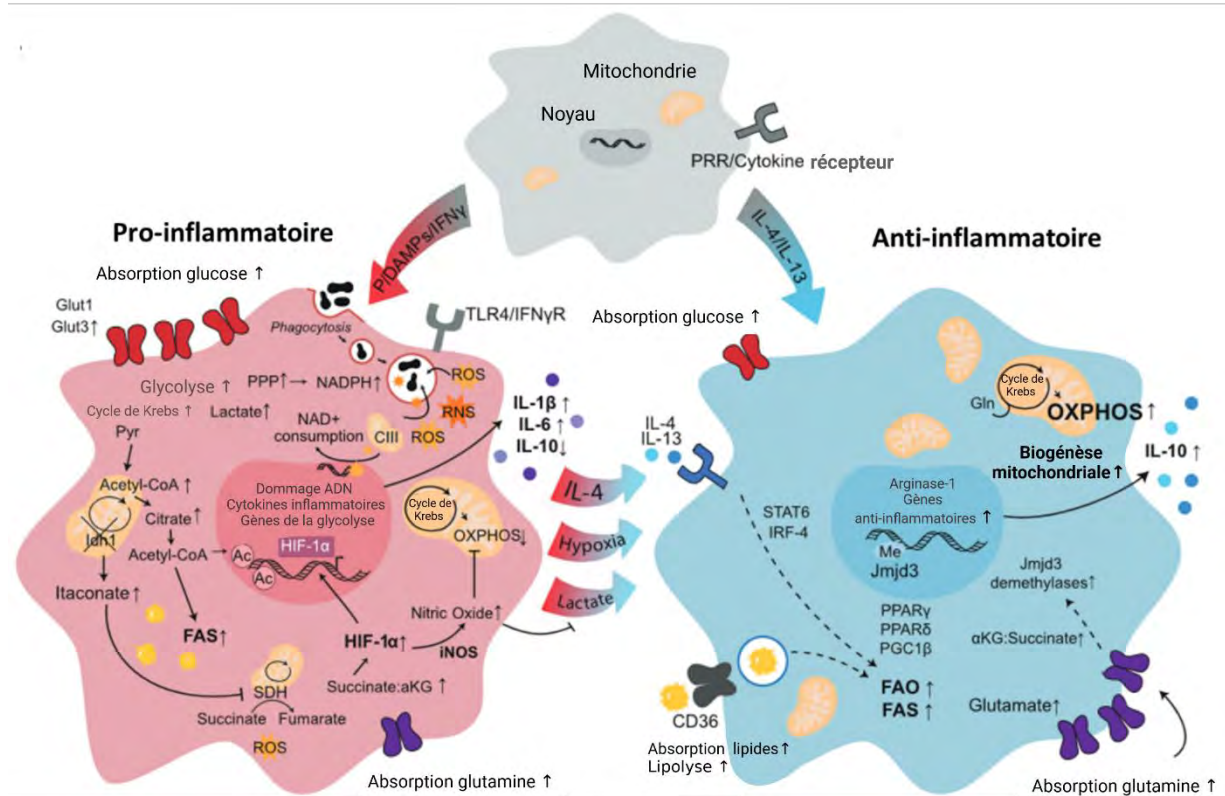


Figure 13 : Le métabolisme des macrophages en réponse à une stimulation pro-(gauche) ou anti-inflammatoire (droite) (Wculek et al. 2022)

FAS : synthèse des acides gras ; FAO : oxydation des acides gras ; aKG : Alpha-Kétoglutarate ; SDH : succinate déshydrogénase ; OXPHOS : phosphorylation oxydatives ; PPP : voie des pentoses phosphate ; NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate ; NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide ; coA : coenzyme A ; Jmjd3 : Jumonji domain-containing protein-3

2.2. Hétérogénéité ontogénique

Pendant longtemps, les macrophages ont été décrits comme dérivant des monocytes circulants à partir de l'hématopoïèse médullaire adulte. Cependant, depuis quelques années, ce dogme a été remis en cause avec l'étude de l'hématopoïèse embryonnaire qui a mis en évidence la persistance à l'âge adulte de macrophages dérivés de l'hématopoïèse embryonnaire au sein des tissus.

2.2.1. Origine embryonnaire des macrophages

Tout au long du développement embryonnaire on voit apparaître des macrophages embryonnaires (cf. chapitre 1, 1.). Ces macrophages primitifs phagocytent les débris associés

au remodelage tissulaire lors de l'embryogenèse, ils permettent également le développement des vaisseaux sanguins au sein de l'embryon grâce à la production de VEGF (Fantin et al. 2010). On note deux vagues de colonisation des tissus par les macrophages ou leurs progéniteurs au cours de l'embryogenèse. Les premiers macrophages primitifs dérivent directement des pEMP issus du sac vitellin au jour 8,5 de vie embryonnaire. Les pEMP migrent via la circulation sanguine dans les tissus fœtaux et se différencient en macrophages sans intermédiaire monocytique. Ces macrophages sont retrouvés notamment dans le cerveau, l'épiderme, l'intestin, le cœur et le foie. La seconde vague se traduit par la migration des tEMP vers le foie fœtal de manière transitoire (E9,5) où ils se différencient localement en progéniteurs macrophagiques ou monocytes fœtaux (Yona et al. 2013; Mass et al. 2016). Ces monocytes fœtaux rejoignent les différents tissus fœtaux où ils se différencient en macrophages embryonnaires. Dans certains tissus comme la peau, l'intestin, le cœur et le foie, ils remplacent complètement ou partiellement les macrophages primitifs issus de la première vague. En revanche, dans le cerveau, ces nouveaux progéniteurs sont incapables de passer la barrière hémato-encéphalique qui est déjà mise en place. Les macrophages du cerveau (ou microglie) sont donc exclusivement des macrophages primitifs issus des EMP précoces (Ginhoux et al. 2010). Après la naissance, ce sont les monocytes issus de l'hématopoïèse définitive qui migrent vers les tissus et se différencient en macrophages (Figure 14) (Ginhoux & Guilliams 2016).

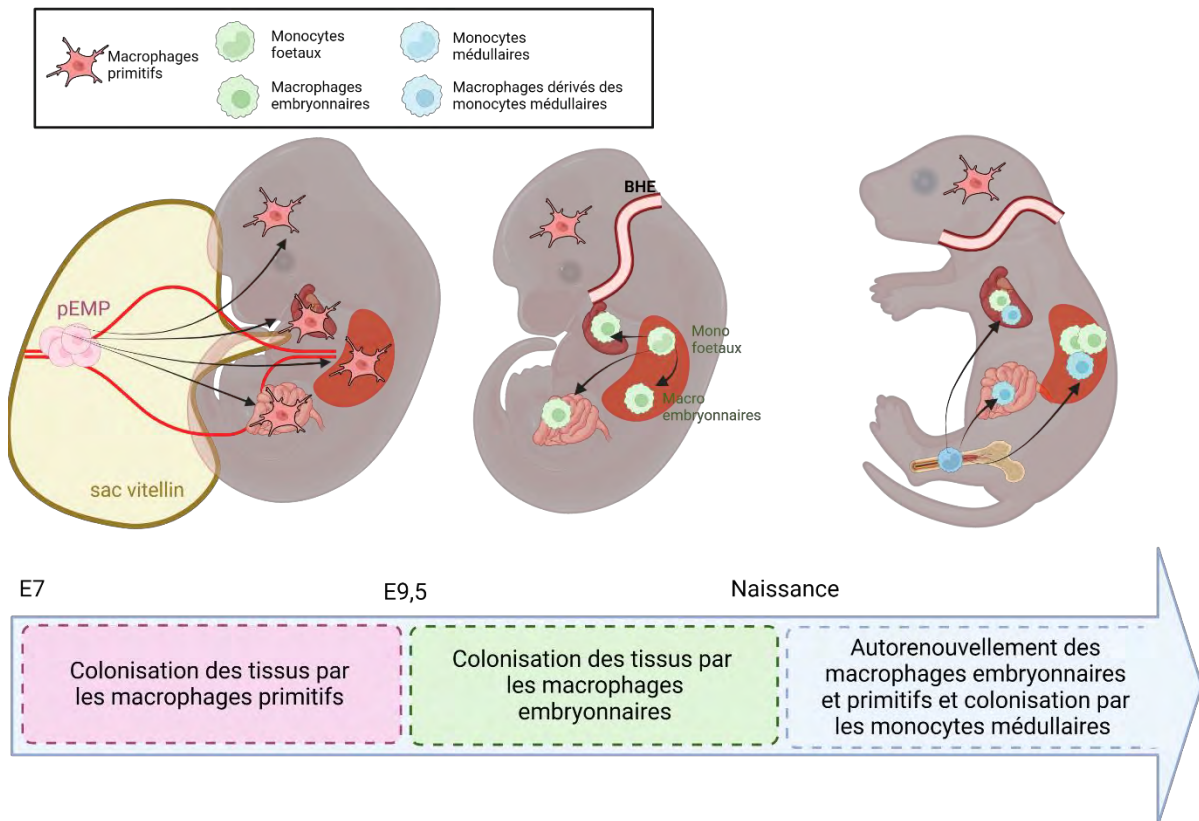


Figure 14 : Les vagues de colonisation de macrophages au cours du développement embryonnaire et après la naissance.

Les progéniteurs primitifs précoces pEMP migrent vers les différents organes au sein de l'embryon où ils se différencient en macrophages primitifs entre E7 et E9,5. Puis, les tEMP génèrent des monocytes foetaux dans le foie foetal qui migrent vers les différents organes où ils se différencient en macrophages embryonnaires et remplacent les macrophages primitifs, à l'exception des macrophages dans le cerveau qui sont isolés par la barrière hémato-encéphalique (BHE). Après la naissance, les monocytes médullaires migrent vers les différents organes où ils se différencient en macrophages pour remplacer/ compléter le pool de macrophages embryonnaires dans certains organes. Inspiré de (Hoeffel & Ginhoux 2015). Généré avec BioRender.com

Les macrophages embryonnaires sont capables de proliférer et représentent dans certains tissus la majorité des macrophages résidents à l'âge adulte (Yona et al. 2013; Hashimoto et al. 2013). Ces macrophages qui persistent à l'âge adulte, s'auto-renouvellent indépendamment des monocytes (Guilliams et al. 2013; Hashimoto et al. 2013). On les qualifie de macrophages résidents (Dick et al. 2022). Chaque tissu contient donc une mosaïque de macrophages d'origines différentes qui lui est propre et qui dépend de l'accessibilité du tissu, de la niche tissulaire, de la capacité d'auto-renouvellement des

macrophages embryonnaires au sein du tissu et des agressions subies par le tissu au cours de la vie (Guilliams & Scott 2017) (Figure 15).

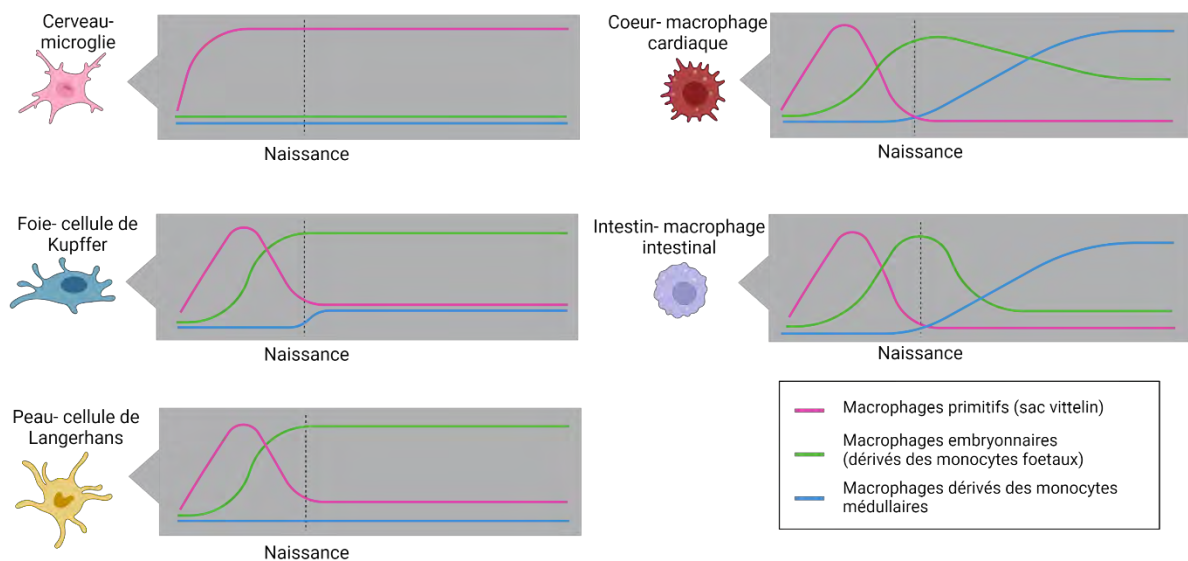


Figure 15: Evolution des populations de macrophages au cours du développement dans le cerveau, le foie, la peau, le cœur et l'intestin avant et après la naissance.

Inspiré de Lee and Ginhoux 2022 (Lee & Ginhoux 2022). Généré avec BioRender.com

2.2.2. La composition des tissus en macrophages après la naissance et leur rôle au sein des tissus

Ainsi plusieurs études se sont intéressées à la variation de la composition physiologique des tissus en macrophages dérivés de l'hématopoïèse embryonnaire ou adulte à l'âge adulte (Figure 15). Le cerveau est le seul organe dans lequel tous les macrophages sont des macrophages primitifs dont l'auto-renouvellement suffit pour renouveler la population au cours de la vie de l'individu (Ginhoux et al. 2010). Les cellules de Langerhans (macrophages de l'épiderme), sont issues à la fois des EMP précoces mais aussi des monocytes du foie fœtal et ne sont pas remplacées à l'âge adulte par les monocytes dérivés de la MO (Merad et al. 2002). Les macrophages du foie (cellules de Kupffer) (Yona et al. 2013), les macrophages péritonéaux (Cassado et al. 2015), les macrophages pulmonaires (macrophages alvéolaires) (Guilliams et al. 2013) et les macrophages de la pulpe rouge de la rate dérivent des monocytes fœtaux et sont très peu remplacés à l'âge adulte par les monocytes dérivés de l'hématopoïèse médullaire (Yona et al. 2013). A l'inverse, dans l'intestin (Bain et al. 2014), le pancréas, le cœur (Epelman et al. 2014), l'os (ostéoclastes) (Kotani et al. 2013) et le derme

(Tamoutounour et al. 2013) les macrophages embryonnaires sont plus ou moins rapidement remplacés par les monocytes issus de l'hématopoïèse médullaire dès la naissance et tout au long de la vie adulte. Le remplacement total des macrophages embryonnaires par les monocytes au moins au niveau de l'intestin a été attribué à « l'inflammation physiologique » qui réside dans l'intestin générée par l'exposition aux bactéries commensales et à la nourriture (Bain et al. 2014).

Les macrophages sont localisés au sein des tissus dans des niches tissulaires qui permettent leur soutien physique (matrice), le maintien de leur pool par l'expression de facteurs de croissance, l'induction d'une identité tissu spécifique par l'expression de facteurs de transcription. En retour, les macrophages apportent un bénéfice à la niche, notamment en maintenant l'homéostasie du tissu (Guilliams et al. 2020). Ainsi, les dynamiques d'auto-renouvellement et d'infiltration des monocytes dans les tissus sont régies par l'équilibre de ces niches. Lorsque des macrophages de la niche entrent en apoptose ou lors d'une microlésion, le pool est rétabli grâce aux cellules de la niche et aux macrophages eux-mêmes qui produisent du M-CSF (Lavin et al. 2015). Chez la drosophile la distribution des macrophages au sein de l'organisme est bien définie et la perte d'inhibition de contact des phagocytes entre eux entraîne leur redistribution, ce qui permet de retrouver l'équilibre dans l'organisme (Davis et al. 2012; Wood et al. 2006). La perte des macrophages tissulaires chez le mammifère pourrait entraîner des signaux de perte d'inhibition de contact, et donc la prolifération des macrophages, ce qui permettrait la reformation du pool de macrophages résidents (Guilliams et al. 2020). Une inflammation aiguë ou une lésion tissulaire peut cependant entraîner des perturbations de la niche et la perte d'un grand nombre de macrophages résidents. Dans ce cas les monocytes circulants migrent alors dans les tissus et se différencient en macrophages pour participer au processus inflammatoire. Guilliams propose que l'expression transitoire de molécules d'adhésion et de chimiokines par les cellules de la niche permet le recrutement des monocytes si la niche est accessible (rupture de la barrière tissulaire). La production de M-CSF par la niche permet aux monocytes qui intègrent le tissu de se différencier en macrophages puis de proliférer (Guilliams et al. 2020). Enfin les différents signaux présents au sein de la niche qui donnent au macrophage son identité de macrophage tissulaire (spécifique pour chaque tissu) permettent aux macrophages dérivés des monocytes d'acquérir une identité tissu spécifique au cours du

temps dans la plupart des tissus (van de Laar et al. 2016; Scott et al. 2016; Lavin et al. 2014) (Figure 16). Cependant, dans certains cas, notamment dans le cerveau, ils ne peuvent pas acquérir totalement les caractéristiques des macrophages résidents même à très long terme (Bennett et al. 2018).

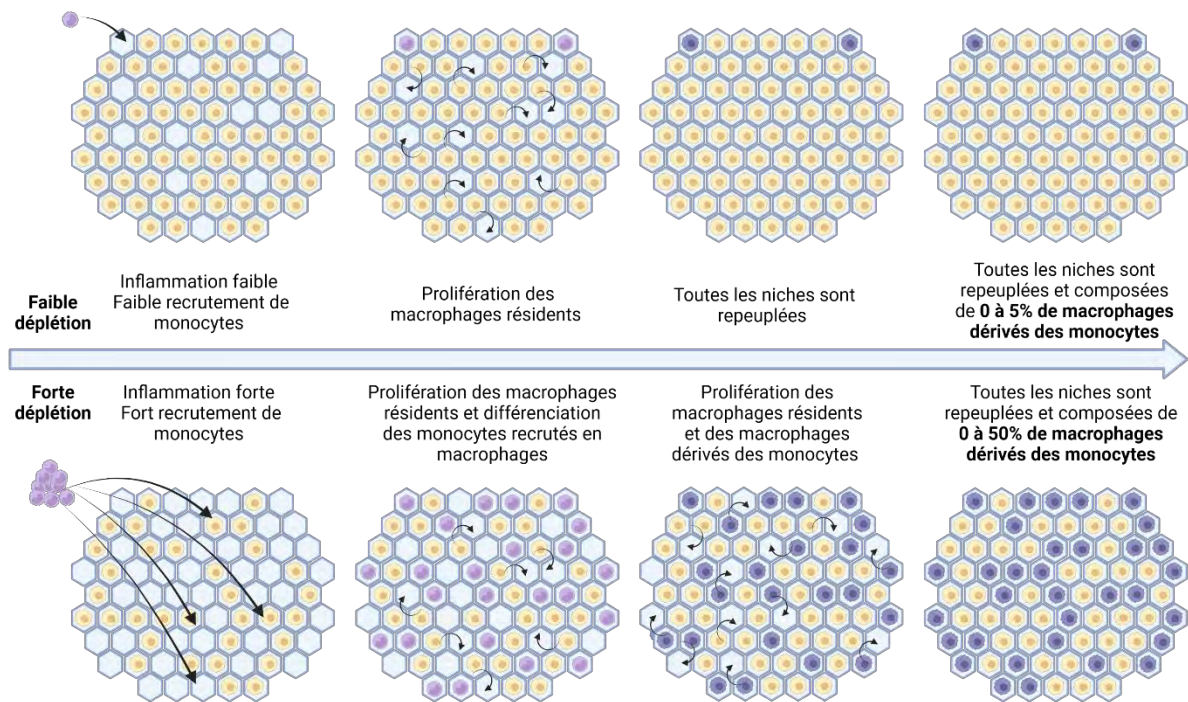


Figure 16 : Hypothèse de Williams sur la capacité des monocytes à intégrer et persister au sein des tissus adultes en fonction du degrés de déplétion des macrophages

En haut : Une petite atteinte tissulaire induit une faible déplétion des macrophages de la niche et une faible inflammation entrainant un petit recrutement de monocytes. Le repeuplement des niches de macrophage se fait alors principalement par la prolifération des macrophages résidents. Après résolution de l'inflammation une très petite proportion de macrophages dérivés des monocytes est retrouvée au sein du tissu.

En bas : Une grosse atteinte tissulaire induit une forte déplétion des macrophages de la niche et une forte inflammation entrainant un grand recrutement de monocytes qui intègrent les niches tissulaires et se différencient en macrophages. Le repeuplement des niches par la prolifération des macrophages résidents n'est pas suffisante et les macrophages dérivés des monocytes prolifèrent également pour reconstituer les niches. Après résolution de l'inflammation une grande proportion de macrophages dérivés des monocytes est retrouvée au sein du tissu (Williams et al. 2020). Généré avec BioRender.com

Les macrophages résidents possèdent donc des caractéristiques spécifiques qui dépendent de la niche et les distinguent des macrophages dérivés de l'hématopoïèse médullaire. Ces

caractéristiques sont déterminées par leur origine, leur environnement local, le statut inflammatoire et le temps passé dans le tissu (Blériot et al. 2020). On leur accorde ainsi des propriétés plutôt anti-inflammatoires et donc un phénotype « M2-like ». En effet, ils résident dans les tissus pour contrôler le statut inflammatoire et maîtriser le bon développement des organes. Leur environnement module leur statut inflammatoire et leur activité. Le rôle des macrophages dépend également des tissus dans lesquels ils se trouvent (Okabe & Medzhitov 2016; Lee & Ginhoux 2022).

2.2.3. Quelques exemples de macrophages tissulaires et leurs fonctions

Dans le cerveau, la microglie joue un rôle très important dans le développement et la survie des neurones. En effet, son interaction étroite avec les neurones et les cellules gliales durant le développement permet le développement axonal via la sécrétion de facteurs de croissance (Ueno et al. 2013). On lui attribue un rôle très important dans la plasticité synaptique permettant l'apprentissage durant le développement (Paolicelli et al. 2011) mais aussi les processus mnésiques à l'âge adulte (Parkhurst et al. 2013) (Figure 17).

Dans le foie, les cellules de Kupffer caractérisées par l'expression de TIM4 et Clec4F (Blériot et al. 2021) participent à la détoxification du foie en métabolisant le fer (Theurl et al. 2008). Elles participent également à la métabolisation des lipides via l'expression du CD36 (Blériot et al. 2021) et sont capables de sécréter des facteurs de croissance permettant la réparation du foie en cas de lésion (Abshagen et al. 2007) (Figure 17).

Physiologiquement dans le cœur, les populations de macrophages résidents sont constituées d'un mélange de macrophages résidents d'origine embryonnaire (TIMD4⁺ / CCR2⁻ / Ly6C⁻) qui s'auto-renouvellent et sont impliqués dans l'homéostasie tissulaire et de différentes populations de monocytes qui intègrent le tissu, acquièrent des propriétés de macrophages résidents-like (CCR2⁻, TIMD4^{low}, CMHII⁺, Ly6C⁺ / CCR2⁺, CMHII⁺, Ly6C⁺) et sont impliqués dans la signalisation inflammatoire (Epelman et al. 2014; Yanagihashi et al. 2017). Les macrophages embryonnaires sécrètent des facteurs permettant la mise en place de l'angiogenèse (Gula et al. 2021). La déplétion des macrophages cardiaques embryonnaires induit des troubles de la conduction électrique dans les oreillettes et les ventricules montrant qu'ils facilitent et contrôlent la conductance électrique des cardiomyocytes (Hulsmans et al. 2017). En revanche, lors de la réparation cardiaque post infarctus du myocarde, les

macrophages infiltrés, dérivés des monocytes jouent également un rôle primordial en participant à la réparation (Dewald et al. 2005) (cf. chapitre 3, 2.4) (Figure 17).











Origine	Types cellulaires	Organes	Fonction
 Progéniteurs primitif	 Microglie	 Cerveau	<ul style="list-style-type: none"> • Développement axonal • Plasticité synaptique
 Monocytes foetaux	 Cellule de Kupffer	 Foie	<ul style="list-style-type: none"> • Détoxification du foie • Metabolisation des lipides • Réparation hépatique
	 Macrophage cardiaque CCR2 ⁺	 Coeur	<ul style="list-style-type: none"> • Contrôle de la conductance électrique • Induction de l'angiogenèse • Réparation cardiaque
 Monocytes médullaires	 Macrophage cardiaque CCR2 ⁺		<ul style="list-style-type: none"> • Signalisation inflammatoire • Réparation cardiaque

Figure 17 : Fonctions et origine des macrophages tissulaires dans le cerveau, le foie et le cœur.

Inspiré de (Ueno et al. 2013; Paolicelli et al. 2011; Parkhurst et al. 2013; Blériot et al. 2021; Theurl et al. 2008; Abshagen et al. 2007; Epelman et al. 2014; Yanagihashi et al. 2017; Gula et al. 2021; Hulsmans et al. 2017; Dewald et al. 2005). Généré avec BioRender.com

2.2.4. Les macrophages du tissu adipeux

Dans le tissu adipeux (TA) les macrophages sont les cellules immunitaires majoritaires et jouent un rôle très important. Pendant longtemps ils n'ont été étudiés que dans des contextes inflammatoires d'obésité ou de diabète. Cependant, depuis plusieurs années des études se sont intéressées à leur rôle physiologique. Ainsi, il est décrit qu'une déplétion totale des macrophages dans le TA sous-cutané en période post-natale induit chez la souris une diminution de la taille des adipocytes, ce qui suggère un rôle précoce des macrophages dans la mise en place du TA (Wei et al. 2005). A l'âge adulte, ils permettent le remodelage et l'expansion appropriée du TA (Asterholm et al. 2014). Dans des conditions inflammatoires, les macrophages forment des « structures en couronne » (CLS) autour des adipocytes, pour

assurer l'élimination des débris cellulaires et des gouttelette lipidiques libérées par les adipocytes apoptotiques (Cinti et al. 2005).

Les macrophages du TA représentent une population hétérogène. Lors de l'obésité, une partie importante des macrophages provient de la différenciation des monocytes circulants, en réponse à l'inflammation chronique accompagnant l'hypertrophie/ hyperplasie adipocytaire (Weisberg et al. 2006; Weisberg et al. 2003). Chez un individu sain, une partie des macrophages présents dans le TA semble être capable de se maintenir indépendamment des monocytes circulants (Hashimoto et al. 2013). Certains auteurs décrivent ces macrophages comme issus du sac vitellin, grâce à leur suivi *in vivo* (Hassnain Waqas et al. 2017). Cependant, ces résultats sont contestés par le fait que le TA ne se développe que tardivement, principalement après la naissance (Han et al. 2011). Comme nous l'avons décrit précédemment (cf. chapitre 1, 3.2), les macrophages du TA proviennent également de la différenciation de CSH présentes dans ce tissu (Poglio et al. 2012). Ces différentes études ne sont pas antinomiques. On peut en effet proposer que les progéniteurs primitifs issus du sac vitellin soient à l'origine des CSH présentes dans le TA à l'âge adulte. Par ailleurs, les macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA ont été étudiés dans un contexte de diabète induit par un régime gras. Il a été démontré que dans ces conditions, ces macrophages présentent un profil pro-inflammatoire. Leur déplétion inhibe le développement du diabète chez des souris nourries avec un régime gras, ce qui démontre le rôle primordial qu'ils jouent dans la mise en place de l'inflammation et le maintien du diabète (Luche et al. 2017).

L'ensemble de ces données démontre l'importance des macrophages dans la lutte contre les pathogènes mais aussi dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. En effet, grâce à leur grande hétérogénéité ils sont capables de s'adapter et de répondre en permanence à leur environnement. Leur origine semble déterminante dans l'acquisition de leur phénotype et semble déterminer au moins en partie leurs propriétés fonctionnelles. La découverte de macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA ouvre un nouveau champs d'exploration sur leur rôle non seulement dans les pathologies associées au TA mais aussi dans le maintien de l'homéostasie tissulaire du fait de la présence d'un grand nombre de dépôt adipeux disséminés dans l'organisme.

Chapitre III : Les macrophages des acteurs clés de la réparation tissulaire

1. Les différentes issues de la réparation tissulaire

1.1. De la régénération à la cicatrisation/fibrose au cours de l'évolution des espèces et du développement post-natal

La réparation tissulaire dans le règne animal est un phénomène complexe mettant en jeu différents acteurs cellulaires et moléculaires dont l'issue peut être de deux types : la cicatrisation ou la régénération.

On définit la régénération comme un processus de réparation au cours duquel l'individu retrouve l'intégrité totale du tissu, de l'organe ou du membre, c'est-à-dire, un retour à la morphologie et la fonction initiales de la partie lésée.

Cette capacité de régénération est bien décrite chez les organismes invertébrés et quelques vertébrés non mammaliens. En effet, on observe chez le ver planaire (invertébré) la régénération de l'organisme entier à partir d'un simple segment permettant la reformation du ver comprenant le système digestif, le cerveau et les connexions neuronales, les muscles et les tissus conjonctifs (Elliott & Sánchez Alvarado 2013; Peiris et al. 2014). Chez le poisson zèbre, le processus de régénération est également décrit dans la réparation de la nageoire caudale permettant la reformation de l'os, des vaisseaux et des nerfs (Akimenko et al. 2003; Nakatani et al. 2007; Marí-Beffa et al. 2007). Chez les amphibiens la capacité de régénération n'est pas la même chez toutes les espèces. Alors que la queue, les pattes, la rétine et la moelle épinière sont capables de régénérer chez la salamandre à n'importe quel stade de sa vie (Ferretti et al. 2003; Parish et al. 2007; Brockes & Kumar 2002), les grenouilles, capables de régénérer au stade larvaire perdent cette capacité lors de la métamorphose (Bertolotti et al. 2013).

Chez le mammifère la capacité de régénération décroît au cours du développement postnatal. En effet, chez le souriceau on observe une capacité de régénération cardiaque (Porrello et al. 2011; Porrello et al. 2013). La régénération spontanée du bout du doigt a également été démontrée chez le souriceau et le nourrisson (Han et al. 2008; Illingworth

1974). Il existe également quelques modèles de mammifères adultes qui ont conservé une capacité de régénération comme le rongeur *Acomys* dont la peau peut totalement régénérer après une lésion (Seifert et al. 2012) et la souris MRL (Murphy Roths Large), une souris génétiquement modifiée chez qui il a été montré une régénération du tissu adipeux, de la moelle épinière, du cartilage et du cœur (Leferovich et al. 2001; Clark et al. 1998; Labit et al. 2018). Cependant, dans la majorité des cas, le mammifère adulte semble avoir perdu la capacité de régénération à la suite d'une lésion aigüe au profit de la cicatrisation.

La cicatrisation est caractérisée par une perte de la morphologie et de la fonction tissulaires liée à l'apparition d'un tissu fibreux constitué d'un dépôt de matrice extracellulaire, qui remplace les cellules fonctionnelles. C'est le cas par exemple lors d'une lésion cutanée profonde où malgré la reformation de l'épithélium de surface, les annexes cutanées (glandes sudoripares, sébacées et follicules pileux) ne sont pas reformés (Gurtner et al. 2008). Dans certains cas, la cicatrisation peut mener à la fibrose, qui est caractérisée par un excès de matrice extracellulaire (notamment le collagène et la fibronectine). Alors que le dépôt de matrice extracellulaire est contenu lors de la cicatrisation, lors de la fibrose la matrice extracellulaire est produite en excès, ce qui entraîne un remplacement progressif du tissu sain en tissu fibreux (dans et autour de la lésion) et conduit à l'altération fonctionnelle définitive du tissu touché (Wynn & Ramalingam 2012a). La fibrose est donc considérée comme une aggravation de la cicatrice. Il est intéressant de noter que la fibrose apparaît au cours du vieillissement dans divers organes (Lee et al. 2021; Schaum et al. 2019; Biernacka & Frangogiannis 2011).

1.2. Le système immunitaire au cœur de l'orientation vers la régénération ou la cicatrisation/fibrose

Il a été démontré que le système immunitaire et particulièrement le système immunitaire inné intervient de manière décisive dans les différents organismes pour orienter la réparation vers la régénération ou la cicatrisation. En effet, chez le ver planaire une réponse inflammatoire très primitive est observée lors de la lésion. Même s'il ne possède pas de système immunitaire dédié, les cellules réticulaires sont recrutées lors de la lésion où elles présentent des capacités de phagocytose des débris et entraînent l'expression de perforine, une molécule de signalisation immunitaire. Sans l'action de ces cellules, la régénération au

sein de cet organisme est impossible (Altincicek & Vilcinskas 2008; Kangale et al. 2021). Chez les amphibiens (grenouilles et salamandres), bien que la plupart des processus biologiques soient proches, on note de grandes différences dans l'organisation de leur système immunitaire adaptatif. En effet, chez la grenouille, le passage au stade adulte (métamorphose) est lié à l'apparition d'un système immunitaire adaptatif très développé et est associé à une perte de la capacité de régénération (Bertolotti et al. 2013; Robert & Cohen 1998; Rollins-Smith 1998). En revanche, chez la salamandre, le passage à l'âge adulte est associé à l'apparition d'un système immunitaire adaptatif mais il est plus lent et moins développé que celui de la grenouille (Ussing & Rosenkilde 1995; Chen & Robert 2011), ce qui pourrait être responsable du maintien de la capacité de régénération chez l'individu adulte. Cette corrélation entre développement du système immunitaire adaptatif et disparition de la capacité de régénération est également vraie chez le mammifère. En effet, la capacité à régénérer en période néonatale est associée à la présence : d'un système immunitaire naïf, d'une réponse innée prépondérante, de lymphocytes T régulateurs patrouilleurs qui régulent l'inflammation initiée par l'immunité innée. A l'inverse les cellules T effectrices sont très peu diversifiées ce qui empêche une réponse auto-réactive trop forte. L'éducation des lymphocytes T et la diminution des lymphocytes T régulateurs chez l'adulte semble conduire progressivement à la perte de la capacité à régénérer (Sattler & Rosenthal 2016; Georgountzou & Papadopoulos 2017; Rackaityte & Halkias 2020).

En outre, lorsque le système immunitaire est dérégulé chez la mammifère adulte on assiste à des défauts de cicatrisation (ulcères ou fibrose). C'est le cas notamment lors du diabète induit par l'obésité au cours duquel, l'inflammation chronique entraîne des problèmes de fermeture de plaies (Greenhalgh 2003). Les patients atteints de la maladie de Crohn, une maladie auto-immune dans laquelle l'inflammation est dérégulée, présentent l'apparition de fibrose au niveau gastro-intestinal. (Rogler & Hausmann 2017). Chez l'individu âgé, on observe une modification du système immunitaire et l'apparition d'une inflammation de bas grade chronique appelée inflammaging qui corrèle avec l'expression de gènes profibrotiques (Franceschi & Campisi 2014; Ferrucci & Fabbri 2018).

L'ensemble de ces résultats obtenus chez diverses espèces permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle la perte de la capacité de régénération est corrélée à l'apparition d'un système immunitaire complexe, notamment à la mise en place de l'immunité adaptative (Figure 18).

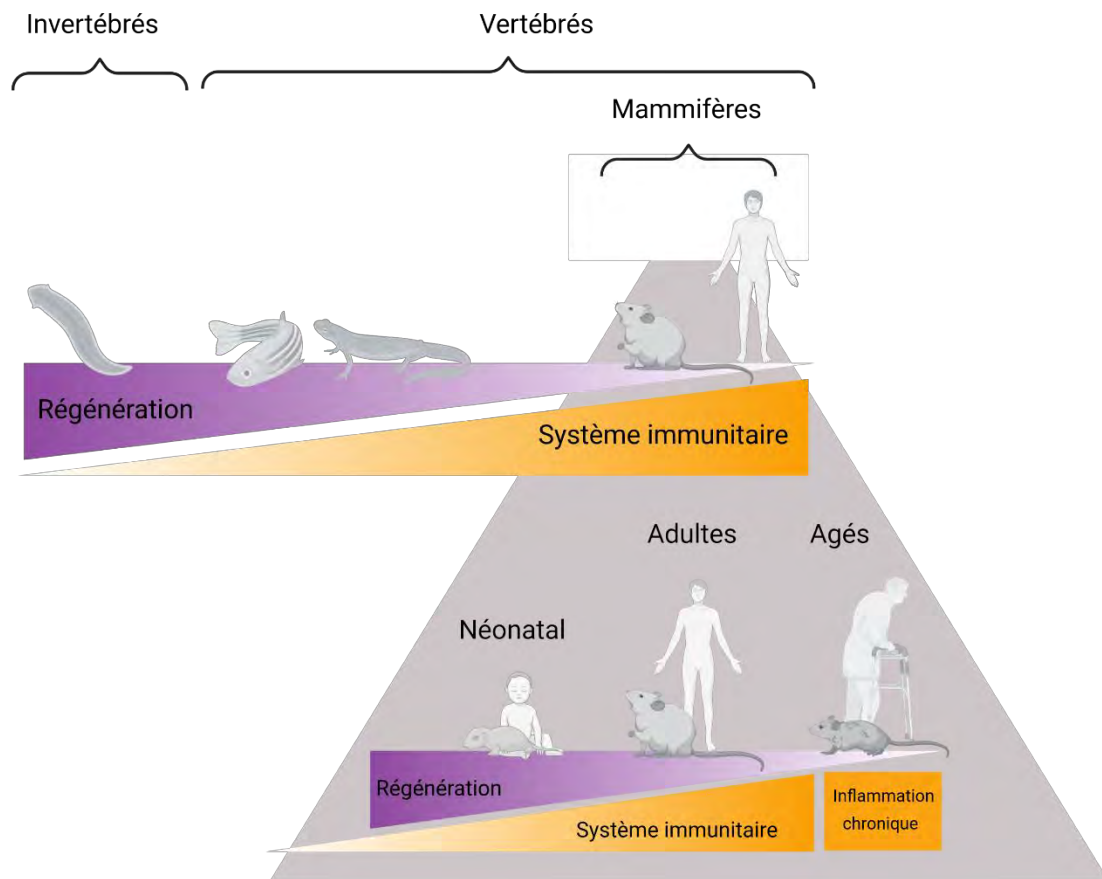


Figure 18 : Corrélation inverse entre l'évolution / la complexification du système immunitaire et la capacité de régénération tissulaire.

Inspiré de (Julier et al. 2017). Généré avec BioRender.com

Ces données de la littérature démontrent que le système immunitaire est essentiel à la mise en place des processus de réparation tissulaire quelle que soit leur issue et les études sur l'importance du système immunitaire dans la réparation tissulaire ne cessent d'augmenter depuis les années 1980 (Figure 19a). Il est intéressant de noter que la grande majorité de ces publications porte spécifiquement sur l'implication des macrophages dans la réparation tissulaire (Figure 19b).

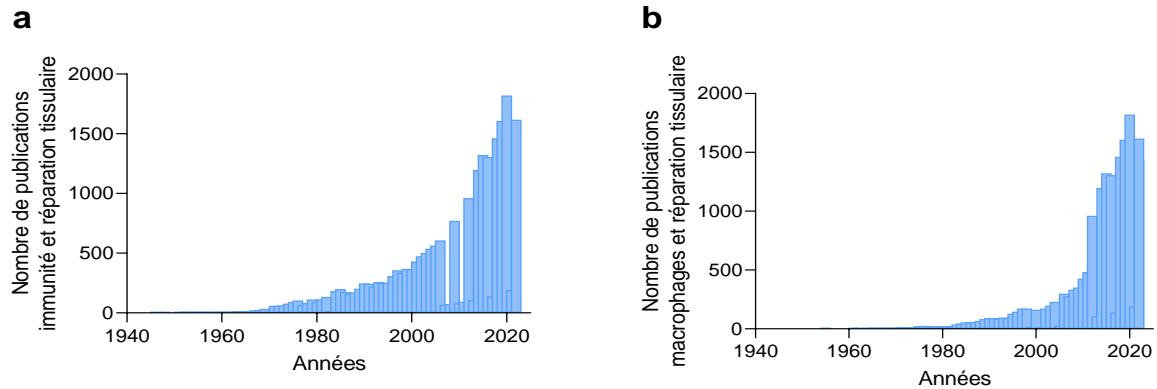


Figure 19 : Cinétique de l'évolution du nombre de publications sur le système immunitaire et la réparation tissulaire (a) et les macrophages et la réparation tissulaire (b).

Informations extraites de Pubmed

Les macrophages jouent un rôle prépondérant dans la mise en place des processus de réparation tissulaire, tant chez les organismes non mammaliens que les mammifères. En effet, chez la salamandre et le poisson zèbre, la déplétion des macrophages entraîne respectivement une absence de régénération de la patte ou une régénération anormale de la nageoire caudale (Petrie et al. 2015) (Godwin et al. 2013). Chez la souris, les modèles de réparation cutanée, pulmonaire ou hépatique ont permis de démontrer l'implication indispensable de différentes sous-populations de macrophages à la fois dans la mise en place mais également dans la réduction du tissu fibreux associé à la cicatrisation, empêchant l'évolution vers la fibrose (Lucas et al. 2010; Gibbons et al. 2011; Duffield et al. 2005). Les macrophages jouent donc un rôle important dans la réparation tissulaire quelle qu'en soit son issue en orchestrant l'évolution dans les différentes étapes de la réparation tissulaire (Das et al. 2015; Wynn & Vannella 2016; Julier et al. 2017).

2. Le rôle des macrophages dans les différentes phases de la réparation tissulaire chez le mammifère

Quelle que soit l'intensité de la lésion, et l'issue de la réparation, elle se déroule en trois grandes phases séquentielles qui se chevauchent et sont complémentaires : une phase d'hémostase/inflammation, une phase prolifération cellulaire et une phase de remodelage tissulaire (Figure 20).

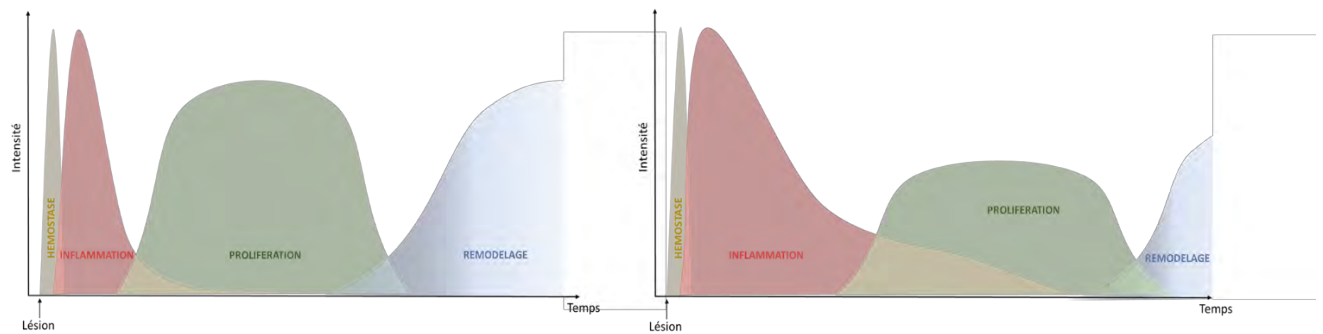


Figure 20 : Cinétiques de la régénération tissulaire (à gauche) et de la cicatrisation (à droite)
 Inspiré de (Seifert et al. 2012)

Les cinétiques d'apparition des populations cellulaires et des molécules produites au cours des différentes phases sont décisives et conditionnent l'issue de la réparation. Comme présenté précédemment, le système immunitaire est au cœur du processus de réparation et une modification de la phase inflammatoire peut retarder l'ensemble des phases qui suivent aboutissant à une réparation tissulaire altérée. Ce sont particulièrement les macrophages qui orchestrent non seulement la phase inflammatoire mais aussi les phases de prolifération cellulaire et de remodelage tissulaire grâce à leur flexibilité phénotypique et fonctionnelle (Forbes & Rosenthal 2014).

2.1. Hémostase et inflammation

À la suite d'une lésion aiguë entraînant une brèche vasculaire, se met en place la phase d'hémostase qui va permettre de contenir le saignement. Elle est subdivisée en trois phases : l'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse. Au cours de l'hémostase primaire, les plaquettes jouent un rôle important, en se fixant au collagène sous-endothélial via le facteur de Von Willebrand activant ainsi les plaquettes grâce à une signalisation intracellulaire complexe (Ruggeri 2007; Jackson 2007; Varga-Szabo et al. 2008). Cette activation entraîne l'accumulation d'autres plaquettes au niveau de la lésion et l'agrégation plaquettaire à l'aide du fibrinogène plasmatique. Cette agrégation plaquettaire est ensuite consolidée grâce à la thrombine qui clive le fibrinogène en fibrine et permet la mise en place d'un réseau de fibrine au sein de cet agrégat, c'est la coagulation (Periyah et al. 2017). Vient ensuite l'étape de fibrinolyse où la lyse de la fibrine polymérique en fibrine soluble par la plasmine permet la dissolution du clou plaquettaire et le rétablissement du flux sanguin au niveau de la lésion.

Pendant longtemps considérée comme une phase passive permettant seulement l'arrêt du saignement, l'hémostase est maintenant considérée comme une phase active faisant partie de la phase inflammatoire. En effet, le clou plaquettaire sert de première défense contre les microorganismes qui pourraient infiltrer le tissu lésé. De plus, la dégranulation des plaquettes au sein du clou entraîne la libération de facteurs de croissance (VEGF, PDGF) qui agissent sur les cellules mésenchymateuses et les cellules endothéliales environnantes, et de chémo-attractant (CCL5) pour les cellules immunitaires (von Hundelshausen et al. 2001; Mandel et al. 2022), notamment les neutrophiles et les monocytes. La fibrine soluble libérée lors de la fibrinolyse peut se fixer au niveau des intégrines (CD11b) présentes sur les cellules myéloïdes et entraîner l'activation du complément, permettant la libération de cytokines pro-inflammatoires par ces cellules (Luo et al. 2013; Sahni et al. 1998). Le clou plaquettaire sert également de matrice de soutien pour les cellules immunitaires qui ont été attirées sur le site de la lésion. L'hémostase est donc une phase essentielle qui participe activement à la mise en place et au bon déroulement de l'inflammation.

La phase inflammatoire se met en place dans les 24h qui suivent la lésion. Elle permet, en plus de prévenir les infections, d'orchestrer la mise en place des phases suivantes de la réparation grâce à l'intervention de cellules immunitaires clés (neutrophiles, mastocytes, monocytes et macrophages). Elle est subdivisée en deux étapes : l'inflammation aiguë et la résolution de l'inflammation.

2.1.1. Rôle des monocytes/macrophages dans l'inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est activée par la libération de DAMP (acide urique, HMGB1, ATP...) par les cellules lésées (Kono et al. 2014; Scaffidi et al. 2002), mais aussi de cytokines libérées de manière passive par les cellules nécrotiques (IL-1- α , IL-33) (Eigenbrod et al. 2009; Enoksson et al. 2011) et de PAMP (LPS, mannose) (présents ou non en fonction de la lésion). Ces signaux sont intégrés par les cellules de l'immunité innée présentes au niveau de la lésion, à savoir, les macrophages et les mastocytes, mais aussi par les cellules endothéliales et les plaquettes recrutées. L'intégration de ces signaux par les macrophages permet leur polarisation en macrophages pro-inflammatoires qui sécrètent des cytokines pro-

inflammatoires telles que TNF- α et IL-6 (Daley et al. 2010), des chimiokines telles que CXCL1 et CXCL2 (Sawant et al. 2021; Quinton et al. 2004). Le TNF- α induit l'expression des selectines-E et P, ICAM1 et VCAM1 par les cellules endothéliales (Myers et al. 1992; Choi et al. 2018), ce qui, combiné à l'expression des chimiokines, permet le recrutement des neutrophiles présents dans la MO, leur migration via la circulation sanguine et leur extravasation au niveau du site de lésion (Shen et al. 2013; Zarbock et al. 2006). Arrivés au niveau du tissu lésé, les neutrophiles dégranulent entraînant la libération de ROS, de protéases et de protéines antibactériennes et phagocytent les débris cellulaires (de Oliveira et al. 2016). En plus de leur rôle de clairance ils produisent des chimiokines, principalement le CCL2 (ou MCP-1) qui entraînent le recrutement des monocytes issus de la MO vers le site de la lésion de manière CCR2 dépendante (Tsou et al. 2007; Dewald et al. 2005), et leur entrée dans les tissus par extravasation. Les signaux inflammatoires présents sur le site de la lésion les orientent vers une différenciation en macrophages pro-inflammatoires. Ces macrophages participent alors à la phagocytose des débris cellulaires et produisent des cytokines et des médiateurs pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-1 β , PGE₂, NO, ROS) (Das et al. 2015). Ils participent ainsi à l'amplification de la réponse immunitaire pro-inflammatoire initiée par les cellules résidentes. Dans ce contexte très inflammatoire, le métabolisme du macrophage est orienté vers la glycolyse afin de produire l'énergie nécessaire pour la phagocytose et la production de cytokines (Varga et al. 2016; Morioka et al. 2018). Cette étape est absolument indispensable à la réparation tissulaire car elle permet de nettoyer le tissu des débris et potentiels micro-organismes, elle doit cependant, être rapidement résolue pour éviter la mise en place d'une inflammation chronique menant à l'absence de réparation tissulaire ou à la fibrose (ulcère ou cicatrice hypertrophique) (Figure 21).

2.1.2. Rôle des macrophages dans la résolution de l'inflammation

La résolution de l'inflammation est initiée par la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages aussi appelée efferocytose entre 48h et 72h après la lésion. En effet, l'environnement pro-inflammatoire sur le site de la lésion maintient les neutrophiles en vie dans un premier temps, puis l'excès de ces cytokines pro-inflammatoires (notamment le TNF-

α) (Akgul & Edwards 2003) et leur activité de phagocytose entraînent leur apoptose (Fox et al. 2010; Geering & Simon 2011). L'expression de signaux « find-me » (trouve-moi) et « eat-me » (mange-moi) par les neutrophiles apoptotiques permet leur élimination par les macrophages. Les principaux signaux « find me » sont des facteurs sécrétés parmi lesquels la sphingosine-1-phosphate, la lysophosphatidylcholine et l'ATP qui sont les plus étudiés (Elliott et al. 2009; Gude et al. 2008; Lauber et al. 2003). Ces signaux sont reconnus par les macrophages via les récepteurs membranaires sphingosine-1-phosphate récepteur (S1PR), G2A et P2Y₂ (Elliott et al. 2009; Gude et al. 2008; Lauber et al. 2003). Ces derniers, sont alors attirés vers les neutrophiles. Les signaux « eat-me » quant à eux sont exprimés à la surface des corps apoptotiques des neutrophiles. Les plus décrits sont les phosphatidylsérines (PS). Ils sont présents uniquement dans le feuillet interne de la membrane des cellules vivantes, leur exposition sur la partie externe est reconnue par les macrophages par l'intermédiaire de plusieurs récepteurs, tels que TIM-4, CD36, RAGE et MerTK (Naeini et al. 2020; Fadok et al. 1998; Min et al. 2020). La fixation des neutrophiles apoptotiques sur les macrophages entraîne des réarrangements du cytosquelette des macrophages entraînant l'internalisation des neutrophiles apoptotiques (Hochreiter-Hufford & Ravichandran 2013; Doran et al. 2020). L'efférocytose entraîne un switch phénotypique des macrophages d'un phénotype pro-inflammatoire vers un phénotype réparateur anti-inflammatoire. Ce changement de phénotype est dû à une modification du profil métabolique et du profil sécrétoire du macrophage. En effet, dans les 24 à 72 heures suivant la lésion, on observe une diminution de l'expression des gènes de la glycolyse au profit de ceux impliqués dans le métabolisme oxydatif (OXPHOS) (Mouton et al. 2018; Varga et al. 2016). La phagocytose et le catabolisme des cellules apoptotiques produisent des acides gras qui activent la chaîne mitochondriale dans le macrophage. L'activation de la respiration mitochondriale active les voies dépendantes de NAD⁺, notamment, la voie des Sirtuines menant à la production d'IL-10 (Zhang, Weinberg, et al. 2019) indispensable à la résolution de l'inflammation. L'efférocytose entraîne également l'inhibition de la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires, notamment le TNF- α , les ROS et le NO (De Lorenzo et al. 2010) et l'augmentation de la sécrétion active de médiateurs pro-résolutifs (Fadok et al. 2001; Elliott et al. 2017), parmi lesquels les médiateurs lipidiques, comme les résolvines (RvD1, RvD2 et RvE2) et LXA4 (Schwab et al. 2007; Buckley et al. 2014; Sansbury & Spite 2016) qui induisent l'arrêt du recrutement des cellules immunitaires du sang. Après efférocytose, les macrophages surexpriment l'Arginase-

1, la Dectine-1 et le CD206 caractéristiques des macrophages anti-inflammatoires (Daley et al. 2010), synthétisent des médiateurs anti-inflammatoires tels que l'IL-4, l'IL-13, l'IL-1ra (Brancato & Albina 2011; Stein et al. 1992) et des facteurs de croissance permettant la sécrétion de matrice, la prolifération cellulaire et l'angiogenèse (TGF- β , PDGF, VEGF) (Serhan & Savill 2005; Fadok et al. 2001; Ortega-Gómez et al. 2013). Ces sécrétions sont indispensables à la mise en place de la phase proliférative. Les macrophages produisent également des chimiokines telles que CCL22, CCL17 qui sont à l'origine du recrutement des lymphocytes T (LT) (Li et al. 2018; D'Alessio et al. 2019). Dans ce contexte, les LT recrutés sont orientés vers un phénotype de LT régulateurs ou de LT Th2 notamment grâce à la production d'IL-10 et IL-4. La communication entre LT et macrophages au sein du tissu permet de continuer à orienter les macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire et à réduire l'inflammation, notamment en inhibant le recrutement de nouveaux monocytes et en produisant de l'IL-10 et de l'IL-4. La présence des Treg dans le tissu permet de contrôler l'inflammation à long terme (Bonney et al. 2018). La clairance des cellules apoptotiques et le switch phénotypique des macrophages vers un profil anti-inflammatoire sont indispensables et déterminants pour la progression vers la phase proliférative. Cela conditionne aussi l'issue de la lésion car un prolongement ou un retard de résolution de la phase inflammatoire entraîne la mise en place d'une cicatrice fibrotique (Landén et al. 2016; Wynn & Barron 2010) (Figure 21).

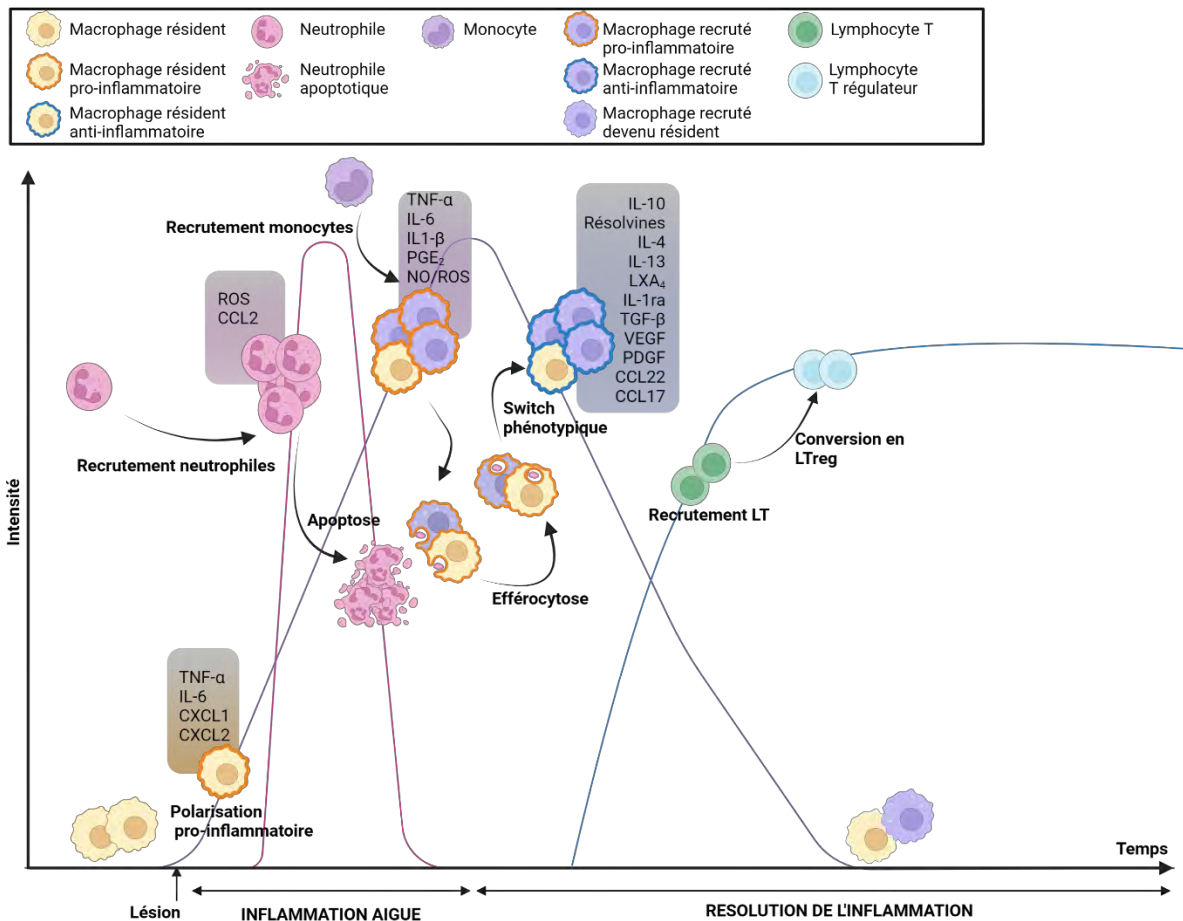


Figure 21 : cinétiques d'apparition des différentes populations immunitaires au cours de l'inflammation aigüe et de la résolution de l'inflammation suite à une lésion tissulaire.

Les macrophages résidents présents dans le tissu s'activent et deviennent pro-inflammatoires. Leurs sécrétions permettent le recrutement des neutrophiles qui à leur tour permettent le recrutement des monocytes. Les monocytes dans le tissu se différencient en macrophages pro-inflammatoires et produisent des médiateurs inflammatoires amplifiant ainsi la réponse inflammatoire. L'excès d'inflammation entraîne l'apoptose des neutrophiles qui sont reconnus par les macrophages. L'efférocytose des neutrophiles apoptotiques entraîne un switch phénotypique des macrophages qui passent d'un statut pro-inflammatoire à un statut anti-inflammatoire permettant la résolution de l'inflammation. Les signaux sécrétés par les macrophages anti-inflammatoires permettent le recrutement des LT et leur conversion en LTreg permettant le maintien à long terme de la résolution de l'inflammation. En parallèle les macrophages dérivés des monocytes circulants acquièrent les propriétés des macrophages et persistent dans le tissu. Inspiré de (Julier et al. 2017). Généré avec BioRender.com

2.2. La prolifération et le rôle des macrophages

Trois à quatre jours après la lésion la phase proliférative se met en place. Elle est caractérisée par la mise en place d'un tissu provisoire, appelé tissu de granulation. C'est un tissu composé principalement de fibroblastes sécrétant de la matrice extracellulaire et richement vascularisé

qui remplace le clou plaquettaire mis en place durant l'hémostase. La reformation des vaisseaux (angiogenèse) est indispensable à l'apport en nutriments et en oxygène de ce tissu pour permettre la survie des cellules. La matrice est une matrice provisoire, réticulée, peu organisée, composée principalement de fibres de collagène de type III, permettant le recrutement et la prolifération des cellules souches stromales, qui contribueront à rétablir la partie fonctionnelle (parenchyme) du tissu (Krafts 2010). Lors de cette phase les macrophages jouent également un rôle primordial. En effet, ils sécrètent du VEGF et du PDGF qui induisent respectivement l'angiogenèse (Berse et al. 1992; Wynn & Vannella 2016) et la prolifération des fibroblastes principaux producteurs de collagène (Shimokado et al. 1985). De plus, ils surexpriment l'Arginase-1, entraînant ainsi la production de proline et de glutamate nécessaires à la formation du collagène (Thompson et al. 2008). Enfin, les macrophages sécrètent également du TGF- β (Murray & Wynn 2011; Lee et al. 2001). Cet environnement induit la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, étape qui marque la transition progressive de la phase proliférative vers la phase de remodelage. Les myofibroblastes sont caractérisés par une augmentation de la production de matrice extracellulaire, notamment de collagène de type I. La transition vers la phase de remodelage est ainsi marquée par le remplacement progressif du collagène fibrillaire de type III constituant la matrice provisoire par du collagène mature de type I, fortement organisé en faisceaux denses et parallèles.

2.3. Le remodelage tissulaire et le rôle des macrophages

La dernière phase de la réparation tissulaire est une phase de remodelage qui permet la différenciation terminale des cellules progénitrices du parenchyme, la maturation et le remaniement de la matrice extracellulaire ainsi que la migration et la différenciation des cellules stromales. Les macrophages jouent un grand rôle dans le remodelage de la matrice via la sécrétion de métalloprotéinases (MPP) et de cathepsine K qui permettent la dégradation du collagène. Ils sécrètent notamment la MMP-9 qui est impliquée dans la dégradation du collagène pulmonaire après une fibrose induite (Cabrera et al. 2007) et la MMP2 qui dégrade le tissu fibreux à la suite d'une fibrose hépatique (Radbill et al. 2011). La sécrétion de cathepsine K est également de bon pronostic pour la réduction de la fibrose pulmonaire (Bühling et al. 2004; Zhang et al. 2011).

De plus, les macrophages jouent également un rôle dans leur dialogue avec les CSM présentes dans les différents tissus (Aurora & Olson 2014; Abnave & Ghigo 2019). En effet, dans le rein, le muscle, le cœur ou le cerveau ils promeuvent la survie, la prolifération et/ou la différenciation de cellules progénitrices grâce à la sécrétion d'un certain nombre de facteurs (TGF- β , IL-10, Wnt7b, IL-6, IL-1 β , TNF- α , IGF-1...) (Freytes et al. 2013; Mounier et al. 2013; Lin et al. 2010; Arnold et al. 2007; Lu et al. 2011; Saclier et al. 2013; Miron et al. 2013).

2.4. Origine des macrophages dans la réparation tissulaire

Les macrophages comme nous venons de le décrire, jouent un rôle primordial dans la mise en place, le déroulement et l'issue de la réparation tissulaire, grâce à leur plasticité qui leur permet de s'adapter à leur environnement et de le modifier en retour pour orchestrer la réparation. L'origine des macrophages au cours des différentes étapes de la réparation n'est pas tout à fait claire. Il semblerait que les macrophages résidents jouent un rôle primordial dans les toutes premières étapes suivant la lésion en envoyant les premiers signaux de détresse. Par la suite, les macrophages dérivés des monocytes circulants sont fortement recrutés, ils envahissent le tissu et deviennent grandement majoritaires lors de la phase aiguë de l'inflammation et exercent leur fonction pro-inflammatoire (Kratofil et al. 2017). En parallèle, les signaux pro-inflammatoires diminuent la prolifération des macrophages résidents (Mu et al. 2021). En revanche, lors de la résolution de l'inflammation les signaux anti-inflammatoires, notamment l'IL-4 produits non seulement par les macrophages mais aussi les LT Th2, peuvent stimuler de nouveau la prolifération des macrophages résidents (Jenkins et al. 2013). Il a été démontré dans la peau, le péritoine, le cerveau, les poumons, le cœur et le foie que les macrophages résidents sont capables durant la phase de résolution de proliférer pour reconstituer une partie du pool de macrophages résidents (Hoyer et al. 2019; Hashimoto et al. 2013; Ajami et al. 2011; Davies et al. 2013; Chorro et al. 2009). Même si la majorité des macrophages dérivés des monocytes circulants meurt du fait de leur courte durée de vie (Janssen et al. 2011; Patel et al. 2017), certains effectuent une conversion phénotypique et acquièrent les caractéristiques de macrophages résidents durant l'inflammation (Yona et al. 2013). C'est le cas notamment lors de l'infarctus du myocarde où les macrophages résidents induisent le recrutement des neutrophiles et des monocytes circulants avant de migrer à distance de l'infarctus. Les monocytes circulants qui rejoignent

le site infarcté sont très pro-inflammatoire (Ly6C^{hi}) dans un premier temps puis une deuxième vague de colonisation de monocytes moins inflammatoires (Ly6C^{low}) apparaît. La déplétion des macrophages embryonnaires résidents (CCR2⁻) induit une aggravation du phénotype cardiaque (hypertrophie cardiaque et altération de la fraction d'éjection) (Bajpai et al. 2019). L'absence de monocytes Ly6C^{low} est aussi associée à la mauvaise réparation cardiaque avec une augmentation de la taille de la cicatrice (Hilgendorf et al. 2014). Les monocytes se différencient ensuite en macrophages résidents avec un profil plutôt inflammatoire et remplacent en partie le pool de macrophages résidents embryonnaires (Rizzo et al. 2022).

La proximité des différents dépôts adipeux avec la plupart des organes et la présence d'une hématopoïèse endogène dans ce tissu capable de générer des macrophages (cf. chapitre II - 2.2.4) pose la question de l'intervention de ces macrophages dans la réparation tissulaire des organes, notamment la réparation cardiaque. En effet, l'hématopoïèse du TA génère également des mastocytes, qui interviennent dans la réparation cardiaque post-infarctus du myocarde, en jouant un rôle bénéfique sur le remodelage cardiaque au contraire des mastocytes d'origine médullaire (Ngkelo et al. 2016).

En outre, au cours de la vie, et à travers les divers challenges rencontrés par les tissus, le pool de macrophages résidents pourrait être peu à peu remplacé par des macrophages dérivés de monocytes circulants. Ces macrophages pourraient avoir de moins bonnes capacités de renouvellement et un phénotype un peu plus inflammatoire que les macrophages résidents. Ceci, pourrait expliquer en partie l'inflammation de bas grade observée avec l'âge et le développement progressif de fibrose dans les différents organes avec le vieillissement.

L'ensemble de ces données, démontre l'importance du système immunitaire dans l'évolution des processus de réparation tissulaire, et notamment des macrophages qui sont indispensables à la régénération chez les organismes doués de régénération. Les macrophages résidents présents chez le mammifère adulte ont également un rôle déterminant dans la cicatrisation et des modifications de leur phénotype peuvent entraîner des complications de la réparation comme la fibrose ou l'absence de cicatrisation (ulcères). Le rôle des macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA dans ces processus est une question encore non explorée.

Etude expérimentale

Dans les tissus les macrophages jouent donc un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et dans le retour à l'homéostasie après une exposition à un pathogène ou une lésion tissulaire. De nombreuses études ont ainsi démontré que l'absence, la modification phénotypique, ou la perturbation de la cinétique d'apparition des macrophages empêche la régénération chez les organismes dotés de cette capacité, et augmente la fibrose chez les organismes qui cicatrisent. Ils sont ainsi indispensables car ils orchestrent l'ensemble des phases nécessaires à la réparation du tissu. L'origine des macrophages a également été démontrée comme déterminante dans l'orchestration de la réparation. **Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle les macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA jouent un rôle différent de celui des macrophages médullaires dans la réparation tissulaire, que ce soit dans le TA ou à distance, et qu'une dérégulation de ce processus est impliquée dans les altérations tissulaires observées avec le vieillissement. Ces différences sont expliquées par des caractéristiques intrinsèques différentes entre ces deux types de macrophages.**

Pour tester ces hypothèses nous avons étudié ces macrophages issus de différentes origines à la fois *in vivo* et *in vitro*. Dans un premier temps, l'objectif de nos travaux a été d'étudier le rôle des macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA *in vivo* dans la réparation endogène du TA puis à distance dans la réparation cardiaque en les comparant aux macrophages médullaires. L'absence de marqueurs spécifiques connus des macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA a nécessité l'utilisation d'un modèle de chimères hématopoïétiques nous permettant de suivre *in vivo* ces macrophages, à la suite d'une ablation massive du TA ou après un infarctus du myocarde. Nous nous sommes ensuite intéressés au vieillissement, caractérisé par une altération de la réparation tissulaire, et nous avons quantifié les proportions des macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA et de macrophages médullaires au cours du temps, toujours dans le modèle de chimères hématopoïétiques. Enfin, pour comparer les propriétés intrinsèques de ces macrophages *in vitro* et nous affranchir du modèle de reconstitution hématopoïétique, nous avons développé un système de culture en 3 dimensions permettant de cultiver et de maintenir en culture les macrophages résidents du TA.

Chapitre I : Etude du rôle des macrophages issus de l'hématopoïèse du TA dans la réparation du TA post-lipectomie et la réparation cardiaque pots-infarctus du myocarde in vivo

1. La construction de chimères hématopoïétique permet le suivi des macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA ou médullaire

Le TA blanc est largement répandu dans le règne animal et joue le rôle de principale réserve énergétique de l'organisme. Chez l'homme, comme chez la souris, le TA blanc est localisé sous forme de dépôts présents dans différents sites anatomiques. Les dépôts les plus importants se retrouvent dans les régions sous-cutanées, intra-abdominales (omental et rétro-péritonéal) et périgonadique (uniquement chez la souris). Il existe d'autres dépôts, notamment autour du cœur (TA péricardique) ou dans la moelle osseuse (TA médullaire). Le TA sous-cutané chez l'Homme est retrouvé sous toute la surface du corps sous forme d'une couche localisée sous le derme alors que chez la souris il est retrouvé sous forme d'un dépôt au niveau inguinal (Figure 22).

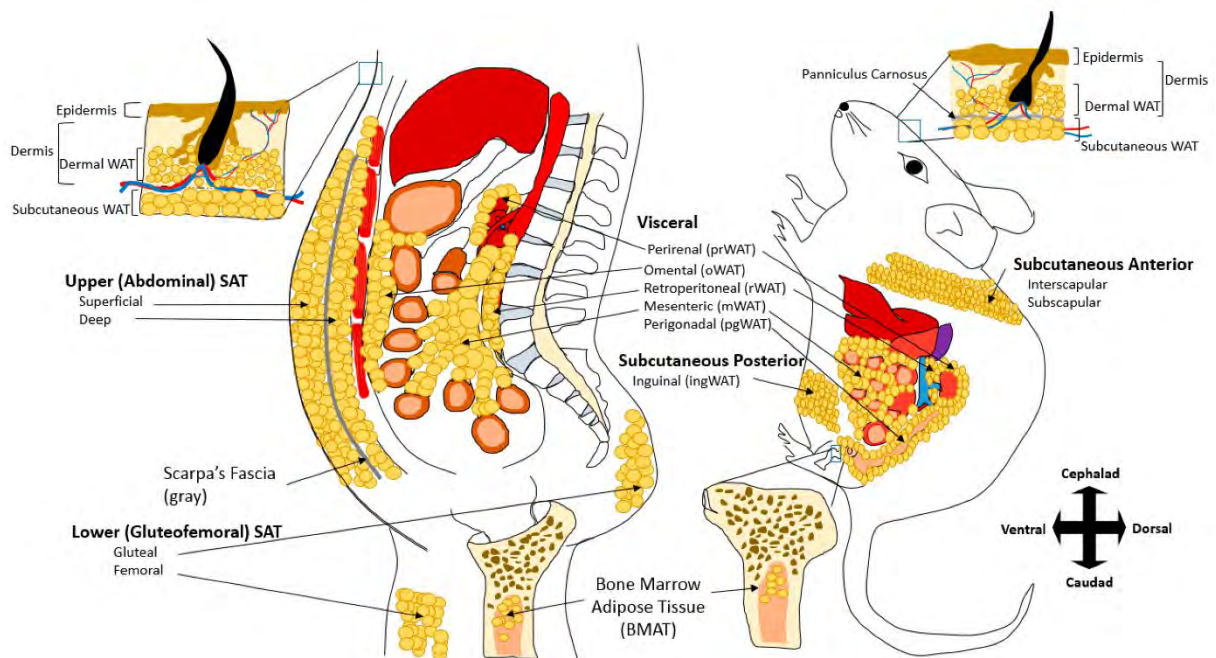


Figure 22 : Les principaux dépôts adipeux blanc chez l'Homme et la souris (Luong et al. 2019)

En dehors de son rôle de stockage des acides gras, et d'organe endocrine, le TA blanc héberge également une hématopoïèse (Introduction, Chapitre I, 3.2) productrice de cellules immunitaires. Les macrophages sont les cellules immunitaires les plus abondantes dans le TA, puisqu'ils représentent plus de 40% de la fraction des cellules immunitaires dans un tissu sain. Ces macrophages proviennent de l'hématopoïèse endogène du TA mais également de macrophages dérivés des monocytes circulants issus de l'hématopoïèse médullaire et il n'existe à ce jour, pas de marqueur spécifique pour les distinguer (Figure 23).

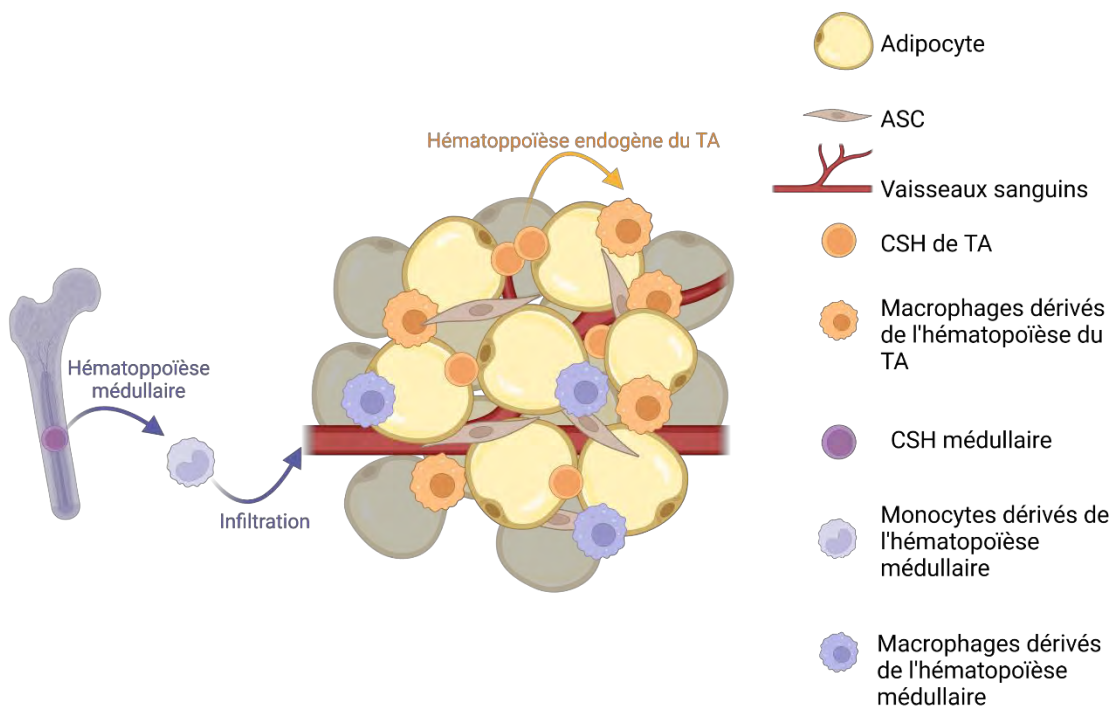


Figure 23 : la composition en macrophages du TA

Généré avec BioRender.com

Dans ce contexte, l'étude de ces cellules *in vivo* est complexe et a nécessité la génération de chimères hématopoïétiques. Nous avons en effet travaillé sur un modèle de reconstitution hématopoïétique établi au laboratoire, et permettant le suivi des cellules dérivées de l'hématopoïèse du TA ou de l'hématopoïèse médullaire. Pour cela, nous avons trié des CSH à partir de TA sous-cutané ou de MO provenant de souris donneuses exprimant la dTomato (dT) de manière constitutionnelle (dT⁺) sous le contrôle du promoteur Rosa26 (ubiquitaire). Les CSH (dT⁺) de TA ou de MO ont ensuite été co-injectées avec des cellules de MO totales issues de souris C57Bl/6 à des souris receveuses irradiées létalement. L'injection

de cellules de MO totale permet la survie des animaux irradiés. Dans ce modèle de reconstitution hématopoïétique, le compartiment immunitaire des souris chimères est reconstitué au bout de 6 à 8 semaines post-irradiation.

Au terme de ces 6 à 8 semaines, 2 types de souris chimères sont donc obtenues (Figure 24) :

- Des souris transplantées avec des CSH dT^+ du TA, et dont une partie des macrophages est dT^+ et dérive de l'hématopoïèse du TA, et l'autre partie dT^- dérive de la MO (chimères TA)
- Des souris transplantées avec des CSH dT^+ de la MO, dont l'ensemble des macrophages dérive de l'hématopoïèse médullaire (chimères MO) et qui sont donc dépourvues de macrophages dérivées de l'hématopoïèse endogène du TA.

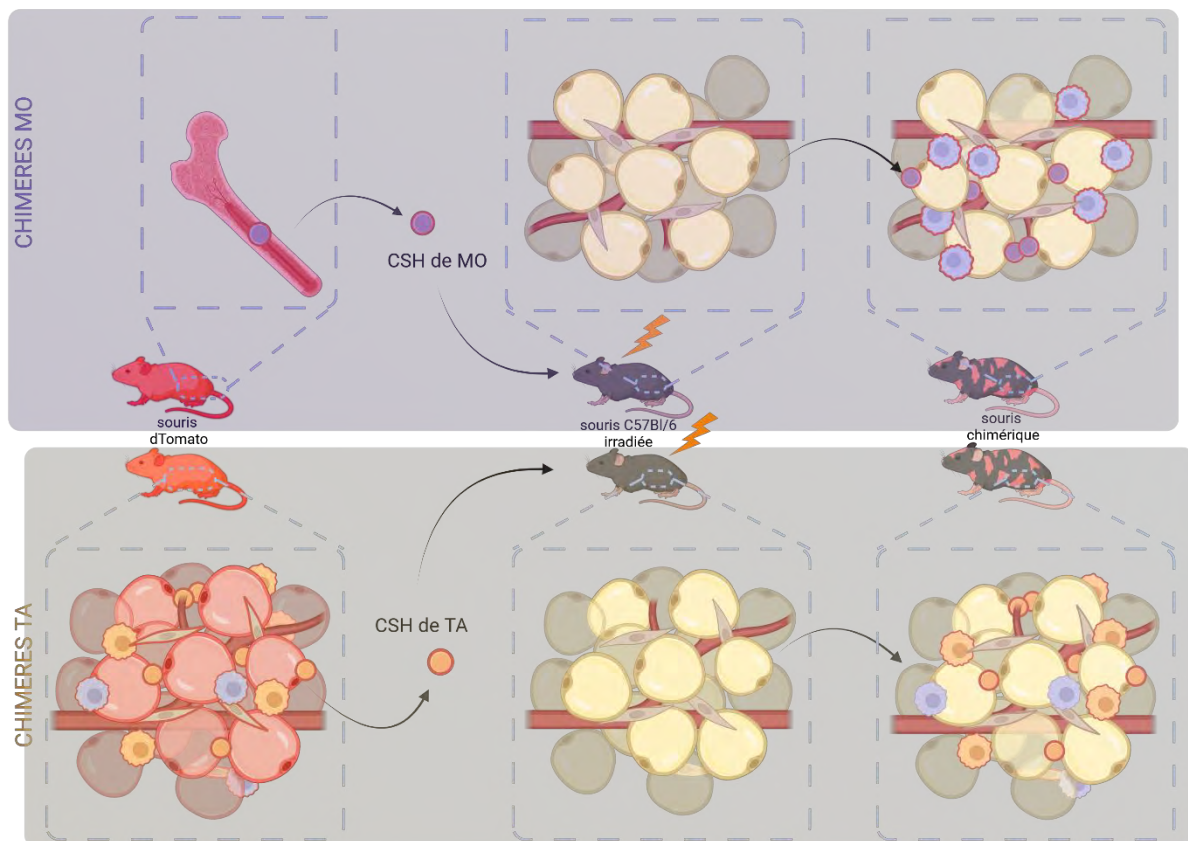


Figure 24 : Schéma représentatif des deux types de constructions de chimères hématopoïétiques (TA ou MO)

Les CSH de MO ou de TA de souris dTomato sont triées puis injectées à des souris C57Bl/6 létalement irradiées. Après 6 semaines, les souris sont reconstituées et possèdent un TA contenant une population de macrophages soit uniquement dérivés de l'hématopoïèse de la MO (chimère MO, en haut) soit dérivés à la fois de l'hématopoïèse du TA ($dTomato^+$) et de l'hématopoïèse médullaire (non marqués) (chimères TA, en bas). Généré avec BioRender.com

Nous avons également généré un modèle de chimères dans le but de dépléter spécifiquement les macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA ou de la MO. Dans ce modèle, les souris donneuses expriment le récepteur à la toxine diphtérique (DT) sous le contrôle du promoteur CD11c. De la même manière que précédemment, les CSH sont triées à partir de TA ou de MO et co-injectées avec des cellules de MO totale dans des souris receveuses irradiées létalement. Dans ce modèle, l'injection de DT entraîne la déplétion des cellules exprimant le CD11c (Jung et al. 2002). Les travaux antérieurs du laboratoire ont montré que dans le TA, les cellules CD11c⁺ sont principalement des macrophages (Luche et al. 2017). L'injection de DT permet donc la déplétion spécifique des macrophages dérivés de l'hématopoïèse endogène du TA ou de celle de la MO. Dans ce type de reconstitution, les souris donneuses sont CD11c-DTR/dT⁻ et les souris receveuses irradiées sont dT⁺. Les cellules immunitaires dérivées des CSH transplantées sont donc dT⁻. L'injection de toxine diphtérique chez les chimères reconstituées permet donc de générer deux types de chimères (Figure 25):

- Des chimères MO-DTR dont les macrophages dérivés de l'hématopoïèse médullaire sont déplétés
- Des chimères TA-DTR dont les macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA sont déplétés

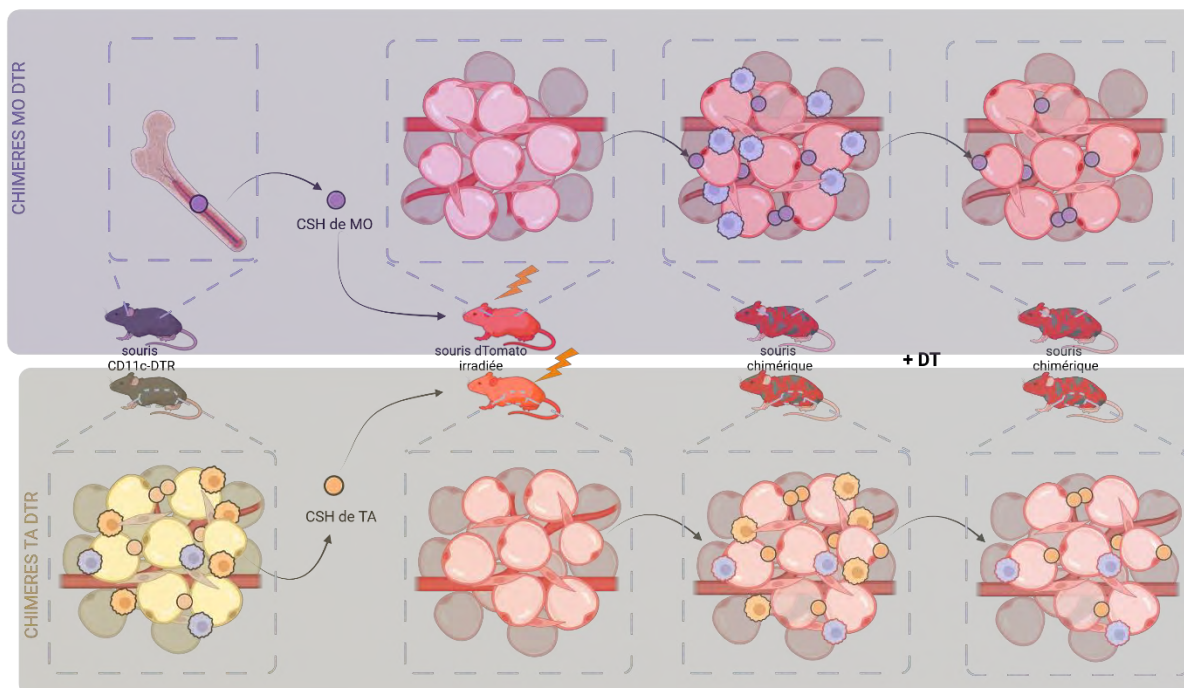


Figure 25 : Schéma représentatif des deux types de constructions de chimères hématopoïétiques permettant la déplétion des macrophages (TA-DTR ou MO-DTR)

Les CSH de MO ou de TA de souris CD11c-DTR sont triées puis injectées à des souris dTomato⁺ létalement irradiées. Après 6 semaines, les souris sont reconstituées et possèdent un TA contenant soit uniquement de macrophages dérivées de l'hématopoïèse de la MO (chimère MO-DTR, en haut) soit des macrophages dérivés à la fois de l'hématopoïèse du TA (non marqués) et de l'hématopoïèse médullaire (dTomato⁺) (chimères TA, en bas). L'injection de Toxine Diphtérique (DT) entraîne la déplétion des macrophages non marqués par la dTomato. Généré avec BioRender.com

2. Etude du rôle des macrophages dans différents contextes de lésion aiguë

2.1. Les modèles de lésion tissulaire

Comme présenté dans l'introduction, la capacité de régénération des tissus semble avoir été perdue au cours de l'évolution. En effet, le mammifère adulte ne régénère que dans de très rares cas (souris MRL par exemple). Cette capacité de régénération semble en étroite lien avec le système immunitaire et son évolution. En outre, de nombreuses études ont été menées sur les organismes dotés de capacité de régénération et les macrophages ont été démontré

comme étant des acteurs essentiels de la régénération (Petrie et al. 2015; Gibbons et al. 2011; Julier et al. 2017) .

Nous avons étudié l'implication des macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA dans les processus de réparation, non seulement au sein du TA mais aussi à distance dans un modèle de réparation cardiaque.

2.1.1. Modèle de régénération induite dans le TA inguinal sous-cutané chez la souris C57Bl/6 et les chimères hématopoïétiques (la lipectomie)

Afin d'étudier, l'importance des macrophages dans la réparation du TA nous avons utilisé un modèle de lésion développé au laboratoire et qui conduit soit à une régénération soit à une cicatrisation (Labit et al. 2018).

Ce modèle (appelé lipectomie) consiste en une ablation massive (30 à 40%) du TA sous cutané inguinal de souris C57Bl/6 (de l'aîne au nœud lymphatique) (Figure 26). La réparation spontanée de la lésion est une cicatrisation. La régénération du TA sous-cutané est induite par injection de Naloxone méthionine (NaIM) au moment et après la lipectomie, au niveau du site de lésion (1 fois par jour pendant 4 jours). Afin d'étudier le rôle des macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA dans la capacité de régénération du TA des souris, ces expériences ont été menées sur les deux types de chimères hématopoïétiques présentées ci-dessus.

Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle la phase précoce de l'inflammation et notamment les macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA jouent un rôle indispensable dans la régénération du TA après lipectomie.

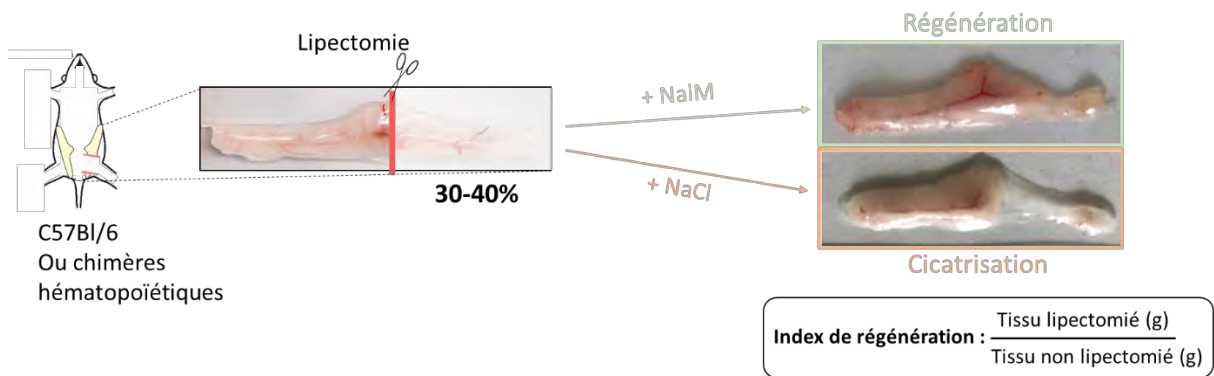


Figure 26 : Modèle de lipectomie et d'induction de la régénération ou de la cicatrisation

La lipectomie représentant une ablation de 30 à 40% du TA sous-cutané est réalisée sur des souris C57Bl/6 ou chimériques. Puis l'injection de NalM entraîne la régénération et de NaCl (Chlorure de sodium) entraîne la cicatrisation (contrôle). La régénération est mesurée grâce à l'index de régénération.

2.1.2. Modèle de l'infarctus du myocarde

En parallèle, nous nous sommes intéressés à un autre modèle de lésion, l'infarctus du myocarde (IM), dans un contexte physiologique et chez des animaux diabétiques. En effet, il a été montré qu'à la suite d'un infarctus du myocarde, plusieurs populations de cellules myéloïdes, parmi lesquelles les macrophages et les mastocytes, sont recrutées sur le site de la lésion et participent au processus de réparation et de remodelage cardiaque. De plus, dans un contexte de diabète de type 2, ces cellules immunitaires présentes dans le cœur adoptent un profil pro-inflammatoire et deviennent alors néfastes pour la réparation tissulaire. Enfin, des travaux réalisés au laboratoire montrent d'une part que les mastocytes dérivés de l'hématopoïèse du TA participent au remodelage cardiaque après infarctus (Ngkelo, 2016), et d'autre part que cette hématopoïèse du TA est perturbée avec la mise en place d'un diabète de type 2, ce qui conduit à la production de cellules inflammatoires. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle le TA pourrait participer au processus de remodelage cardiaque via la production de macrophages, et que le dysfonctionnement de l'hématopoïèse endogène du TA chez le sujet diabétique contribuerait à une perturbation de ce remodelage.

Pour tester cette hypothèse, nous avons induit un infarctus du myocarde par ligature de l'artère descendante gauche chez des souris chimères nourries avec un régime contrôle ou

gras (HFD) pendant 2 mois (Figure 27). La mesure de la fraction d'éjection a été mesurée dans le ventricule gauche grâce à la formule suivante : Fraction d'éjection = (volume de sang en fin de diastole – volume de sang en fin de systole) / volume de sang en fin de systole

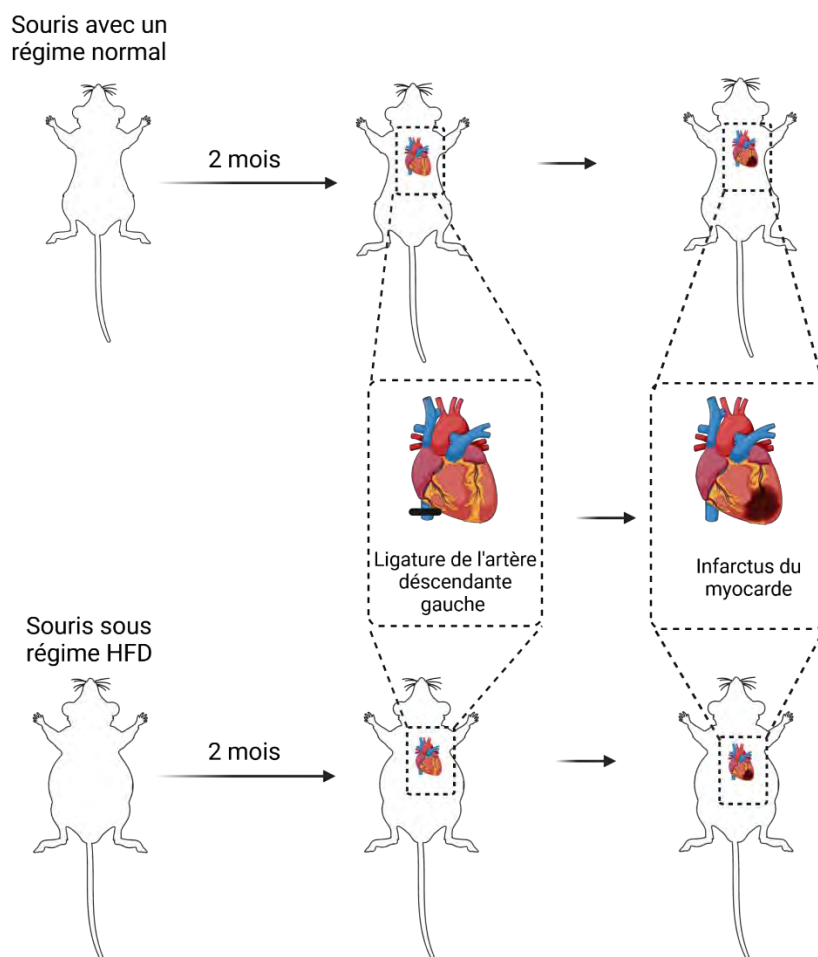


Figure 27 : Modèle de l'infarctus du myocarde et de l'induction du diabète

Des souris C57Bl/6 ou chimères sont nourries avec un régime gras ou normal pendant 2 mois, puis elles subissent une ligature de l'artère descendante gauche induisant l'infarctus du myocarde. Généré avec BioRender.com

2.2. Résultats

Les résultats de ces deux articles montrent que le TA peut être considéré comme un réservoir de macrophages capables de participer à un processus de réparation/régénération tissulaire à la suite d'une lésion aiguë, dans le TA ou à distance. Cependant, alors que ces macrophages dérivés de l'hématopoïèse endogène du TA ont un effet bénéfique dans la régénération du

TA, leur intervention à distance dans le cœur entraîne un excès de fibrose associé à une mauvaise récupération fonctionnelle des capacités cardiaques. De plus, dans des conditions diabétiques qui aggravent la fonction et le remodelage cardiaques post-ischémique, le TA n'est plus utilisé comme réservoir de macrophages inflammatoires.

Le rôle indispensable des macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA dans la régénération du TA est démontré par la comparaison des deux types de chimères. En effet, les chimères-MO qui ne possèdent plus de macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA perdent la capacité de régénérer. De plus, nos résultats montrent que la régénération est associée à une capacité accrue d'efférocytose des macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA par rapport aux macrophages médullaires qui infiltrent le tissu lors de la lésion. En effet, lorsque l'efférocytose des neutrophiles par les macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA est bloquée (anticorps anti-TIM4), les souris sont incapables de régénérer. A l'inverse, l'induction de la régénération s'accompagne d'une augmentation de l'efférocytose et de la clairance des neutrophiles uniquement dans les chimères TA.

Dans le contexte de la réparation cardiaque, les macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA infiltrent le cœur après un infarctus du myocarde comme les macrophages médullaires. Ils présentent des caractéristiques pro-inflammatoires et sont de mauvais pronostic pour la réparation cardiaque. En effet, la déplétion des macrophages quelle que soit leur origine induit une amélioration de la réparation cardiaque. Chez des animaux diabétiques, les macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA ne sont plus recrutés sur le site de la lésion, suggérant que la mauvaise réparation cardiaque observée dans ces conditions physiopathologiques n'est pas due à ces macrophages et à la perturbation de l'hématopoïèse endogène du TA.

2.3. Conclusion

L'ensemble de ces résultats montre que les macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA interviennent dans les processus de réparation tissulaire localement ou à distance. Leur intervention à distance remet en question le dogme selon lequel, l'ensemble des macrophages recrutés qui interviennent lors d'une lésion proviennent tous de la MO. Ils sont

également, comme les autres populations de macrophages, sensibles à leur environnement, et peuvent présenter des fonctions différentes selon leur localisation. En effet, dans leur tissu de résidence, ils sont indispensables à la régénération du tissu suggérant qu'ils permettent une meilleure résolution de l'inflammation que les macrophages médullaires. Alors que lors de leur intervention à distance dans un environnement inflammatoire ils présentent un phénotype inflammatoire délétère pour la réparation cardiaque.

Ces résultats nous ont amenés à nous intéresser au vieillissement. En effet, le vieillissement s'accompagne dans plusieurs tissus d'une diminution de la population de macrophages résidents au profit de macrophages dérivés de monocytes circulants (Duong et al. 2021), corrélée à une altération de la réparation tissulaire. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle cette altération de la réparation tissulaire serait due à une disparition progressive des macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA, ou à une altération de leurs fonctions.

Article 1 : Driving regeneration, instead of healing, in adult mammals : the decisive role of resident macrophages through efferocytosis

ARTICLE OPEN



Driving regeneration, instead of healing, in adult mammals: the decisive role of resident macrophages through efferocytosis

Lise Rabiller^{1,5,8}, Virginie Robert^{1,8}, Adèle Arlat^{1,6,9,9}, Elodie Labit^{1,7,9}, Marielle Ousset^{1,6}, Marie Salon^{2,6}, Agnès Coste^{2,6}, Léa Da Costa-Fernandes^{1,6}, Paul Monsarrat^{1,6}, Bruno Ségui³, Mireille André^{1,6}, Christophe Guissard^{1,6}, Marie-Laure Renoud^{1,6}, Marine Silva⁴, Gilles Mithieux⁴, Isabelle Raymond-Letron^{1,6}, Luc Pénicaud¹, Anne Lorsignol^{1,6}, Louis Casteilla^{1,6}, Cécile Dromard Berthézène^{1,6} and Béatrice Cousin^{1,6}✉

Tissue repair after lesion usually leads to scar healing and thus loss of function in adult mammals. In contrast, other adult vertebrates such as amphibians have the ability to regenerate and restore tissue homeostasis after lesion. Understanding the control of the repair outcome is thus a concerning challenge for regenerative medicine. We recently developed a model of induced tissue regeneration in adult mice allowing the comparison of the early steps of regenerative and scar healing processes. By using studies of gain and loss of function, specific cell depletion approaches, and hematopoietic chimeras we demonstrate here that tissue regeneration in adult mammals depends on an early and transient peak of granulocyte producing reactive oxygen species and an efficient efferocytosis specifically by tissue-resident macrophages. These findings highlight key and early cellular pathways able to drive tissue repair towards regeneration in adult mammals.

npj Regenerative Medicine (2021)6:41 | <https://doi.org/10.1038/s41536-021-00151-1>

INTRODUCTION

Repair processes following tissue injury result either in regeneration or in scar formation. Whereas scar healing commonly leads to the loss of functional tissue and fibrous scar development, regeneration completely recapitulates the original tissue architecture and function. The understanding of the control of repair outcome is, therefore, a concerning challenge for regenerative medicine¹.

Regeneration has mostly been studied in lower vertebrates and in newborn mammals, since adult mammals do not regenerate, and instead heal tissue damages with a scar except in specific strains such as the spiny mouse² or the MRL/MPJ mouse³. Most of the studies dealing with tissue repair in adult mammals thus recapitulate the healing process and not regeneration. In a recently developed model of tissue lesion, relying on massive resection of the subcutaneous fat pad, we have been able to induce adipose tissue (AT) regeneration in adult mice. By using this model to compare the regenerative and scar healing processes, we demonstrated that regeneration is controlled through the generation of an early, large, and transient peak of reactive oxygen species (ROS)⁴. Because ROS act as both signaling molecules and mediators of inflammation⁵, our findings suggested a peculiar role of the inflammatory process in tissue regeneration in adult mammals as it has been demonstrated in lower vertebrates⁶.

At a cellular scale, granulocytic neutrophils and macrophages are the key players in the inflammatory process. In both lower vertebrates and mammals, no study has yet demonstrated the role of neutrophils in regeneration. In contrast, macrophages have been involved in regeneration in salamander⁷, neonatal mice in a

myocardial infarction model⁸, as well as in adults in a digitip amputation context or in *Acomys* mice⁹. The phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages via a process called efferocytosis is one of the main mechanisms contributing to the resolution of inflammation in physiological situations¹⁰. This overall process is partly orchestrated by pro- and anti-inflammatory cytokines as well as eicosanoids such as prostaglandins and leukotrienes that therefore contribute to control tissue repair¹¹.

Recent studies have highlighted the complexity of the macrophage population, by identifying the roles of functionally distinct macrophage subsets in tissue homeostasis and tissue repair^{12–15}. Indeed, bone marrow (BM) derived monocytes recruited after tissue lesion are pro-inflammatory and exhibit tissue-destructive activity, whereas tissue-resident populations are pro-resolutive and drive tissue repair¹⁶. Like other adult tissues, the AT hosts distinct populations of macrophages displaying unique tissue distributions, transcriptional profiles, and functions and have distinct origins^{17,18}. Among the origins, we have demonstrated that in adult mice, AT-macrophages belong to a specific and quantitatively significant hematopoietic process, relying on the presence of peculiar hematopoietic stem cells inside the AT^{19,20}. Interestingly, disruption of endogenous AT hematopoiesis leads to inflammatory macrophages production that specifically contributes to chronic inflammation and AT dysfunction in contrast to macrophages derived from the BM²¹. These results suggest that in the AT, macrophages may promote beneficial or detrimental effects on tissue homeostasis depending on their local or medullar origin.

We thus hypothesized here that the early inflammatory phase following injury is crucial in the tissue repair outcome and we

¹STROMALab, Université de Toulouse, CNRS ERL5311, EFS, ENVT, Inserm U1031, UPS, Toulouse, France. ²UMR 152 Pharma Dev, Université de Toulouse, IRD, UPS, Toulouse, France. ³UMR 1037, Centre de recherche en cancérologie de Toulouse (CRCT), Université de Toulouse, INSERM, UPS, Toulouse, France. ⁴Inserm U1213, Université Lyon 1, Villeurbanne, France. ⁵Present address: Department of Physiology and Cell Information Systems, McGill University, Montreal; Alan Edwards Center for Research on Pain, McGill University, Montreal, QC, Canada. ⁶Present address: RESTORE Institute, UMR 1301-Inserm 5070-CNRS EFS Univ. P. Sabatier, Toulouse, France. ⁷Present address: Department of Comparative Biology and Experimental Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, Calgary, AB, Canada. ⁸These authors contributed equally: Lise Rabiller, Virginie Robert. ⁹These authors jointly supervised this work: Adèle Arlat, Elodie Labit. ✉email: beatrice.cousin@inserm.fr

investigated the precise role of granulocytes and macrophages in tissue regeneration in adult mammals with a focus on macrophage origin. By using *in vivo* gain or loss of function studies, we show here that a rapid and transient peak of ROS-producing granulocytes is required for regeneration. In addition, macrophages derived from AT-hematopoiesis direct the repair process towards regeneration due to their efficient efferocytosis, in contrast to medullar macrophages that nurture inflammation and thus promote scar healing.

RESULTS

Regenerative healing is characterized by an early and transient inflammation

To analyze the role of the inflammatory response in the outcome of tissue lesion, we used the previously validated model of subcutaneous AT (scAT) resection⁴. Massive resection of scAT followed by treatment with NaCl or Naloxone Methiodide (NalM), an antagonist of opioid receptors, resulted in scar healing or regeneration, respectively, one month post-resection as previously described⁴. As expected and compared to NaCl (control) mice that exhibit scar healing, NalM treatment-induced macroscopic scAT regeneration (Fig. 1a) is associated with an increased weight ratio between the resected scAT and its contralateral uninjured counterpart (Fig. 1b). Regeneration was associated with the presence of unilocular fully differentiated adipocytes and new vessel formation as revealed by BODIPY and lectin staining, respectively (Fig. 1c). In contrast, scar healing was characterized by strong collagen fibers deposition as revealed by Second-Harmonic Generation imaging, and the absence of adipocyte differentiation (Fig. 1c).

We first determined the temporal and dynamic inflammatory response to surgical tissue resection in both scar (NaCl) and regenerative (NalM) healing conditions. Compared to scar healing, regenerative condition was characterized by a significant and transient increase in the expression of pro-inflammatory cytokines such as interleukin (Il)1 β , Il6 and tumor necrosis factor- α (Tnfa) as well as anti-inflammatory cytokines such as transforming growth factor- β (Tgf β) and Il10, 6 h post-resection, in the resection plane (Fig. 1d). This upregulation of pro- and anti-inflammatory cytokines was associated with a significant increase in expression of enzymes involved in the production of pro-inflammatory lipid mediators (Cox-2, Pge2 synthase), and to a lesser extent in Pgd2 synthase but not in the expression of enzymes involved in the leukotriene production (Alox5, Lta4h) (Fig. 1e). The induction of Cox-2 and Pge2 synthase expression was reflected by an increased ratio between prostaglandins (PG) E2 and D2 12 h post-resection (Fig. 1f). We then used heatmap visualization (Fig. 1g) and principal component analysis (PCA) (Fig. 1h-j) to determine whether regenerative and scar healing conditions can be characterized by a global gene signature. The heatmap of the expression of 12 genes (cytokines and lipid mediator synthesis enzymes) 6 h post-resection (Fig. 1g), highlighted a differential expression pattern between regenerative and scar healing conditions. PCA was then used to reduce the dimensionality of the dataset while retaining most of its original variability. Consequently, we reduced a set of correlated variables (the gene expressions) into fewer uncorrelated variables (the dimensions). The projection of the data into this new set of dimensions revealed a clear clustering between the two groups on the first and second dimensions 2 and 6 h post-resection (Fig. 1h, i), although the discrimination is clearer at 6 h than at 2 h post-resection between regenerative and scar healing conditions, as revealed by the principal components that account for 67% of the variability of the data at 2 h post-resection while it accounts for 75% at 6 h post-resection (Fig. 1h, i). Interestingly this clustering completely disappears 12 h post-resection (Fig. 1j). We thus

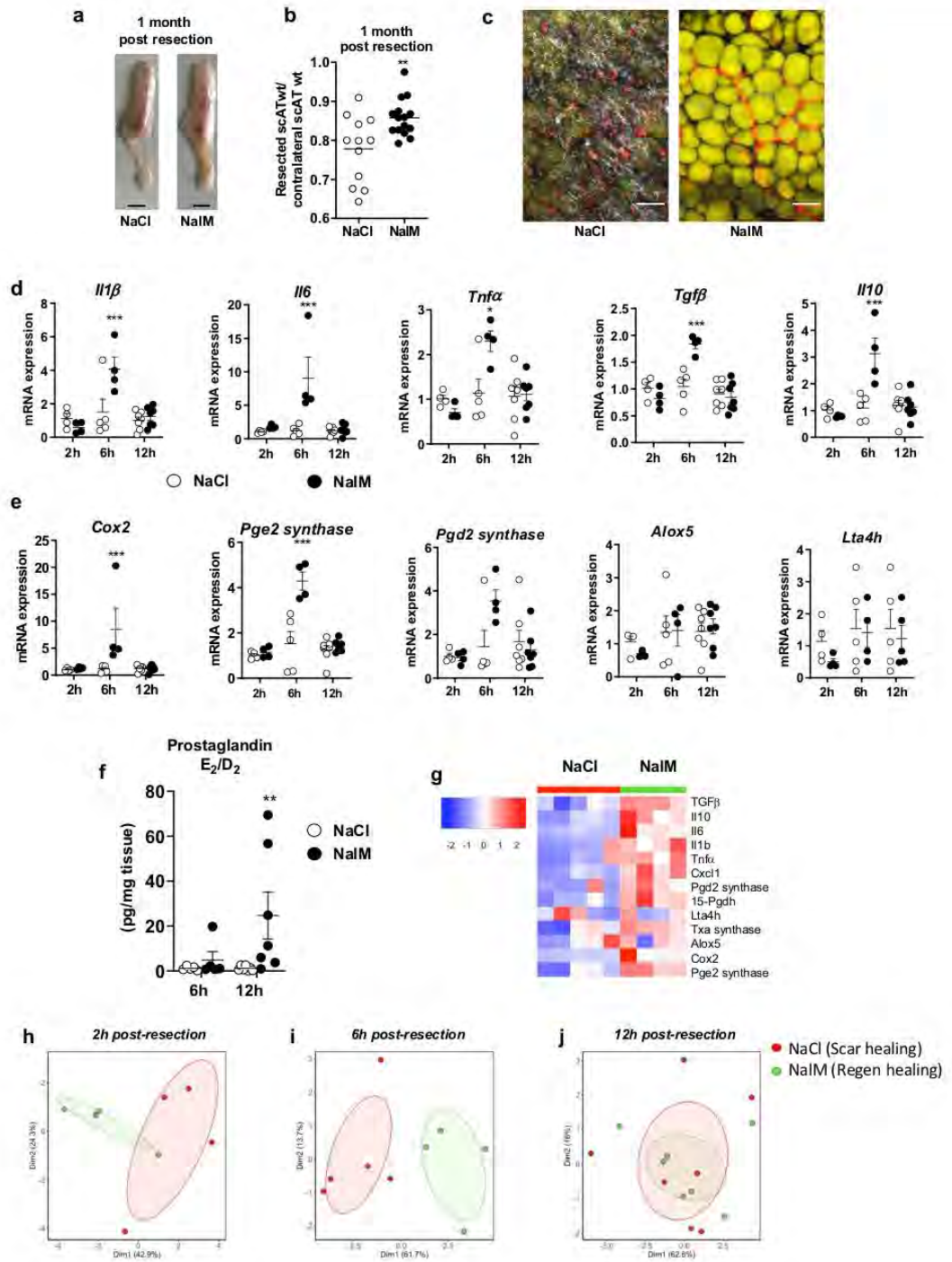
demonstrated here that an early but transient inflammation is associated with regeneration, and that a specific pattern of gene expression 6 h post-resection may be predictive of the regenerative outcome.

Regenerative healing depends on ROS production by neutrophils

The early inflammation was associated with an infiltration of the resection plane by small round leukocytes, of typical granulocytic neutrophil morphology (segmented or ringform nucleus with condensed chromatin and pale cytoplasm) (Fig. 2a, zoom). The granulocytic infiltration was observed in both the connective tissue and in the scAT (mainly as intravascular leukostasis and perivascular cuffings) in the resection plane (Fig. 2a), as demonstrated by histological evaluation. The nature of infiltrating leukocytes was confirmed by flow cytometry. Both neutrophils and monocytes were identified as CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁻/Ly6G⁺/Ly6C⁻ and CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁻/Ly6G⁻/Ly6C⁺, respectively (Fig. 2b), following the gating strategy shown in Supplementary Fig. 1a. Neutrophils, but not monocytes, increased in the resection plane 6 h post-resection in regenerative compared to scar healing conditions (Fig. 2a, b). Moreover, the expression of Cxcl1, a chemokine that in parallel to TNF α induces the infiltration of neutrophils²², was significantly and transiently increased in the injured scAT during regeneration (Fig. 2c).

To unravel the role of granulocytes in the NalM-induced regeneration process, their specific depletion was undertaken *in vivo* using an anti-Gr1 blocking antibody. We first verified that Gr-1 antibody revealed mainly monocytes and neutrophils (Supplementary Fig. 2a) and that anti-Gr1 injection induced a drastic and specific depletion in granulocyte, and especially neutrophils (Ly6G⁺) population in the scAT *in vivo* from 24 to at least 72 h after injection (Supplementary Fig. 2b, c). ScAT resection was thus performed 24 h after anti-Gr1 injection. ROS production quantified 6 h post-resection was significantly decreased in the injured scAT after anti-Gr1 treatment (Fig. 2d, e), and return to basal values (dotted line). This significant decrease in ROS production was associated with inhibition of regeneration quantified 4 weeks post-resection (Fig. 2f). Indeed, the weight ratio between resected and contralateral scAT returned to values observed in scar healing conditions (Fig. 2g). These data demonstrate for the first time that the ROS required for regeneration are produced by granulocytes. In addition, ROS production was quantified *in vivo* by using luminol that enables bioluminescence imaging of myeloperoxidase activity²³ suggesting that ROS production post-resection depends mainly on neutrophils.

In parallel, ROS production was quantified *in vitro* in scAT-Gr1⁺ and Gr1⁻ cells sorted 6 h post-resection, from mice previously treated or not with NalM. In contrast to scAT-Gr1⁻ cells (data not shown), scAT-Gr1⁺ cells were able to produce ROS (Fig. 2h). In addition, when sorted from NalM-treated mice, scAT-Gr1⁺ cells exhibited a significantly higher ROS production than scAT-Gr1⁺ cells sorted from NaCl-treated mice (Fig. 2h) thus confirming the results obtained *in vivo*. NalM being an antagonist of μ opioid receptors, mice knock out for the μ opioid receptor (μ KO mice), and therefore unable to respond to endogenous opioids through activation of this receptor subtype, were subjected to scAT resection before Gr1⁺ cell sorting from resection plane 6 h post-resection. ROS production was significantly higher in scAT-Gr1⁺ cells sorted from μ KO mice compared to NaCl-treated mice but remained slightly lower than the production quantified in scAT-Gr1⁺ cells sorted from NalM treated mice (Fig. 2h). In order to confirm the involvement of μ receptors in the NalM effect, Gr1⁺ cells were treated with DAMGO, a selective μ opioid receptor agonist, that reverses the inhibitory effect of NalM. In this condition, the ROS production by Gr1⁺ cells sorted from NalM



mice was inhibited (Supplementary Fig. 2d) suggesting again a direct effect of opioids on granulocytes through μ opioid receptors. Interestingly, this high ROS production is associated with a spontaneous scAT-regeneration after resection in μ KO mice (Fig. 2i), the weight ratio between resected and contralateral scAT

being similar in μ KO and NaIM-treated mice and significantly higher than in NaCl-treated mice (Fig. 2j). Altogether, these results demonstrate that through a direct effect on μ opioid receptors, NaIM-induced ROS production by granulocytes determines tissue repair outcome.

Fig. 1 Regenerative healing is characterized by early and transient inflammation. **a** Representative pictures of scAT 1 month post-resection and NaCl (scar healing condition) or NaIM (regenerative condition) treatment (scale bar: 0.5 cm). **b** Weight ratio between resected and contralateral scAT 1 month post-resection in NaCl or NaIM-treated mice ($n = 12-15$ per group). **c** Representative pictures of resection plane area in NaCl and NaIM treated mice one month post-resection. Adipocytes (yellow) were stained with Bodipy and vessels (red) with in vivo Lectin injection. Collagen fibers (gray) were imaged using a second harmonic generation (SHG) signal. Images were obtained using maximum intensity projections of 23 stack images. (scale bar: 50 μm). **d, e** Quantification by RTqPCR at 2 h, 6 h, and 12 h post-resection of mRNA encoding cytokines (Interleukin 1 β , 6 (*Il1 β* , *Il6*), Tumor Necrosis Factor α (*Tnfa*), Transforming Growth Factor β (*Tgfb*)) and interleukin 10 (*Il10*) (**d**) and enzymes involved in lipid mediator synthesis (Cyclooxygenase 2 (*cox2*), Prostaglandin E2 synthase (*Pge2 synthase*), Prostaglandin D2 synthase (*Pgd2 synthase*), Arachidonate 5-lipoxygenase (*Alox5*) and Leukotriene A4 Hydrolase (*Lta4h*)) (**e**) in SVF isolated from the injured scAT of NaCl or NaIM treated mice ($n = 4-6$ per group). **f** Quantification of PGD₂ and PGE₂ metabolites in the exudate of the resection plane of NaCl or NaIM treated mice, 6 and 12 h post-resection. Results are expressed as a ratio between PGD₂ and PGE₂ metabolites ($n = 5-7$ per group). **g** Heatmap performed on 14 standardized gene expressions, 6 h post-resection. The dendrogram performed according to the Ward method was able to cluster between scar and regenerative healing conditions. Principal component analysis performed at 2 h (**h**) 6 h (**i**) and 12 h (**j**) post-resection on standardized gene expression. Individuals with scar healing and regenerative healing signatures were colored in red and green, respectively. Data are represented as mean \pm SEM. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ between scar and regenerative healing conditions). NaIM naloxone methiodide, scAT subcutaneous adipose tissue, SVF stromal vascular fraction, wt weight.

Efficient efferocytosis of neutrophils by CD11c⁺ macrophages is required for regeneration

One of the mechanisms by which granulocytes (neutrophils and monocytes) are involved in tissue repair is their transition to apoptosis followed by their clearance by macrophages (efferocytosis)¹⁰. We thus focused on the resolution phase of inflammation following scAT resection with or without NaIM treatment, and performed a time-course study of the inflammatory cell populations during 72 h following resection, focusing on neutrophils (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁻/Ly6C⁻/Ly6G⁺), monocytes (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁻/Ly6C⁺/Ly6G⁻) and macrophages (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁺/Ly6G⁻) following the gating strategy shown in Supplementary Fig. 1b. The resection led to an early peak (6 h) of neutrophils followed by a rapid return to basal values in the resection plane in regenerative condition, whereas the increase in neutrophils number was delayed (24 h) and persisted for 72 h post-resection in scar healing condition (Fig. 3a). The monocyte number remained low in regenerative conditions while it increased in scar healing mice 24 h post-resection and returned to basal values thereafter (Fig. 3b). The total macrophage number increased following resection, with a maximum observed at 24 h, then reaching a plateau, and no significant differences were observed between the two conditions (Fig. 3c). Most of the macrophages in the resection plane 24 h post-resection were producing IL-6 (Fig. 3d, e), and a smaller proportion was producing TNF α and IL-10 (Fig. 3d, e). The percentage of IL-6-producing macrophages was significantly lower in regenerative than in scar healing conditions, while the opposite was observed for TNF α -producing macrophages (Fig. 3e). Macrophage efferocytosis capacity was then assessed in vivo in regenerative or scar healing conditions. To this end, isolated and CMTMR-labeled neutrophils were injected in vivo 3 h before resection. Neutrophil viability was evaluated by annexin V staining. All CMTMR⁺ neutrophils were alive before injection, while most of them were apoptotic (Annexin V⁺) at the time of efferocytosis analysis (Supplementary Fig. 3a). Macrophages having or not engulfed neutrophils were then visualized (Fig. 3f) and quantified in the resection plane 17 h post-resection, a time-point corresponding to the progressive decrease in neutrophil number in regenerative conditions (Fig. 3a). The percentage of efferocytic macrophages was significantly higher in regenerative than in scar healing conditions (Fig. 3g). To test whether efficient efferocytosis was required for regeneration, inhibition of efferocytosis was performed in regenerative conditions by using an anti-TIM4 blocking antibody that disrupts the interaction between apoptotic cells and macrophages²⁴. Isotype was used as a control. Treatment with anti-TIM4 antibody in regenerative conditions induced a drastic decrease in the percentage of efferocytic macrophages that returned to basal values (Fig. 3g), suggesting that efferocytosis was mainly

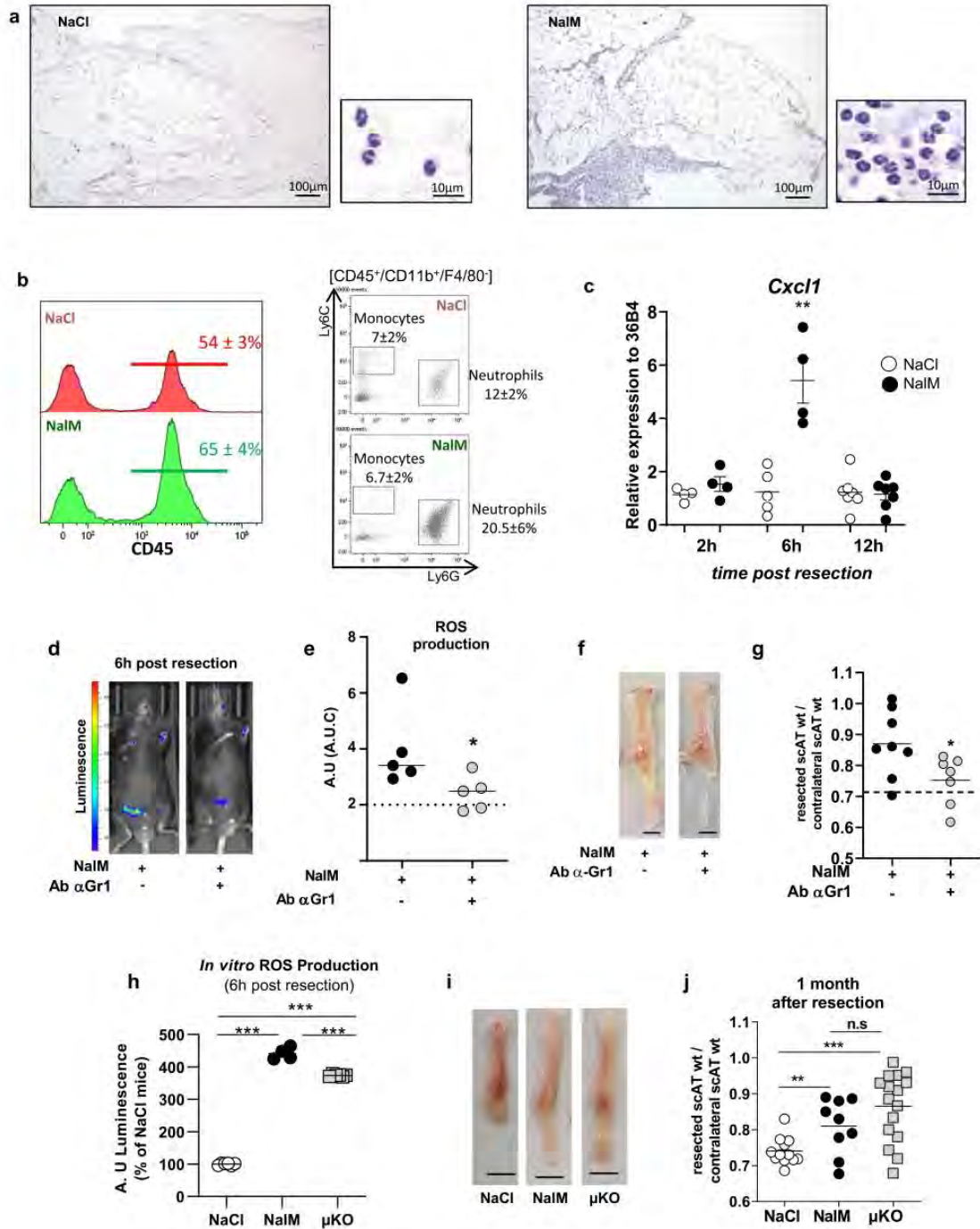
mediated through TIM4 receptor in these conditions. This disruption of TIM4-mediated efferocytosis prevented NaIM-induced regenerative healing, as demonstrated by both macroscopic observations (Fig. 3h) and scAT weight ratio that returned to values obtained in scar healing (NaCl) conditions (Fig. 3i). We also investigated the expression of CD36, another major receptor involved in efferocytosis. Neither the percentage of macrophages expressing CD36 nor the expression of CD36 in sorted macrophages differed between scar and regenerative healing conditions, 24 h post-resection (Supplementary Fig. 3b-d), suggesting that this receptor was not involved in the differential efferocytic activity. Altogether, these data demonstrate for the first time that an efficient TIM4-mediated efferocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages is a crucial mechanism required for tissue regeneration.

Knowing that macrophages are a heterogeneous population differentially involved in the acute inflammatory phase of tissue repair, we then quantified both pro- and anti-inflammatory macrophages, based on the expression of CD11c and CD206 respectively. The number of pro-inflammatory (CD11c⁺) macrophages substantially increased (5 \times) to reach a maximum of 24 h post-resection (Fig. 3j). In contrast, the number of anti-inflammatory (CD206⁺) macrophages slightly increased (2 \times) from 6 to 72 h following resection (Fig. 3k). No significant difference was observed between healing and regenerative conditions.

To uncover the role of CD11c⁺ macrophages in tissue repair, we used CD11c-DTR mice, in which, CD11c⁺ cells can selectively be depleted by injection of diphtheria toxin (DT) as previously described²⁵. We first confirmed that in the scAT, most of the CD11c⁺ cells expressed the macrophage markers F4/80 and CD11b (Supplementary Fig. 4a). The toxin was injected 24 h before surgery, and regeneration was analyzed 4 weeks later. As controls, we used CD11c-DTR⁻ mice injected with DT. As expected, DT treatment efficiently decreased the number of CD11c⁺ macrophages (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁺) present in the resection plane 24 h post-resection (Supplementary Fig. 4b). It resulted in a significant accumulation of neutrophils (Fig. 3l, m), suggesting an altered efferocytosis. Depletion of CD11c⁺ macrophages also prevented NaIM-induced tissue regeneration (Fig. 3n), and decreased the weight ratio between resected and contralateral scAT to values obtained in scar healing (NaCl) condition (Fig. 3o). These data underlined the crucial role of CD11c⁺ macrophages in the handling of tissue repair.

AT resident macrophages but not classical BM-derived macrophages are required for tissue regeneration

We previously demonstrated that scAT myeloid populations mainly originate from AT hematopoiesis rather than BM



hematopoiesis in physiological conditions²⁰. We thus investigated the origin of the macrophages involved in regeneration. Chimeric mice were generated by using standard repopulation assays as previously described²⁰ by injecting 2×10^3 scAT-LSK or BM-LSK sorted from tdTomato mice mixed with 2×10^5 BM cells isolated

from C57Bl/6 mice (Fig. 4a). Injection of BM cells ensured the survival of the recipient, as previously described²⁶. Chimeric mice were then subjected to scAT resection 6 weeks after transplantation once the reconstitution was complete. The total chimerism and the origin of macrophages were determined by flow

Fig. 2 Neutrophils depletion impairs ROS production and inhibits scAT regeneration in NaIM-treated mice. **a** Representative comparative microscopic aspects of the resection plane of scAT 8 h post-surgery in NaCl and NaIM-treated mice (Hemalun & eosin staining). **b** Representative histograms and dot plot analyses of SVF cells isolated from NaCl (red curve) or NaIM (green curve) treated mice 6 h post-resection, showing the percentage of CD45⁺ cells and granulocytes (neutrophils: CD45⁺/Ly6G⁺/Ly6C⁻/CD11b⁺ and monocytes CD45⁺/Ly6G⁻/Ly6C⁺/CD11b⁺) in the resection plane. **c** Gene expression quantification by RT-qPCR of the chemokine *Cxcl1* in SVF isolated from the resection plane of NaCl-treated or NaIM-treated mice 2, 6, and 12 h post-resection ($n = 4$ per group). **d** Representative *in vivo* imaging of ROS production 6 h post-resection in NaIM-treated mice, treated or not with anti-Gr1 blocking antibody (Ab α -Gr1). **e** Quantification of ROS production *in vivo* from 0 to 72 h post-resection in NaIM-treated mice, treated or not with Ab α -Gr1. The dotted lines represent ROS production obtained in NaCl-treated mice ($n = 5$ per group). **f** Representative pictures of scAT 1 month post-resection, in NaIM-treated mice treated or not with Ab α -Gr1 (scale bar: 0.5 cm). **g** Weight ratio between resected and contralateral scAT 1 month post-resection in NaIM treated mice, treated with isotype or Ab α -Gr1 ($n = 7$ –8 per group). The dotted line show values obtained in scar healing (NaCl) conditions. **h** *In vitro* quantification of ROS production by Gr1⁺ populations sorted from scAT of NaCl, NaIM, or μ KO mice 6 h post-resection ($n = 4$ –6 per group). **i** Representative pictures of scAT 1 month post-resection, in NaCl or NaIM-treated mice and in NaCl-treated mice knock out for the μ opioid receptor (μ KO) (scale bar: 0.5 cm). **j** Weight ratio between resected and contralateral scAT 1 month post-resection in NaCl, NaIM-treated and μ KO mice ($n = 9$ –16 per group). Data are represented as mean \pm SEM (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ between scar and regenerative healing conditions). AT adipose tissue, AU arbitrary units, AUC area under the curve, NaIM naloxone methiodide, scAT subcutaneous adipose tissue, SVF stromal vascular fraction, ROS reactive oxygen species, wt weight.

cytometry 24 h post-resection. Total chimerism in the AT of chimeric mice reached 50–70%, and all the macrophages present in the resection plane derived from the BM in BM-chimeric mice or from the scAT in AT-chimeric mice (Fig. 4b).

In order to compare BM and scAT-macrophage function, efferocytosis was assessed by *in vivo*-specific assays. Interestingly, flow cytometry analysis demonstrated a significant increase in phagocytic macrophages in the resection plane 24 h post-resection in AT- compared to BM-chimeric mice in regenerative conditions (Fig. 4c, d) associated with a significant decrease in neutrophil number (Fig. 4e) (for gating strategy, see Supplementary Fig 1b). On the contrary, in BM-chimeric mice, there was no difference in the percentage of phagocytosing macrophages *in vivo* or in neutrophil numbers between scar and regenerative healing conditions (Fig. 4c–e). Then, to demonstrate that these differences in efferocytosis capacity drive tissue repair outcomes towards regeneration or scar healing, regeneration was assessed 4 weeks later. Macroscopic observations showed that AT-chimeric mice were able to regenerate but not BM-chimeric mice that instead displayed scar healing (Fig. 4f). In addition, we observed a significant difference in the weight ratio between resected and contralateral scAT in NaIM versus NaCl treated AT-chimeric mice, while no difference was observed in BM-chimeric mice (Fig. 4g). Histological analyses of resection planes performed in NaIM-treated chimeric mice revealed large unilocular fully differentiated adipocytes in AT-mice, as well as organized vascularization (Fig. 4h). In contrast resection plane in BM-mice was characterized by scattered adipocytes with small lipid droplets embedded in collagen deposition (Fig. 4h). These results suggest that macrophages play distinct role in healing process according to their origin. Altogether, these results show that macrophages originating from both the BM and the AT contribute to scar healing. However, in contrast to BM macrophages, scAT macrophages are the only ones able to exhibit efficient efferocytosis and rapid clearance of neutrophils and thus to drive tissue regeneration.

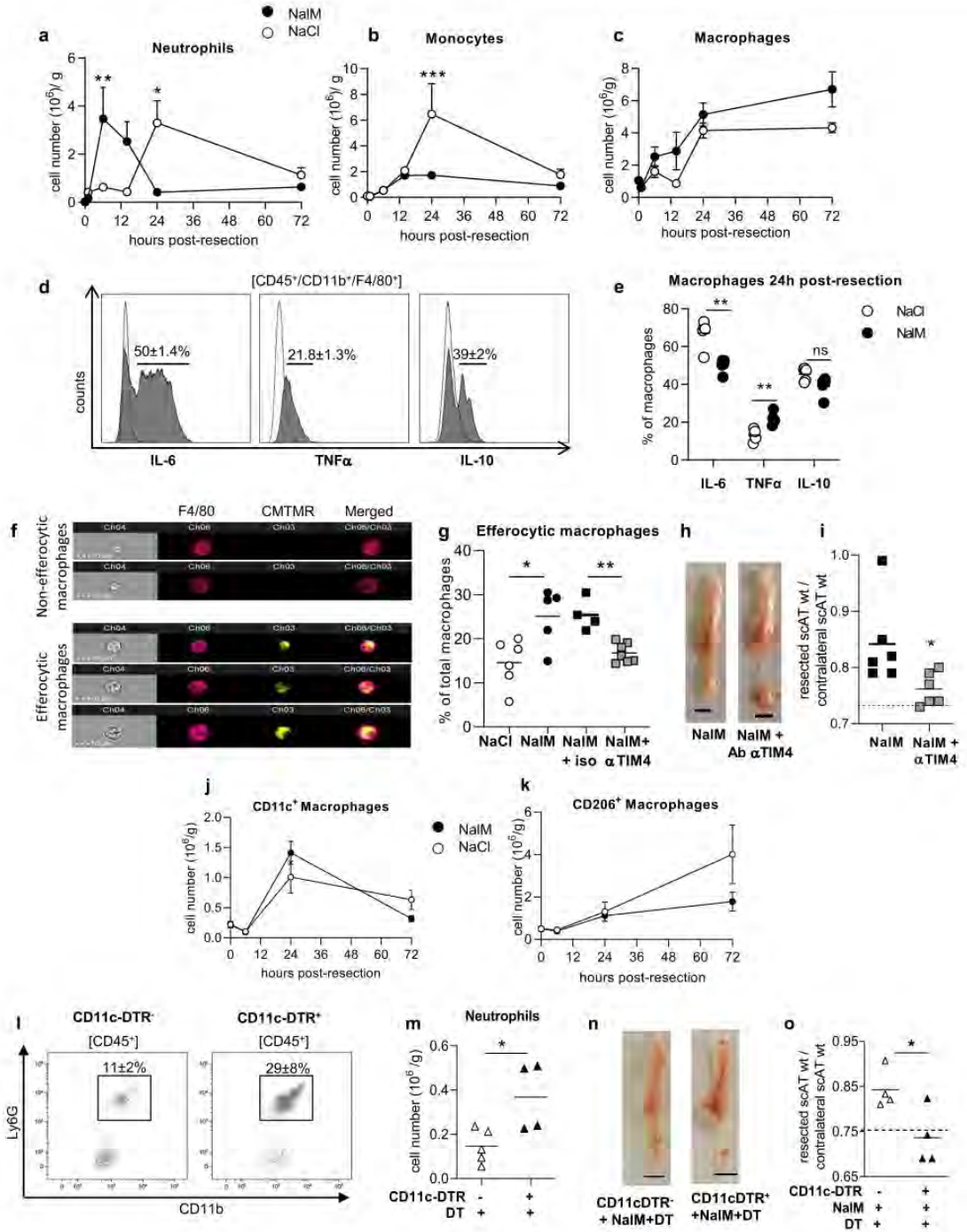
DISCUSSION

In this study, we compared the early cellular mechanisms driving tissue healing or regeneration in adult mammals. By using a newly developed model of tissue regeneration in a commonly used strain of mice⁴, we demonstrated that a transient and early peak of neutrophils and their ROS production, as well as their rapid elimination by resident macrophages through an efficient efferocytosis, are required for regeneration in adult mice.

Tissue injury classically leads to an early pro-inflammatory step, characterized by the production of pro-inflammatory mediators²⁷. Here, the increase in the expression of pro-inflammatory cytokines in regenerative conditions shortly after scAT resection is consistent

with the role of self-limiting acute inflammation in proper restorative response. Indeed, only a few studies highlight the crucial role of intense and transient production of pro-inflammatory cytokines to allow correct tissue repair^{28,29}. As an example, the inhibition of IL-1 β and TNF α expression by glucocorticoids leads to healing defects, and this study suggests that early induction of these genes is one of the important mechanisms in this process²⁸. Among the first cytokines involved in this tissue repair, IL-6 and TNF α have been shown to promote different tissue regeneration in mammals and zebrafish^{30,31}. In addition, the early and transient upregulation of IL-10 and TGF β observed in regenerative conditions are in line with the anti-inflammatory/pro-repair activities of these cytokines¹⁶. Among the other signaling molecules released during inflammation are the prostaglandins, PGE2 and D2 are indeed produced in a time-dependent fashion, and actively contribute to tissue repair^{32,33}. In agreement with our data, the inhibition of the PGE2-degrading enzyme, thus leading to an increase in PGE2 levels, has been shown to promote tissue repair in a mouse model of liver injury³⁴. When analyzed together through PCA, our results show that the global gene expression discriminates between regenerative and scar healing conditions, but only very early after tissue lesion, suggesting that temporal cues are critical for the tissue repair outcome. This is in agreement with previous work showing that cytokines such as IL-6 are protective and limit host damage in the short term, but can also be deleterious when chronically elevated³⁵. It has to be noted however, that unlike our work, most of the studies on tissue regeneration do not focus on the earliest steps of tissue repair.

The early pro-inflammatory stage following tissue injury is dominated by innate immune cells such as neutrophils and macrophages. The accumulation of granulocytes and especially neutrophils immediately after tissue damage has been largely documented³⁶, and is supported by the upregulation of Cxcl1, a chemokine that contributes to attract neutrophils on the lesion site²². Neutrophils have been described as critical players in injury and repair although, it was unclear whether they have beneficial or detrimental healing functions³⁷. In addition, ROS production was shown to either directly induce tissue damages⁵ or to be involved in regeneration process in diverse species including mammalian ones^{4,38}. Here, our data clearly identify granulocytes as responsible for ROS production required for regeneration in mammals. Moreover, we demonstrated that through a direct effect on μ opioid receptor, NaIM, an antagonist of this receptor induces the production of ROS by granulocytes. The μ opioid receptor has already been described on granulocytes, and in agreement with our results, it is suggested that its activation inhibits the inflammatory response³⁹.



Our results highlight the involvement of macrophages in regeneration. This is in agreement with previous studies performed in different vertebrates among which *Acomys* or newborn mice and showing that macrophage depletion inhibits regeneration^{8,9,40-42}. A bilateral link between ROS and

macrophage efferocytosis has been recently proposed. Indeed, ingestion of apoptotic neutrophils by macrophages activates ROS production that in turn facilitates efferosome maturation and neutrophil degradation⁴³. However, how macrophages initiate this pro-regenerative response remains unclear. Gain and loss of

Fig. 3 Efficient efferocytosis of apoptotic neutrophils by CD11c⁺ macrophages is required for regeneration. Time-course study of the number of neutrophils (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁻/Ly6C⁻/Ly6G⁺) (a), monocytes (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁻/Ly6C⁺/Ly6G⁻) (b) and macrophages (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁻/Ly6G⁻) (c) in the scAT of NaCl and NaIM treated mice ($n = 5$ –13 per group). **d** Representative histogram of flow cytometry of IL-6, TNF α , and IL-10 staining (gray histogram) or isotype (white histogram) on macrophages in resection planes 24 h post-resection. **e** Percentage of IL-6, TNF α , and IL-10 producing macrophages in NaCl or NaIM treated mice 24 h post-resection ($n = 5$ per group). **f** Examples of the imaging flow cytometry channels of macrophages stained with F4/80 (pink) and having engulfed (lower panels) or not (upper panels) CMTMR stained apoptotic neutrophils (yellow) in scAT of NaCl-treated mice 17 h post-resection. **g** Quantification of efferocytic macrophages in the scAT of NaCl and NaIM-treated mice with isotype or TIM4 blocking antibody ($n = 4$ –7 per group). **h** Representative pictures of scAT 1 month post-resection, in mice treated with NaIM and with or without blocking TIM4 antibody (scale bar: 0.5 cm). **i** Weight ratio between resected and contralateral scAT 1 month post-resection in mice treated with NaIM and with or without blocking TIM4 antibody ($n = 6$). The dotted line shows values obtained in scar healing (NaCl) conditions. Quantification of macrophages CD11c⁺ (j) and CD206⁺ (k) in NaCl and NaIM-treated mice 24 h post-resection, ($n = 5$ per group). **l** Representative dot plots of flow cytometry analyses showing neutrophils (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁻/Ly6C⁻/Ly6G⁺) 24 h post-resection in scAT of CD11c-DTR⁺ and CD11c-DTR⁻ mice treated with NaIM and diphtheria toxin (DT). **m** Quantification of neutrophils 24 h post-resection in CD11c-DTR⁺ and CD11c-DTR⁻ mice treated with DT and NaIM ($n = 4$ –5 per group). **n** Representative pictures of scAT 1 month post-resection in CD11c-DTR⁺ and CD11c-DTR⁻ mice treated with NaIM and DT (scale bar: 0.5 cm). **o** Weight ratio between resected and contralateral scAT in CD11c-DTR⁺ and CD11c-DTR⁻ mice treated with NaIM and DT ($n = 4$). The dotted line shows values obtained in scar healing (NaCl) conditions. Data are represented as mean \pm SEM. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ between scar and regenerative healing conditions). Ab Antibody, NaIM naloxone methiodide, CMTMR 5-(and-6)-((4-chloromethyl)benzoyl)amino tetramethylrhodamine, scAT subcutaneous adipose tissue, wt weight.

efferocytic function have shown that the timely clearance of apoptotic cells is required to induce healing in various mammal tissues^{40,44,45}. Indeed, the prolonged presence of neutrophils in the wound triggers additional production of inflammatory mediators and is deleterious for proper tissue repair⁴⁶. Here, we propose that this mechanism is required for regeneration. In addition, efferocytosis is mediated through TIM4, a receptor shown to be expressed in various resident macrophages including peritoneal macrophages, and required for their efferocytic activity⁴⁷. Moreover, by using CD11c⁺ cell depletion, we identified CD11c⁺ macrophages as crucial actors in this context. It has to be noted that this strategy depletes the whole CD11c⁺ population. Although it mostly contains macrophages in these conditions, the involvement of other cell types such as dendritic cells cannot be totally excluded. In the AT, CD11c⁺ macrophages have been identified as pro-inflammatory and involved in the clearance of senescent cells^{48,49}. The expression of CD11c has also been associated with both tissue resident macrophages that play a central role in non-inflammatory apoptotic cells clearance required for the maintenance of tissue homeostasis^{50,51} and monocyte-derived macrophages involved in tissue repair⁵².

Finally, one of our most striking results reveals that AT-resident macrophages derived from AT-endogenous hematopoiesis, but not BM-derived macrophages, are necessary for enabling regeneration. Indeed, using chimeric mice, we demonstrated that pro-regenerative efferocytotic macrophages originated from AT. This result emphasizes the beneficial role of myeloid cells deriving from endogenous AT hematopoiesis in tissue repair in contrast to medullar-originating cells, as already proposed in the context of cardiac remodeling after infarction⁵³. In addition, these data are in line with the concept that the contribution of macrophages to tissue regeneration following injury depends on their lineage and/or developmental origin. Indeed, evidences in liver suggest that monocyte-derived macrophages can accelerate fibrosis resolution⁵⁴ while a more recent study showed that resident dermal macrophages contribute to axon regeneration after nerve injury⁵⁵. In the heart, resident macrophages derived from the primitive yolk sac and fetal progenitors are involved in tissue remodeling and cardiac regeneration while macrophages originating from definitive hematopoietic progenitors participate in the initiation of inflammation^{56,57}.

Altogether, our findings indicate that early and transient recruitment of granulocytes producing ROS concomitant with an early inflammation is required for tissue regeneration in adult mice. We also elucidated the main role of CD11c⁺ resident macrophages in the clearance of neutrophils to promote regeneration. This work highlights a cellular pathway able to

drive tissue repair towards regeneration in adult mammals and highlights potential targets that could be manipulated to induce regeneration in the context of tissue injury. Further studies characterizing the intrinsic phenotype of pro-resolutive resident macrophages will advance our understanding of their precise roles in driving tissue repair towards regeneration rather than scar formation.

METHODS

Animals

Experiments were performed on 5–7 weeks-old male C57BL/6 mice (Envigo) and congenic male B6.129(Cg)-Gt(Rosa)26Sor^{tm4(CRE)Tomato-EGFP⁺ILUG/J} (also known as mTmG mice; (Jackson Laboratories, stock No. 007676). Animals were group-housed in a controlled environment (12-h light/dark cycles at 21 °C) with unrestricted access to water and a standard chow diet in a pathogen-free animal facility. Granulocytes depletion was achieved by i.p. injection of 200 μ g of anti-mouse Gr-1 blocking antibody (clone RB6-8C5, BioXCell, West Lebanon, NH, USA) 24 h before surgical AT resection. For CD11c⁺ cell depletion, transgenic CD11c-DTR mice were injected i.p. with 20 ng/kg of diphtheria toxin the day before tissue resection as previously described²¹.

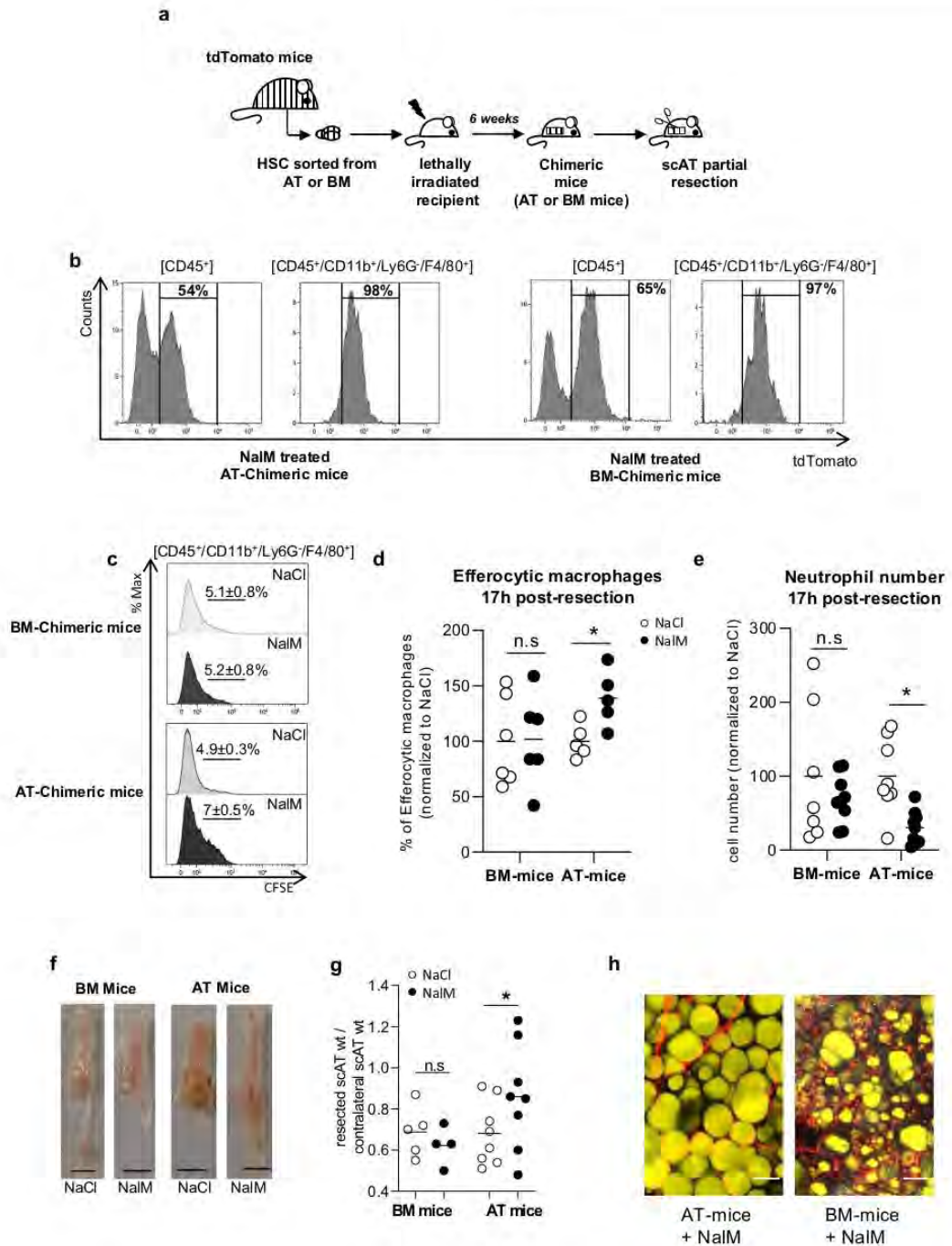
Before tissue removal, mice were killed by cervical dislocation. All experiments were carried out in compliance with European Community Guidelines (2010/63/JE) and approved by the institutional ethics committee and from the Ministry of National Education, Higher Education and Research (protocol reference: 10691-201802091153445-v1).

Sub-cutaneous AT (scAT) resection

Animals were anesthetized by inhalation of isoflurane (2.5%) and subjected to a single incision on the abdomen to access and resect 35–40% of the right scAT between lymph node and groin. The skin was then closed with three suture points. Mice were then injected subcutaneously at the surgery site, once a day from d0 to d3 post-resection with NaIM (17 mg/kg, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) or NaCl 0.9% to induce, respectively, regenerative or scar healing, as previously described⁴. scAT regeneration was assessed by morphological observations and calculating the weight ratio between the right (resected) and the left (contralateral) fat pads.

In vivo ROS imaging

Mice were briefly anesthetized by inhalation of isoflurane (2.5%) and injected i.p. with 5 mg of luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazine-dione, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). In vivo bioluminescence was imaged using an IVIS Spectrum 200 (Caliper Life Science, Hopkinton, MA, USA) during 2 min exposure at different times after luminol injection. Image analyses were performed using Living Image 3.0 Software (Caliper Life Science, Hopkinton, MA, USA). The color intensity of the pictures was calibrated from 30 (min) to 330 (max). For each animal, the sham surgery area signal was subtracted to a resected area photon flux.



Isolation of BM and adipose-derived stromal vascular cell fraction (SVF)

At necropsy, BM cells were immediately flushed from the sampled femurs with α -MEM medium (Life Technologies). Resection planes were carefully dissected, mechanically dissociated, and digested at 37 °C with collagenase

(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) for 30 min. Cells from the scAT SVF were collected by centrifugation after elimination of undigested fragments by filtration as previously described²⁰. Red blood cells were removed by incubation in hemolysis buffer (140 mM NH₄Cl and 20 mM Tris, pH 7.6). Cells were then counted and used for flow cytometry, cell sorting in vitro ROS quantification, or Real-Time PCR.

Fig. 4 AT Resident macrophages but not classical BM-derived macrophages are required for tissue regeneration. **a** Hematopoietic chimera strategy: 2×10^3 LSK cells sorted from the scAT or the bone marrow (BM) of mTmG mice were co-injected with 2×10^5 total BM cells of C57Bl/6 into lethally irradiated C57Bl/6 recipients. Two months after hematopoietic reconstitution, scAT resection was performed and chimeric mice were treated with NaCl or NaIM. **b** Representative histograms showing chimerism (tdTomato staining) in total immune cells (CD45⁺) and macrophages (CD45⁺/CD11b⁺/Ly6G⁺/F4/80⁺) in NaIM-treated AT- and BM-chimeric mice, 24 h post-resection. **c** Representative histograms of CFSE staining in macrophages 24 h post-resection in NaCl and NaIM-treated chimeric mice, corresponding to the percentage of macrophages having engulfed CFSE⁺ neutrophils. **d** Quantification of efferocytotic macrophages 24 h post-resection in NaCl and NaIM-treated chimeric mice ($n = 5-6$). **e** Quantification of neutrophil number by flow cytometry 24 h post-resection, in NaCl or NaIM, treated mice ($n = 7-8$ per group). **f** Representative pictures of scAT 1 month post-resection, in BM- and AT-chimeric mice treated or not with NaIM (scale bar: 0.5 cm). **g** Weight ratio between resected and contralateral scAT in AT- and BM-chimeric mice 1-month post-resection ($n = 5-8$ per group). **h** Representative pictures of resection plane area of NaIM-treated AT- and BM- chimeric mice, one-month post resection. Adipocytes (yellow) were stained with Bodipy and vessels (red) with in vivo Lectin injection. Collagen fibers (gray) were imaged using second harmonic generation (SHG) signal. Images were obtained using maximum intensity projections of 23 stack images (scale bar: 50 μ m). Data are represented as mean \pm SEM. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ between scar and regenerative healing conditions). AT adipose tissue, BM bone marrow, LSK Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺ cells, NaIM naloxone methiodide, scAT subcutaneous adipose tissue, wt weight.

Competitive repopulation assays

Competitive repopulation assays were conducted as described previously²³. Briefly, 2×10^3 Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺ (LSK) cells sorted from the scAT or the BM of donor mice were mixed with 2×10^5 competitors BM total cells from C57Bl/6 mice. Donor mice were mTmG mice expressing Tomato ubiquitously. In all the experiments, control and experimental LSK cells were sorted from animals of equal age. LSK purity was determined by flow cytometry and was between 92% and 97%. The mixed population was injected i.v. into lethally irradiated (10 Gy, ¹³⁷Cs source) recipient mice of equal age. Mice reconstituted with AT- or BM-LSK (AT-mice or BM-mice) were then allowed to recover for 6 weeks. Chimerism was assessed by quantifying Tomato⁺ (dT⁺) cells among total CD45⁺ cells in the SVF.

RNA extraction and real-time PCR

Total RNA was isolated from SVF by RLT:ethanol 100% extraction and purified using a Microprep kit (Zymo). 250 ng of total RNA was reverse-transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies/Applied Biosystem), SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies/Applied Biosystem), and 300 nmol/L primers (Supplementary Table 1) on an Applied Biosystem StepOne instrument. All relative gene expression was determined using the $\Delta\Delta$ CT method and normalized to the 36B4 level.

ELISA cytokines titration

At necropsy, exudates were collected at the resection plane 6 and 12 h post-resection (400 μ L). The release of PGD2 and PGE2 was determined with a commercially available OptiEIA kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions.

Flow cytometry analysis and cell sorting

Freshly isolated SVF cells were stained in PBS containing FcR-blocking reagent for 30 min on ice with fluorochrome-conjugated antibodies. Phenotyping was performed by immunostaining with conjugated rat anti-mouse Abs and compared with isotype-matched control Abs (Supplementary Table 2). Cell apoptosis was assessed by AnnexinV (eBioscience) and DAPI staining according to the manufacturer's instructions. Cells were then analyzed on an LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences). Data acquisition and analysis were performed using Diva (Becton Dickinson) and Kalusa version 1.2 (Beckman Coulter) software, respectively, following gating strategies indicated in Supplementary Fig 1.

For LSK cell-sorting experiments, SVF cells were stained with Ly-6A/E (Sca-1), CD117 (c-Kit) antibodies, and Lineage Panel (Lin). Cells negative for lineage markers were gated, and Sca-1 and CD117 double-positive cells were sorted (BD FACSAria Fusion III Cell sorter, BD Biosciences). Enrichment of the LSK was determined by flow cytometry and varied between 92% and 97%. A similar strategy was used to sort macrophages on the basis of CD45, CD11b, and F4/80 expression (Supplementary Table 2).

In vivo efferocytosis assay

Neutrophils from C57Bl/6 mice were isolated from the BM using a neutrophil isolation kit according to the manufacturer's instructions (Miltenyi). Neutrophils were then stained with 2.5 μ M of CellTrace carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probe) or 5 μ M of

chloromethyl-benzoyl-aminotetramethyl-rhodamine (CMTMR; Molecular Probe). Three hours before scAT resection, 3×10^6 neutrophils were injected i.v. into wild-type, AT- or BM-chimeric mice. The resection plane was removed 17 h after resection and the proportion of macrophages CFSE⁺ or CMTMR⁺ was visualized and quantified by Image flow cytometry and flow cytometry, respectively, as described previously⁵⁸.

Efferocytosis inhibition was achieved by three successive i.v. injections of anti-mouse TIM4 blocking antibody (TIM4 Ab; 0.5 mg/mice/injection) (BioXCell, West Lebanon, NH, USA) or its isotype control (rat IgG2b clone LTF-2, BioXCell) 12 h before and 3 and 17 h after surgery.

Image flow cytometry

Individual cell images were acquired using IDEAS software (Amnis Merck Millipore, Billerica, MA, USA) on a 3-laser 6-channel imaging flow cytometer (Image Stream X Mark II, Amnis Merck Millipore) with $\times 40$ magnification. For each data file, at least 50,000 single cells were acquired—debris and doublets were excluded based on their area and aspect ratio. Single-stain controls were acquired (all channels on, no brightfield and no side scatter image), a compensation matrix was calculated and then applied to the data files using IDEAS software (Amnis Merck Millipore). Briefly, focus cells were identified using the gradient RMS feature of the brightfield channel (Ch04). Single cells were then identified from debris and cell clusters using a plot of aspect ratio vs. area of the brightfield channel. Finally, we analyzed single cells with plot based on the intensity of CMTMR and F4/80 staining (Ch03 and CH06, respectively).

Histological evaluation

3 h after surgical resection, resection planes were sampled at necropsy, fixed in 10% neutral buffered formalin and paraffin-embedded. Three μ m-thick paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin and microscopically evaluated by a pathologist.

Biphoton microscopy

The mice were injected in vivo with retro-orbital TRITC- Griffonia simplicifolia Lectin (Eurobio) to achieve proper vessel labeling. At 30 min after in vivo lectin injection, animals were euthanized and scAT was removed, oriented, and fixed overnight. scAT was embedded in 2% agarose gel and cut into 300 μ m slices, then incubated in Bodipy in PBS/0.2% triton 1 h at room temperature. Imaging was performed using a Biphotonic Laser Scanning microscope (LSM880—Carl Zeiss, Jena, Germany) with an objective lens LCFPlan Aplanochromat' $\times 10/0.45$ and excited using 488 nm (bodipy), 561 nm (lectin), and 840 nm (SHG) lasers. Images obtained were treated with Fiji Software.

In vitro ROS quantification

The oxygen-dependent respiratory production was measured by chemiluminescence in the presence of luminol (66 μ M, Sigma-Aldrich) using a thermostatically monitored luminometer (37 $^{\circ}$ C) (210410A EnVision Multi-label Reader) on 14×10^4 Gr1⁻ or Gr1⁺ cells sorted from SVF. DAMGO (D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol]-Enkephalin acetate salt, Sigma Aldrich) was added 5 min before luminescence measure. The luminol detects both reactive oxygen and nitrogen intermediates (O₂⁻, ONOO⁻, OH⁻). Chemiluminescence was continuously monitored for 1 h. The ROS level

was quantified and compared between different conditions using the area under the curve.

Statistical analyses

Experiments done previously were used to determine animal sample size with adequate statistical power. The number of animals used in each study is indicated in the figure legends. Mice were randomized allocated to the different groups and investigators were blinded to analyses. All results are given as means \pm SEM. Normality was checked using the D'Agostino and Pearson omnibus normality test, and variance between groups was compared. Statistical differences were measured using an unpaired two-sided Student's *t*-test, or a nonparametric test (Mann–Whitney) when data did not pass the normality test, or when variances between groups were different. Data were analyzed using an ANOVA test when there were more than two groups. All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 9.0 software and a two-tailed *p* value with a 95% confidence interval was acquired. *p* < 0.05 was considered as significant. The following symbols for statistical significance were used throughout the manuscript: **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001.

For gene expression at 6 and 12 h, a principal component analysis (PCA) was also performed as an unsupervised dimension reduction method. R software 3.6.3 with the "factoextra" 1.0.6 and "FactoMineR" 2.3 packages were used.

Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

DATA AVAILABILITY

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Received: 4 August 2020; Accepted: 7 July 2021;

Published online: 03 August 2021

REFERENCES

- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. & Longaker, M. T. Wound repair and regeneration. *Nature* **453**, 314–321 (2008).
- Seifert, A. W. et al. Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*). *Nature* **489**, 561–565 (2012).
- Deng, Z. et al. Characterization of articular homeostasis and the mechanism of superior cartilage regeneration of MRL/Mpj mice. *FASEB J.* **33**, 8809–8821 (2019).
- Labit, E. et al. Opioids prevent regeneration in adult mammals through inhibition of ROS production. *Sci. Rep.* **8**, 12170 (2018).
- Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P. & Malik, A. B. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 1126–1167 (2014).
- Mescher, A. L., Neff, A. W. & King, M. W. Inflammation and immunity in organ regeneration. *Dev. Comp. Immunol.* **66**, 98–110 (2017).
- Godwin, J. W., Pinto, A. R. & Rosenthal, N. A. Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 9415–9420 (2013).
- Aurora, A. B. et al. Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *J. Clin. Investig.* **124**, 1382–1392 (2014).
- Simkin, J., Gawriluk, T. R., Gensel, J. C. & Seifert, A. W. Macrophages are necessary for epimorphic regeneration in African spiny mice. *eLife* **6**, <https://doi.org/10.7554/eLife.24623> (2017).
- Soehnlein, O. & Lindbom, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 427–439 (2010).
- Serhan, C. N., Chiang, N. & Van Dyke, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 349–361 (2008).
- Duffield, J. S. et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J. Clin. Investig.* **115**, 56–65 (2005).
- Lech, M. & Anders, H. J. Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochim. Biophys. Acta* **1832**, 989–997 (2013).
- Munoz-Canoves, P. & Serrano, A. L. Macrophages decide between regeneration and fibrosis in muscle. *Trends Endocrinol. Metab.* **26**, 449–450 (2015).

- Murray, P. J. & Wynn, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 723–737 (2011).
- Wynn, T. A. & Vannella, K. M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity* **44**, 450–462 (2016).
- Hassnain Waqas, S. F. et al. Adipose tissue macrophages develop from bone marrow-independent progenitors in *Xenopus laevis* and mouse. *J. Leukoc. Biol.* **102**, 845–855 (2017).
- Schulz, C. et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* **336**, 86–90 (2012).
- Poglio, S. et al. Adipose tissue as a dedicated reservoir of functional mast cell progenitors. *Stem Cells* **28**, 2065–2072 (2010).
- Poglio, S. et al. In situ production of innate immune cells in murine white adipose tissue. *Blood* **120**, 4952–4962 (2012).
- Luche, E. et al. Corrupted adipose tissue endogenous myelopoiesis initiates diet-induced metabolic disease. *eLife* **6**, <https://doi.org/10.7554/eLife.23194> (2017).
- Souza-Almeida, G. et al. Leptin mediates in vivo neutrophil migration: involvement of tumor necrosis factor- α and CXCL1. *Front. Immunol.* **9**, 111 (2018).
- Gross, S. et al. Bioluminescence imaging of myeloperoxidase activity in vivo. *Nat. Med.* **15**, 455–461 (2009).
- Nishi, C., Toda, S., Segawa, K. & Nagata, S. Tim4- and MerTK-mediated engulfment of apoptotic cells by mouse resident peritoneal macrophages. *Mol. Cell Biol.* **34**, 1512–1520 (2014).
- Patsouris, D. et al. Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab.* **8**, 301–309 (2008).
- Miller, C. L., Dykstra, B. & Eaves, C. J. Characterization of mouse hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 22, Unit 22B 22, <https://doi.org/10.1002/0471142735.im22b02s80> (2008).
- Erning, S. A., Wynn, T. A. & Martin, P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science* **356**, 1026–1030 (2017).
- Hubner, G. et al. Wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokines* **8**, 548–556 (1996).
- Pineau, I. & Lacroix, S. Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *J. Comp. Neurol.* **500**, 267–285 (2007).
- Karin, M. & Clevers, H. Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature* **529**, 307–315 (2016).
- Nguyen-Chi, M. et al. TNF signaling and macrophages govern fin regeneration in zebrafish larvae. *Cell Death Dis.* **8**, e2979 (2017).
- Esser-von Bieren, J. Eicosanoids in tissue repair. *Immunol. Cell Biol.* **97**, 279–288 (2019).
- FitzSimons, M. et al. Cardiac injury modulates critical components of prostaglandin E2 signaling during zebrafish heart regeneration. *Sci. Rep.* **10**, 3095 (2020).
- Zhang, Y. et al. TISSUE REGENERATION. Inhibition of the prostaglandin-degrading enzyme 15-PGDH potentiates tissue regeneration. *Science* **348**, aaa2340 (2015).
- Fontes, J. A., Rose, N. R. & Chakova, D. The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure. *Cytokine* **74**, 62–68 (2015).
- Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159–175 (2013).
- Peiseler, M. & Kubes, P. More friend than foe: the emerging role of neutrophils in tissue repair. *J. Clin. Investig.* **129**, 2629–2639 (2019).
- Rampon, C., Volovitch, M., Joliet, A. & Vriz, S. Hydrogen peroxide and redox regulation of developments. *Antioxidants* **7**, <https://doi.org/10.3390/antiox7110159> (2018).
- Eisenstein, T. K. The role of opioid receptors in immune system function. *Front. Immunol.* **10**, 2904 (2019).
- Yang, W. et al. Neutrophils promote the development of reparative macrophages mediated by ROS to orchestrate liver repair. *Nat. Commun.* **10**, 1076 (2019).
- Godwin, J. W., Debuque, R., Salimova, E. & Rosenthal, N. A. Heart regeneration in the salamander relies on macrophage-mediated control of fibroblast activation and the extracellular landscape. *NPJ Regen. Med.* **2**, <https://doi.org/10.1038/s41536-017-0027-y> (2017).
- Petrie, T. A., Strand, N. S., Yang, C. T., Rabinowitz, J. S. & Moon, R. T. Macrophages modulate adult zebrafish tail fin regeneration. *Development* **141**, 2581–2591 (2014).
- Bagaitkar, J. et al. NADPH oxidase activation regulates apoptotic neutrophil clearance by murine macrophages. *Blood* **131**, 2367–2378 (2018).
- Arnold, L. et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* **204**, 1057–1069 (2007).
- Perdiguerro, E. et al. p38/MKP-1-regulated AKT coordinates macrophage transitions and resolution of inflammation during tissue repair. *J. Cell Biol.* **195**, 307–322 (2011).
- Lin, D. et al. Efferocytosis and its associated cytokines: a light on non-tumor and tumor diseases? *Mol. Ther. Oncolytics* **17**, 394–407 (2020).

47. Nagata, S. Apoptosis and clearance of apoptotic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **36**, 489–517 (2018).
48. Lumeng, C. N., DelProposto, J. B., Westcott, D. J. & Saltiel, A. R. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatio-temporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes* **57**, 3239–3246 (2008).
49. Vianello, E. et al. Epicardial adipocyte hypertrophy: association with M1-polarization and toll-like receptor pathways in coronary artery disease patients. *Nutr., Metab. Cardiovasc. Dis.* **26**, 246–253 (2016).
50. Baratin, M. et al. T cell zone resident macrophages silently dispose of apoptotic cells in the lymph node. *Immunity* **47**, 349–362 e345 (2017).
51. Soroosh, P. et al. Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3+ regulatory T cells and promote airway tolerance. *J. Exp. Med.* **210**, 775–788 (2013).
52. Yrlid, U. et al. Endothelial repair is dependent on CD11c(+) leukocytes to establish regrowing endothelial sheets with high cellular density. *J. Leukoc. Biol.* **105**, 195–202 (2019).
53. Ngkelo, A. et al. Mast cells regulate myofilament calcium sensitization and heart function after myocardial infarction. *J. Exp. Med.* **213**, 1353–1374 (2016).
54. Ramachandran, P. et al. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, E3186–E3195 (2012).
55. Kolter, J. et al. A subset of skin macrophages contributes to the surveillance and regeneration of local nerves. *Immunity* **50**, 1482–1497 e1487 (2019).
56. Lavine, K. J. et al. Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, 16029–16034 (2014).
57. Leid, J. et al. Primitive embryonic macrophages are required for coronary development and maturation. *Circ. Res.* **118**, 1498–1511 (2016).
58. Morioka, S. et al. Efferocytosis induces a novel SLC program to promote glucose uptake and lactate release. *Nature* **563**, 714–718 (2018).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank R. Sharif-Naeini, J. Biernaskie, and C. Sengenès for insightful discussions and manuscript proofreading. The authors also thank the US006/CREFRE INSERM/UPS (Toulouse, France) and specifically the zootechnical core facility for animal care and specifically the Non-Invasive Exploration service for giving access to the gamma-irradiator BioBeam 8000. Our research was supported by the French ANR Project «WAT-HEART» (ANR 16-CE14-0006-01). L.R. was a fellow of the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, and of the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, FDT201904008033). V.R. is recipient of grant from French ANR Project «WAT-HEART».

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, L.P., A.L., L.C., C.D.B., B.C.; Methodology, L.R., V.R., E.L., A.C., P.M., L.P., A.L., L.C., C.D.B., B.C.; Investigation, L.R., V.R., E.L., A.A., M.O., M.S., L.D.C.-F., M.A., C.G., M.-L.R., I.R.L.; Resources, B.S., M.S., G.M., P.M.; Writing—original draft, L.R., V.R., C.D.B., B.C.; Writing—review and editing, L.P., A.L., L.C., C.D.B., B.C.; Funding acquisition, L.C., B.C.; Supervision, A.L., C.D.B., L.C., B.C. All the authors approved the final completed version of the manuscript. L.R. and V.R. on one hand, and A.A. and E.L. on the other hand contributed equally to this work.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41536-021-00151-1>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to B.C.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

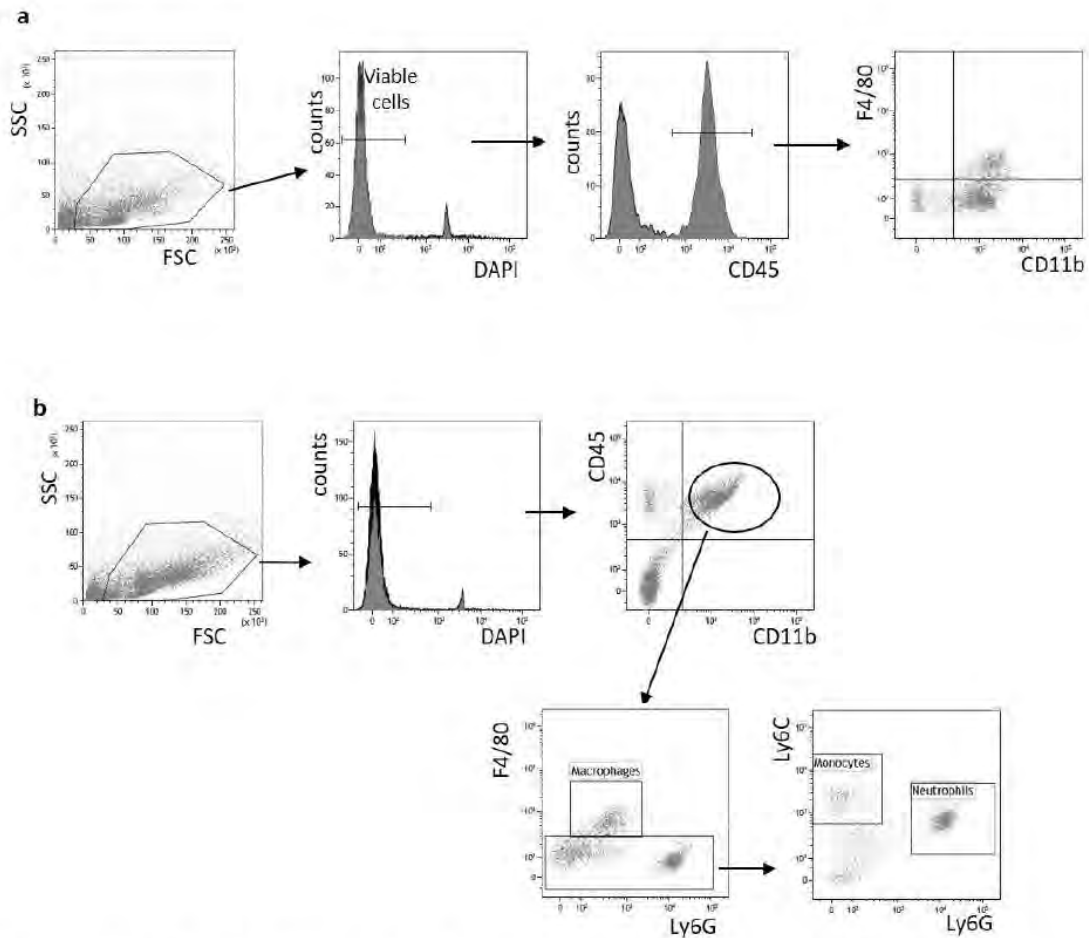
Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

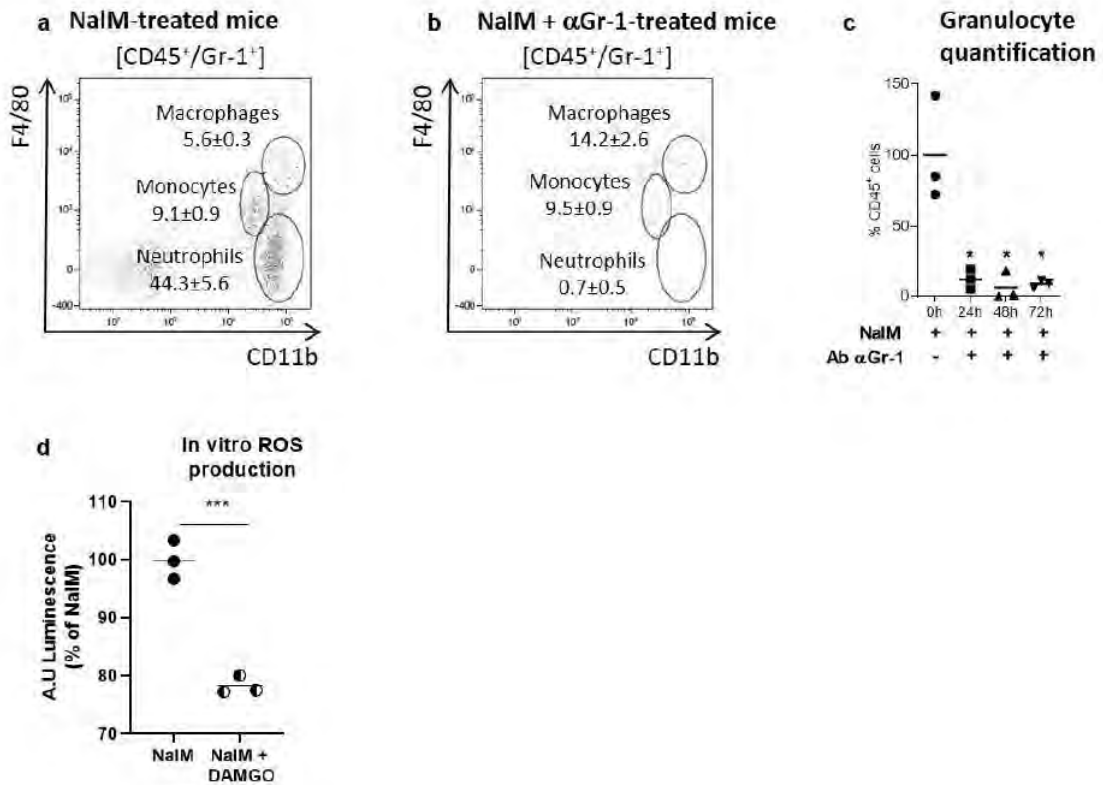
Supplementary Fig 1



Supplementary Figure 1: Hierarchical gating strategies for flow cytometry analyses.

(a) Cells were first gated on FSC/SSC to eliminate debris, before gating on DAPI- to identify viable cells. F4/80 and CD11b staining was then analyzed on CD45⁺ cells. To accurately define positive versus negative cells for each antibody, isotype controls were used. **(b)** Cells were first gated on FSC/SSC to eliminate debris, before gating on DAPI- to identify viable cells. CD45⁺/CD11b⁺ cells were then analyzed to identify macrophages, neutrophils and monocytes, according to the expression of F4/80, Ly6C and Ly6G. Isotype controls were used to define positive versus negative subsets. This gating strategy was applied in Figures 3 and 4.

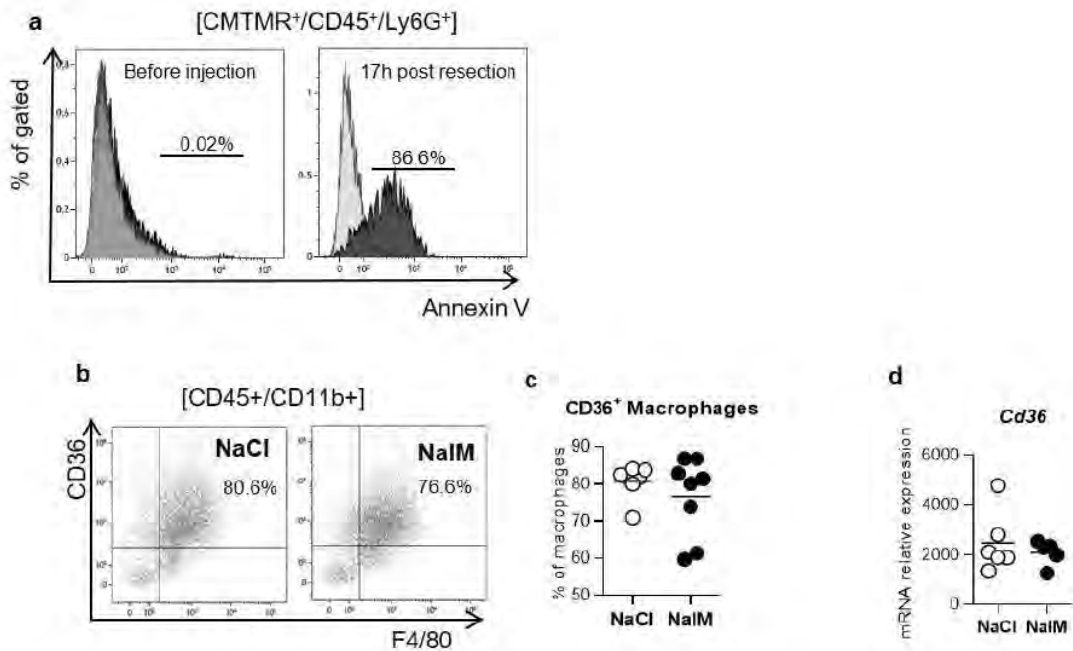
Supplementary Fig 2



Supplementary Figure 2: In vivo treatment with anti-Gr-1 antibody depletes neutrophil population.

(a, b) Representative cytometry analyses of SVF cells isolated from NalM (A) or NalM + anti-Gr1 blocking antibody (Ab α-Gr1) (b) treated mice 72h post-injection, showing CD11b and F4/80 staining in CD45⁺/Gr1⁺ population in the front lesion area. (c) Quantification of CD45⁺/Gr1⁺ cells in scAT 24, 48 and 72h after treatment with or without Ab α-Gr1 in NalM treated mice (n=3). (d) In vitro quantification of ROS production by Gr1⁺ populations sorted from scAT of NalM mice treated or not with the selective μ-opioid receptor agonist DAMGO, 6h post-resection (n=3 per group). Data are represented as mean ± SEM. (*p < 0.05; ***p<0.001). Ab: Antibody, NalM: Naloxone Methiodide, SVF: Stromal Vascular Fraction, DAMGO: [D-Ala 2, N-MePhe 4, Gly-ol]-enkephalin.

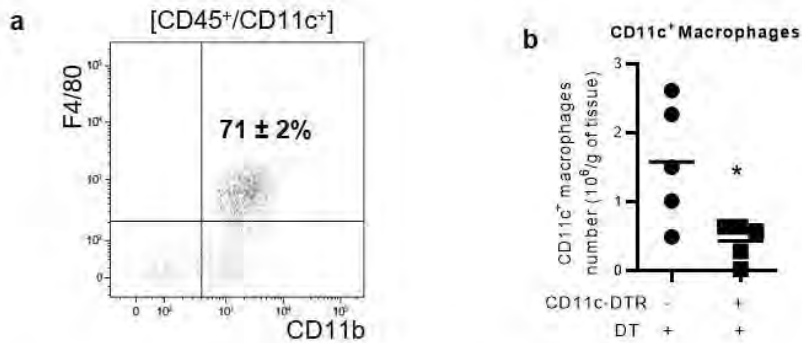
Supplementary Fig 3



Supplementary Figure 3: Neutrophil apoptosis and CD36 expression in macrophages.

(a) Representative flow cytometry histograms showing the percentage of annexin V⁺ cells in the CD45⁺/Ly6G⁺/CMTMR⁺ population before injection (left) and 17h post-resection (right). White histograms represent isotype controls. **(b)** Representative dot plots of CD36 staining on macrophages 24h post-resection in scar (NaCl) and regenerative (NaIM) healing conditions. **(c)** Quantification of CD36⁺ macrophages 24h post-resection in scar (NaCl) and regenerative (NaIM) healing conditions (n=7-8 per group). **(d)** Quantification by RT-qPCR at 24h post-resection of mRNA encoding cd36 in macrophages sorted from the resection plane of scar (NaCl) or regenerative (NaIM) conditions (n=5 per group). Data are represented as mean ± SEM. NaIM: Naloxone Methiodide, scAT: subcutaneous Adipose Tissue.

Supplementary Fig 4



Supplementary Figure 4: In vivo treatment with diphtheria toxin depletes CD11c⁺ macrophages in scAT.

(a) Representative flow cytometry analysis of CD11b and F4/80 staining in the CD45⁺/CD11c⁺ population. **(b)** Quantification of CD11c⁺ macrophages 24h post-resection in CD11c-DTR⁺ and CD11c-DTR⁻ mice treated with DT and NaIM (n= 5 per group). Data are represented as mean ± SEM. DT: Diphtheria Toxin, NaIM: Naloxone Methiodide, scAT: subcutaneous Adipose Tissue.

Supplementary Table 1: Murine primer sequences used in qPCR analyses

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>36b4</i>	AGTCGGAGGAATCAGATGAGGAT	GGCTGACTTGGTTGCTTTGG
<i>Pge2 synthase</i>	ATGAGGCTGCGGAAGAAGG	GCCGAGGAAGAGGAAAGGATAG
<i>Cox2</i>	AACCGAGTCGTTCTGCCAAT	CTAGGGAGGGGACTGCTCAT
<i>Alox5</i>	GTGCTGCTTGAGGATGTGAA	CTACGATGTCACCGTGGATG
<i>Pgd2 synthase</i>	TGGGAAGACAGCGTTGGAG	AGGCGAGGTGCTTGATGTG
<i>Lta4h</i>	CGTGCCCTTAGTTCACATT	GTTGACAGCTGAACCCAGT
<i>Il6</i>	TTCTCTCTGCAAGAGACTTC	CTGCAAGTGCATCATCGTTGT
<i>Il18</i>	TGCCACCTTTTACAGTGATG	TTGGAAGCAGCCCTTCATCTT
<i>Tnfα</i>	GCGCGTGCCTATGTCTCA	CGATCACCCCGAAGTTCAGTA
<i>Tgfβ</i>	TGATACGCCTGAGTGGCTGTCT	CACAAGAGCAGTGAGCGCTGAA
<i>Il10</i>	CGGGAAGACAATAACTGCACCC	CGGTTAGCAGTATGTTGTCCAGC
<i>Cxcl1</i>	CCGAAGTCATAGCCACACTCA	CTCCGTTACTTGGGGACACC
<i>cd36</i>	GATGTGGAACCCATAACTGGATTAC	GGTCCCAGTCTCATTAGCCACAGTA

Supplementary Table 2: Anti-mouse antibodies used in flow cytometry analyses

Antibody	Clone	Manufacturer
CD45	30F11	BD Bioscience
CD117	2B8	BD Bioscience
CD11b	M1/70	BD Bioscience
CD11c	N418	eBiosciences
CD206	MR6F3	eBiosciences
F4/80	BM8	eBiosciences
Lin	145-2C11	BD Bioscience
Ly6G	1A8	BD Bioscience
Ly6C	AL-21	BD Biosciences
Gr-1	RB6-8C5	BD Biosciences
Sca1	D7	eBiosciences
IL6	MP5-20F3	BD Biosciences
IL10	JES5-16E3	BD Biosciences
TNFα	MP6-XT22	eBiosciences

Article 2 : Identification of adipose tissue as a reservoir of macrophages after acute myocardial infarction



Article

Identification of Adipose Tissue as a Reservoir of Macrophages after Acute Myocardial Infarction

Ingrid Gomez ^{1,†}, Virginie Robert ^{2,†}, Paul Alayrac ¹, Adèle Arlat ², Vincent Duval ¹,
Marie-Laure Renoud ², José Vilar ¹, Mathilde Lemitre ¹, Jean-Sébastien Silvestre ^{1,*} and Béatrice Cousin ^{2,*}

¹ PARCC, INSERM, Université Paris Cité, 75015 Paris, France

² RESTORE Research Center, Université de Toulouse, INSERM 1301, CNRS 5070, EFS, ENVT, 31100 Toulouse, France

* Correspondence: jean-sebastien.silvestre@inserm.fr (J.-S.S.); beatrice.cousin@inserm.fr (B.C.)

† These authors contributed equally to this work.

‡ These authors contributed equally to this work.

Abstract: Medullary and extra-medullary hematopoiesis has been shown to govern inflammatory cell infiltration and subsequently cardiac remodeling and function after acute myocardial infarction (MI). Emerging evidence positions adipose tissue (AT) as an alternative source of immune cell production. We, therefore, hypothesized that AT could act as a reservoir of inflammatory cells that participate in cardiac homeostasis after MI. To reveal the distinct role of inflammatory cells derived from AT or bone marrow (BM), chimeric mice were generated using standard repopulation assays. We showed that AMI increased the number of AT-derived macrophages in the cardiac tissue. These macrophages exhibit pro-inflammatory characteristics and their specific depletion improved cardiac function as well as decreased infarct size and interstitial fibrosis. We then reasoned that the alteration of AT-immune compartment in type 2 diabetes could, thus, contribute to defects in cardiac remodeling. However, in these conditions, myeloid cells recruited in the infarcted heart mainly originate from the BM, and AT was no longer used as a myeloid cell reservoir. Altogether, we showed here that a subpopulation of cardiac inflammatory macrophages emerges from myeloid cells of AT origin and plays a detrimental role in cardiac remodeling and function after MI. Diabetes abrogates the ability of AT-derived myeloid cells to populate the infarcted heart.

Keywords: macrophages; myocardial infarction; adipose tissue; diabetes



Citation: Gomez, I.; Robert, V.; Alayrac, P.; Arlat, A.; Duval, V.; Renoud, M.-L.; Vilar, J.; Lemitre, M.; Silvestre, J.-S.; Cousin, B. Identification of Adipose Tissue as a Reservoir of Macrophages after Acute Myocardial Infarction. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10498. <https://doi.org/10.3390/ijms231810498>

Academic Editor: Nadia Lampiasi

Received: 4 August 2022

Accepted: 6 September 2022

Published: 10 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Following injury, damaged tissue is repaired through the coordinated biological actions of different cell types, among which immune cells play a critical role. In a steady state condition, leukocytes mainly derive from bone marrow (BM) hematopoietic stem cells (HSCs). Remarkably, recent works have challenged the view of the medullary origin of hematopoiesis and found that systemic inflammation can also stimulate extramedullary hematopoiesis in adult mice and humans. Consistent with this, emerging evidence positions adipose tissue (AT) as an alternative reservoir of inflammatory cell production. Indeed, a significant population of cells harboring the same phenotype as BM-derived HSCs have been identified in AT [1,2]. These cells exhibit the functional features of bona-fide HSCs, such as multipotency and self-renewal. In addition, AT-derived HSCs present an intrinsic potential to replenish all major hematopoietic lineages in long term reconstitution assays, as well as to efficiently generate myeloid cells within AT but not in conventional hematopoietic organs, suggesting a priority homing to AT [2]. This endogenous AT hematopoietic activity contributes to tissue homeostasis not only in the AT-immune compartment, but also in other organs [3]. Indeed, AT could serve as a reservoir of myeloid cells able to contribute to tissue repair processes in the AT itself, and also in other organs. For example, AT-derived macrophages are required for AT regeneration [4] and AT-derived mast cells are capable

of homing to different organs such as the skin and gut, where they acquire the properties of functional tissue mast cells [5]. In agreement with this, cardiac mast cells populating the ischemic milieu mainly arise from AT [6]. Such endogenous AT hematopoiesis is altered in diabetes, leading to the production of inflammatory cells that sustain chronic low-grade inflammation [7], suggesting that AT reservoir potential and function could be modified in metabolic disease and could contribute to alteration of tissue repair process in the diabetic setting.

In the heart, both the innate and adaptive immune systems have been shown to regulate cardiac remodeling and function after acute myocardial infarction (MI). In particular, monocytes and macrophages exhibit a central role in the acute and chronic phases of post-MI cardiac repair, as the balance between their pathogenic and pro-healing function controls the disease outcome [8]. Of note, Ly6C^{high} monocytes are continuously recruited into ischemic tissue in the first week after MI, and maintenance of this influx depends on monocyte mobilization from a splenic reservoir [9], as well as activation of emergency myelopoiesis to increase monocyte production in the bone marrow (medullary monopoiesis) and the spleen (extramedullary monopoiesis) [10,11]. Many of these monocytes may either die or exit the cardiac tissue, whereas surviving monocytes populating the ischemic milieu may acquire distinct macrophage phenotypes associated with specific functions in the resolution of inflammation, tissue repair and remodeling [12]. Consistent with this, macrophages mediate the efferocytosis of injured cardiomyocytes, favoring the secretion of the proangiogenic and antifibrotic vascular endothelial growth factor to locally repair the dysfunctional heart [13].

Of great interest, in the setting of type 2 diabetes, monocyte and macrophage fates switch toward an inflammatory phenotype that precipitates adverse ventricular remodeling after acute MI [14]. Studied diabetic patients displayed an imbalanced inflammatory versus reparative macrophage ratio attributable to a reduction in the number of reparative cells [15]. The inflammatory versus reparative macrophage ratio was also directly correlated with waist circumference and glycated hemoglobin. In a rat model of type 2 diabetes, the heme oxygenase inducer, hemin, promoted preferential polarization of macrophages toward anti-inflammatory phenotype in cardiac tissue with concomitant improvement of cardiac function [16]. Diabetic mice had increased numbers of circulating Ly6C^{high} monocytes, reflecting hyperglycemia-induced proliferation and expansion of bone marrow myeloid progenitors, as well as release of monocytes into the circulation. Remarkably, treatment of hyperglycemia reduced monocytosis [17]. Hence, diabetes could also shape inflammatory cell infiltration through activation of monocyte mobilization from medullary and extramedullary reservoirs, including AT.

We, therefore, hypothesize that, in addition to metabolic and endocrine signals, AT could act as a reservoir of myeloid cells that participate in cardiac remodeling after MI. We also speculate that diabetes could impact inflammation-dependent cardiac remodeling through the activation of AT hematopoiesis.

2. Results

2.1. Establishment of Experimental Models

To reveal the distinct role of macrophages derived from AT or BM, chimeric mice were generated using standard repopulation assays, as previously described [2]. Briefly, lethally irradiated wild-type C57Bl/6 mice were reconstituted with 2.10^3 AT-HSC (AT-mice) or BM-HSC (BM-mice) sorted from tdTomato mice and with 2.10^5 BM cells isolated from wild-type C57Bl/6 mice (Figure 1A). Injection of BM cells ensured the survival of both AT-mice and BM-mice, as previously described [2,18]. Chimerism was determined by flow cytometry (Figure 1B) in AT, BM and spleen. Total chimerism in the AT reached 40 to 70% in AT- and BM-chimeric mice, respectively (Figure 1C). In contrast, chimerism in hematopoietic organs, i.e., BM and spleen, was detected only in BM-chimeric mice and not in AT-chimeric animals (Figure 1C), as previously described [2]. Using these experimental models, CD45⁺/dT⁺ cells were identified, and represented around 3–4% of total immune

cells in the heart of AT-mice, suggesting that a small population of CD45⁺ cells originating from AT populated the cardiac tissue in steady state conditions (Figure 1C).

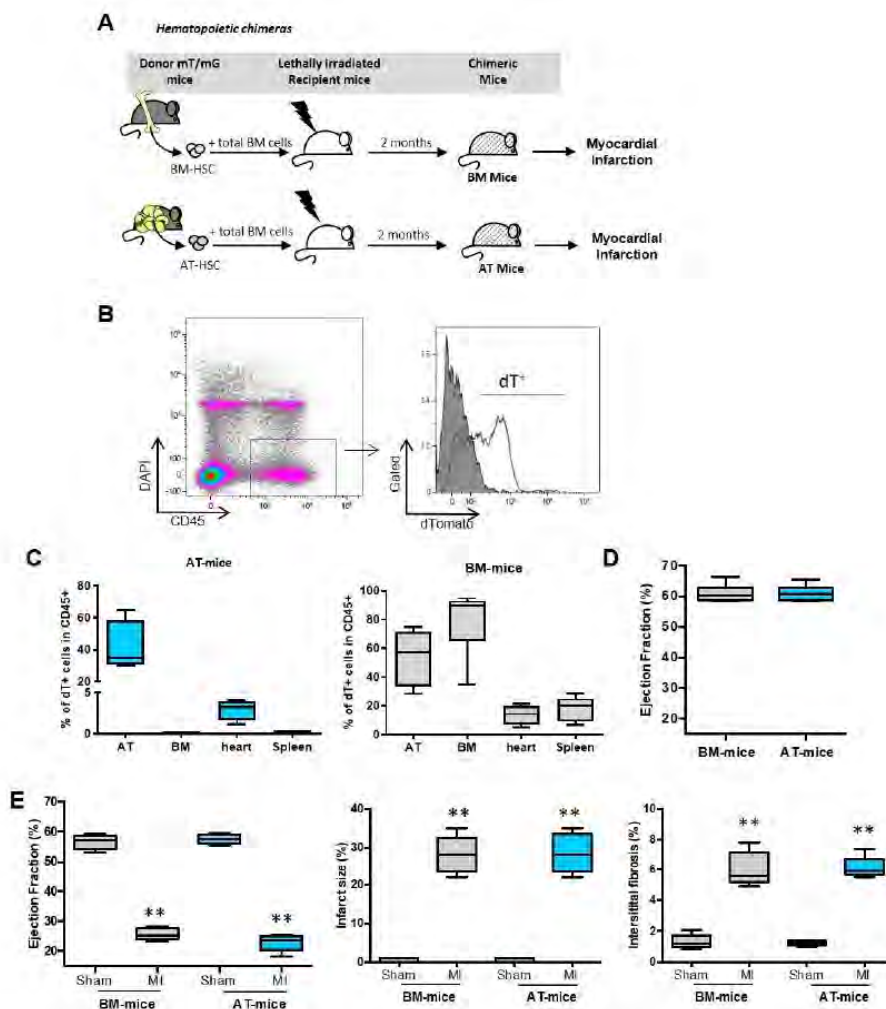


Figure 1. Establishment of chimeric mice models to reveal the distinct role of adipose tissue or bone marrow-derived inflammatory cells. (A) Hematopoietic chimera strategy: $2 \cdot 10^3$ hematopoietic stem cells (HSC) sorted from sub-cutaneous adipose tissue (AT) or bone marrow (BM) of mTmG mice were co-injected with $2 \cdot 10^5$ total BM cells from C57Bl6 mice into lethally irradiated C57Bl6 recipients. Eight weeks after hematopoietic reconstitution, chimeric mice were subjected to myocardial infarction. (B) Representative dot plots of flow cytometry analyses showing the chimerism (dT⁺ cells among CD45⁺ cells; open histogram) or wild type cells (dT⁻; grey histogram) in the AT of AT- chimeric mice (n = 4). (C) Quantification of the chimerism in sub-cutaneous AT, BM, heart and spleen of AT- and BM-chimeric mice (n = 4–6). (D) Ejection Fraction in unoperated AT- and BM chimeric mice (n = 8). (E) Quantification of ejection fraction, infarct size and interstitial fibrosis in sham and infarcted chimeric mice (n = 5). Comparisons between 2 group were performed using Dunn's multiple comparisons test. ** p < 0.01.

To assess the *in vivo* functional relevance of our experimental models, chimeric mice were subjected to myocardial infarction (MI), 8 weeks after reconstitution. Cardiac function was evaluated before and after MI in AT- and BM-chimeric mice. The left ventricle ejection fraction was similar in AT- and BM-mice before surgery (Figure 1D). As expected, MI prompted a severe decrease in left ventricle ejection fraction and a significant increase in infarct size as well as interstitial fibrosis, at 2 weeks after the onset of ischemia (Figure 1E). MI related effects on cardiac function and remodeling were similar in AT- and BM-mice, validating the use of these experimental models (Figure 1E).

2.2. A Subset of Cardiac Inflammatory Myeloid Cells Emerges from AT-Endogenous Hematopoiesis

We next hypothesized that MI could prompt the recruitment and infiltration of inflammatory cells originating from AT hematopoiesis within the cardiac tissue. Flow cytometry analyses were, thus, performed to identify dT⁺ immune cells in the heart and blood of AT-chimeric mice (Figure 2 and Supplementary Figure S1). No CD45⁺dT⁺ cells were present in the blood of mice before surgery, and only a few were identified in the heart (Figure 2A). MI increased CD45⁺dT⁺ cell numbers and percentage in blood and heart, reaching a maximum on day 7 after MI (Figure 2A). We then attempted to characterize the type of cardiac CD45⁺dT⁺ cells in this experimental setting at 7 days post-MI. dT⁺ cells were identified as mainly myeloid cells of monocyte and macrophage phenotype. dT⁺ cells were not detected within the population of lymphoid cells including T and B lymphocytes (Figure 2B).

To further confirm the relevance of the AT reservoir, we compared the number of monocytes and macrophages in both AT-mice and BM-mice. We showed that AT- and BM-mice displayed similar numbers of total and dT⁺ cardiac monocytes and macrophages at day 7 after MI (Figure 2C). Equivalent amounts of dT⁺ monocytes were also found in blood, BM and spleen, 7 days post-MI (Supplementary Figure S2A) showing that the engraftment of AT-derived myeloid cells was similar to medullar cells. To compare cells of adipose and BM origin, dT⁺ macrophages were sorted from the hearts of AT- and BM-chimeric mice, 7 days post-MI. dT⁺ macrophages from AT-mice and from BM-mice displayed similar expression of inflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-6 (Figure 2D), as well as of IFN γ , TNF α , IL-12p40, and chemokines (CCL2, CCL3 and CCL11) (Supplementary Figure S2B). In contrast, the production of anti-inflammatory cytokine IL-10 was significantly lower in cardiac macrophages sorted from AT-mice compared with BM-mice (Figure 2D), suggesting that cardiac macrophages derived from AT-endogenous hematopoiesis likely exert pro-inflammatory function.

These results demonstrate that pro-inflammatory myeloid cells originating from endogenous AT hematopoiesis are able to transiently infiltrate the heart after MI, where they are expected to exhibit pro-inflammatory characteristics and subsequently have deleterious effects on cardiac homeostasis.

2.3. Specific Depletion of AT-Derived Myeloid Cells Improves Cardiac Remodeling after MI

To determine the role of AT-derived macrophages in cardiac remodeling after MI, a hematopoietic repopulation assay was performed, using AT-HSC or BM-HSC isolated from mice expressing the diphtheria toxin receptor (DTR) under control of the full CD11c promoter [7], mixed with competitor BM cells from mT/mG mice, and transplanted into lethally irradiated mT/mG recipient mice. Chimeric mice received either diphtheria toxin (DT) in order to specifically deplete CD11c⁺ macrophages deriving from AT or BM, or PBS (Figure 3A). In both AT- and BM-mice, DT treatment reduced cardiac CD11c⁺ cells, and more specifically, cardiac CD11c⁺ macrophages (Figure 3B). As a result, cardiac function was improved as revealed by the increase in left ventricle ejection fraction in DT-treated mice compared with controls (Figure 3C). In addition, whereas capillary density was unaffected, both infarct size and interstitial fibrosis were significantly decreased after DT treatment (Figure 3C).

Finally, DT treatment reduced pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, IFN γ , and TNF α in the heart (Figure 4A) and blood (Figure 4B) in both AT- and BM-mice. DT treatment also decreased chemokines such as CCL2, CCL3, and CCL4 in the heart, confirming the local inflammation decline (Supplementary Figure S3A,B). These results suggest that pro-inflammatory CD11c⁺ cell-derived macrophages from AT origin display deleterious effects in the infarcted heart.

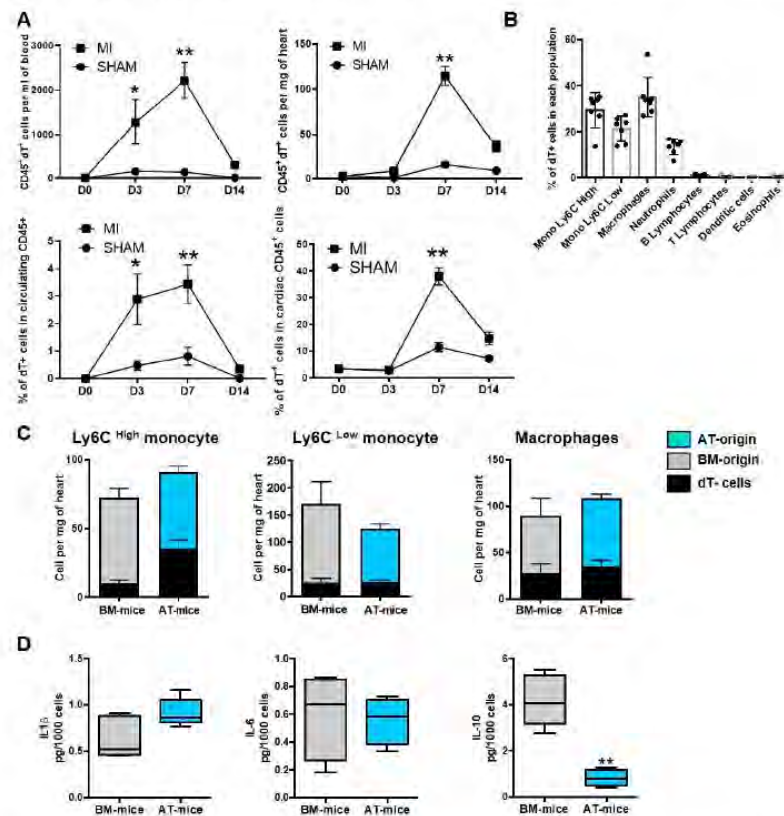


Figure 2. Adipose tissue is a reservoir of monocytes and macrophages populating the infarcted heart. (A) Quantification of CD45⁺/dT⁺ in blood and heart of sham and infarcted AT-chimeric mice (n = 4–9). (B) Percentage of dT⁺ cells in myeloid and lymphoid populations, in the heart of AT-mice, 7 days post MI (n = 7). (C) Quantification of dT⁺ and dT⁻ Ly6C^{high}, Ly6C^{low} monocytes and macrophages in the heart, 7 days after MI in BM- and AT-chimeric mice (n = 4–10). In the stacked bars, black columns indicate the number of dT⁻ cells and colored columns the number of dT⁺ cells in BM-mice (grey) or AT-mice (blue). (D) Quantification of IL-1 α , IL-6 and IL-10 production in cardiac macrophages sorted from BM- and AT-mice 7 days post MI (n = 4–6). Comparisons between groups were performed using Dunn's multiple comparisons test (B) or Mann-Whitney Test (D). * *p* < 0.05; ** *p* < 0.01.

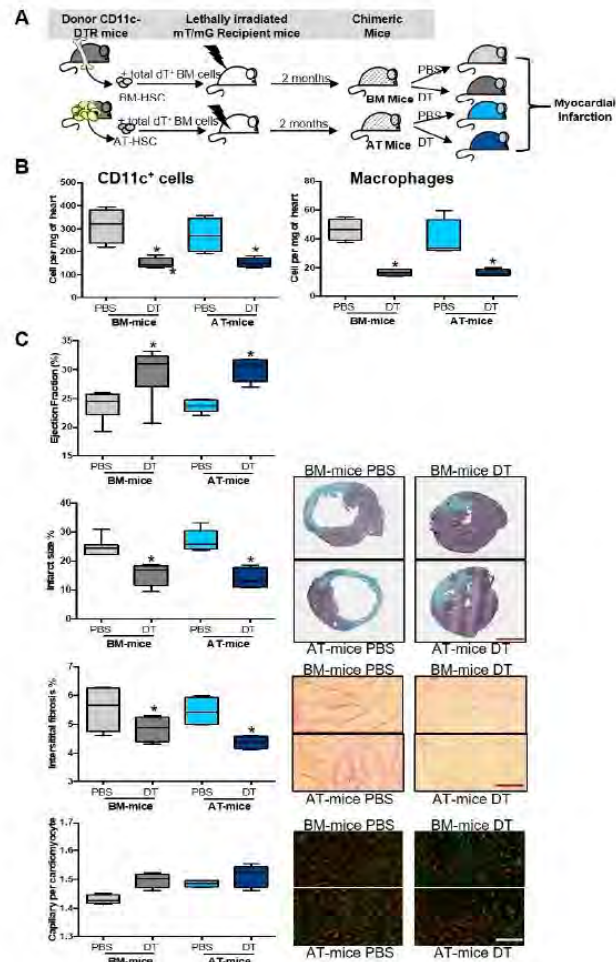


Figure 3. Depletion of adipose tissue-derived CD11c⁺ macrophages improves cardiac remodeling and function after acute MI. (A) Schematic representation of experimental procedure: lethally irradiated mT/mG recipient mice were co-injected with hematopoietic stem cells (HSC) sorted from subcutaneous adipose tissue (AT) or bone marrow (BM) and total BM cells isolated from CD11c-DTR and mT/mG donor mice, respectively. Eight weeks after reconstitution, chimeric mice were treated with diphtheria toxin (DT) or PBS as control at day 0, 3 and 6 after the ischemic insult. (B) Quantification of CD11c⁺ cells and CD11c⁺ macrophages in the heart, 7 days post-MI in BM- and AT-mice (n = 3–4). (C) Representative photomicrographs and quantification of ejection fraction, infarction size (scale bar, 2 mm), interstitial fibrosis (scale bar, 10 μm) and capillary density (scale bar, 10 μm) in BM and AT-mice treated with or without DT (n = 4–8). Comparisons between groups were performed using Dunn's multiple comparisons test. * p < 0.05 in DT vs. PBS treated mice.

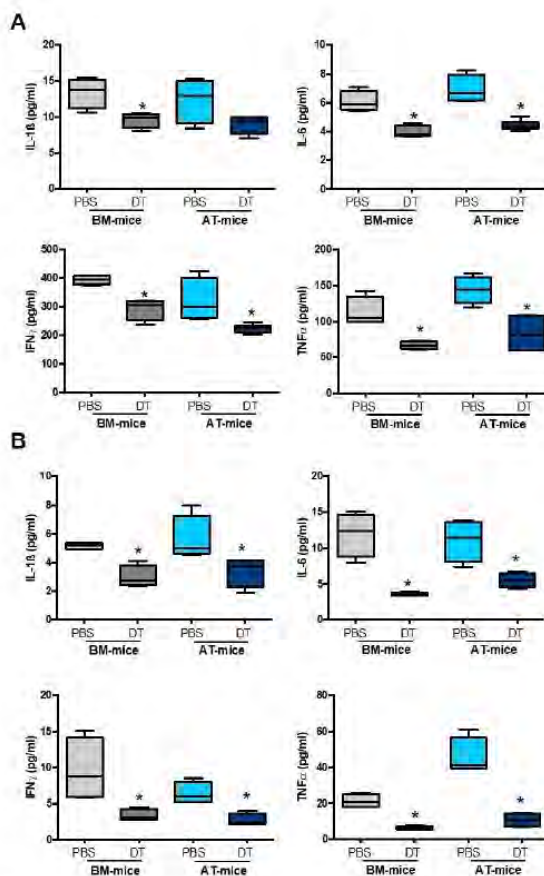


Figure 4. Depletion of adipose tissue-derived CD11c⁺ macrophages lowers cardiac inflammation. IL-1 α , IL-6, IFN γ and TNF α levels in the heart (A) and the blood (B) of AT- and BM- chimeric mice treated with or without diphtheria toxin (DT), 7 days post- MI (n = 4–6). Comparisons between groups were performed using Dunn's multiple comparisons test. * $p < 0.05$ in DT vs. PBS treated mice.

2.4. Diabetes Abrogates AT-Derived Cell Supply in the Heart

We then reasoned that pathological conditions affecting AT, such as a high fat diet (HFD), may exacerbate the contribution of AT-derived macrophages within cardiac tissue. For this purpose, AT- and BM-chimeric mice were fed either with normal chow (NC) or a HFD for 8 weeks (Figure 5A). HFD has previously been described to induce insulin resistance and dysglycemia in mice, including chimeras [7,19]. We first characterized the metabolic profile of these chimeric mice. As expected, after 8 weeks of HFD, total body weight and sub-cutaneous AT weight were slightly increased (Supplementary Figure S4A). Chimeric mice became glucose intolerant as revealed by an intraperitoneal glucose tolerance test, and their fasting glucose levels were significantly higher than those of normal chow fed mice (Supplementary Figure S4B). In MI mice, HFD induced a decrease in left ventricle ejection fraction (Figure 5B), and an increase in infarct size and interstitial fibrosis (Figure 5C), confirming that HFD worsens post-ischemic cardiac function and remodeling.

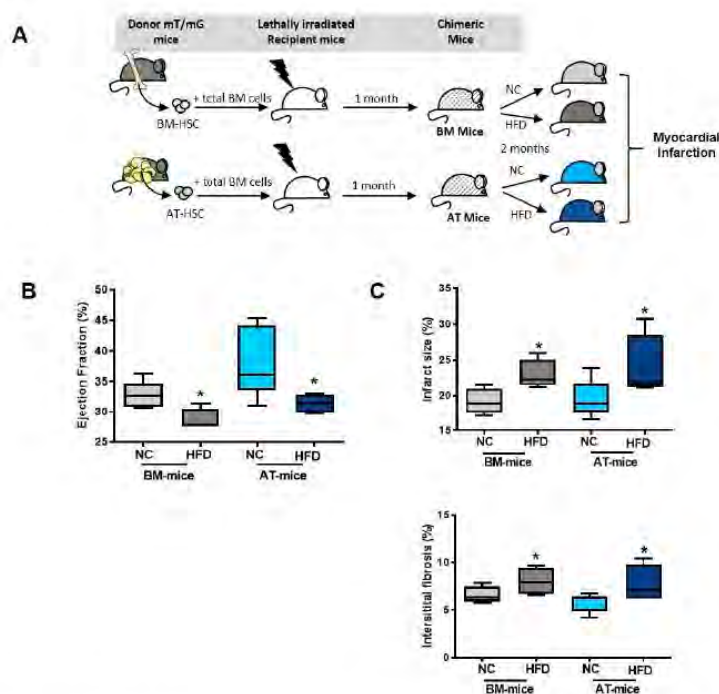


Figure 5. High Fat Diet worsens cardiac remodeling and function. (A) Schematic representation of experimental procedure: lethally irradiated recipient mice were co-injected with hematopoietic stem cells (HSC) sorted from sub-cutaneous adipose tissue (AT) or bone marrow (BM) and total BM cells isolated from mT/mG donor and C57Bl6 donor mice, respectively. Eight weeks after reconstitution, mice were then fed a normal Chow (NC) or a high fat diet (HFD) for 2 months. (B) Ejection fraction and (C) infarct size as well as interstitial fibrosis in BM- and AT- mice fed a normal Chow (NC) or a high fat diet (HFD) for 2 months and then challenged with MI ($n = 4-10$). Comparisons between groups were performed using Dunn's multiple comparisons test. * $p < 0.05$ in HFD vs. NC fed mice.

This alteration in cardiac remodeling was associated with an increase in $Ly6C^{High}$ and $Ly6C^{Low}$ monocytes and macrophages in the heart of HFD mice compared with NC animals, 7 days post-MI in both AT- and BM-chimeric mice (Figure 6A). However, in AT-chimeric mice, the percentage of dT^{+} cells within the myeloid populations did not increase in parallel (Figure 6A) suggesting that, in diabetic mice, myeloid cells recruited in the infarcted heart originated from the BM, and that AT was no longer used as a myeloid cell reservoir. The accumulation of cardiac monocytes and macrophages was associated with an increase in pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IFN γ) in the heart (Figure 6B) and blood (Figure 6C), suggesting a pro-inflammatory polarization for these macrophages. Chemokines levels were not changed in diabetic mice in both the heart (Supplementary Figure S4C) and blood (Supplementary Figure S4D), except for CCL4 that was increased in diabetic conditions in the infarcted heart.

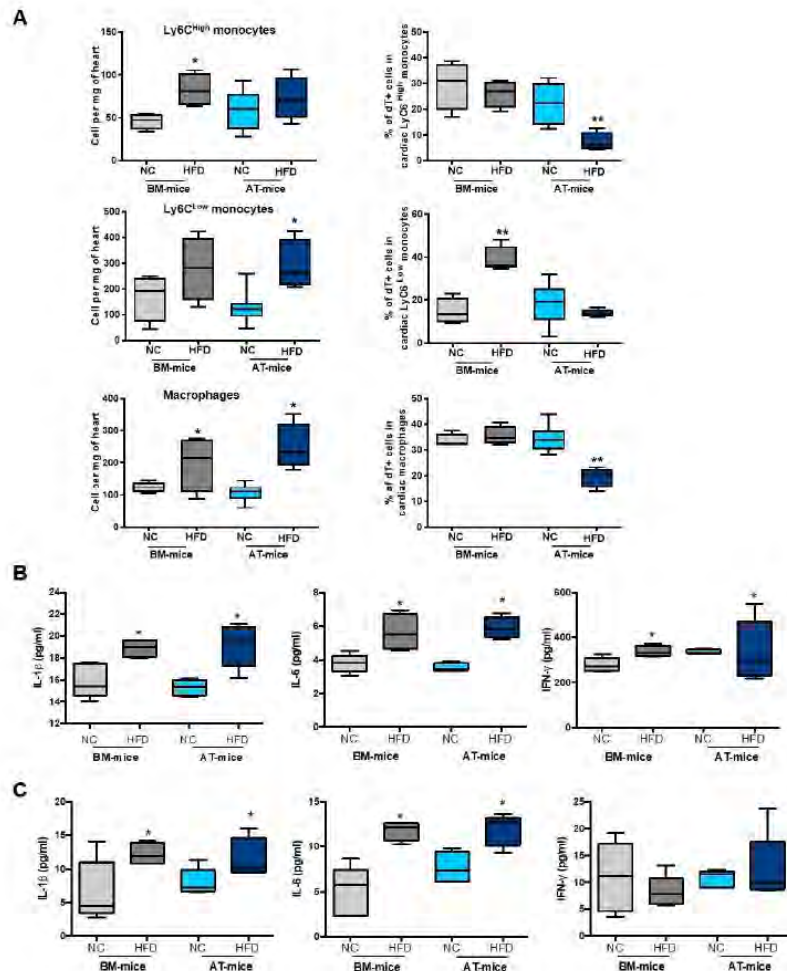


Figure 6. Diabetic chimeric mice exhibit higher cardiac inflammation. (A) Quantification of total and dT⁺ Ly6C^{High} and Ly6C^{Low} monocytes, and macrophages in the heart of BM- and AT-mice fed a normal chow (NC) or a high fat diet (HFD) for 8 weeks (n = 4–8). (B,C) Cytokine levels in the heart (B) and the blood (C) of BM- and AT-mice fed a normal chow (NC) or a high fat diet (HFD) for 8 weeks (n = 4–5). Analyses have been performed 7 days after the onset of acute MI. Comparisons between groups were performed using Dunn's multiple comparisons test. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ in HFD vs NC fed mice.

To confirm that macrophages deriving from endogenous AT hematopoiesis did not play a role in cardiac remodeling after MI under diabetic conditions, CD11c⁺ macrophages stemming from AT-hematopoiesis were specifically depleted using the strategy described above. Briefly, irradiated mice were reconstituted with AT-HSC or BM-HSC cells sorted from CD11c-DTR mice, before being fed with an HFD or an NC for 8 weeks. DT treatment was achieved before MI, and cardiac function and inflammation were estimated 14 days post-surgery. In diabetic BM-chimeric mice, DT treatment improved cardiac function and remodeling, as revealed by the increase in left ventricle ejection fraction and capillary density, and the decrease in interstitial fibrosis and infarct size (Figure 7A). Nevertheless, DT treatment did not restore cardiac function and remodeling in treated diabetic AT-chimeric mice (Figure 7A). In this line of reasoning, DT treatment decreased monocyte and macrophage numbers (Figure 7B) as well as pro-inflammatory cytokine levels (IL-1 β , IL-6

and IFN γ) (Figure 7C) in diabetic BM-chimeric mice but not in diabetic AT-chimeric mice. Altogether, these results suggest that diabetes abrogates the ability of AT-derived myeloid cells to populate the infarct heart.

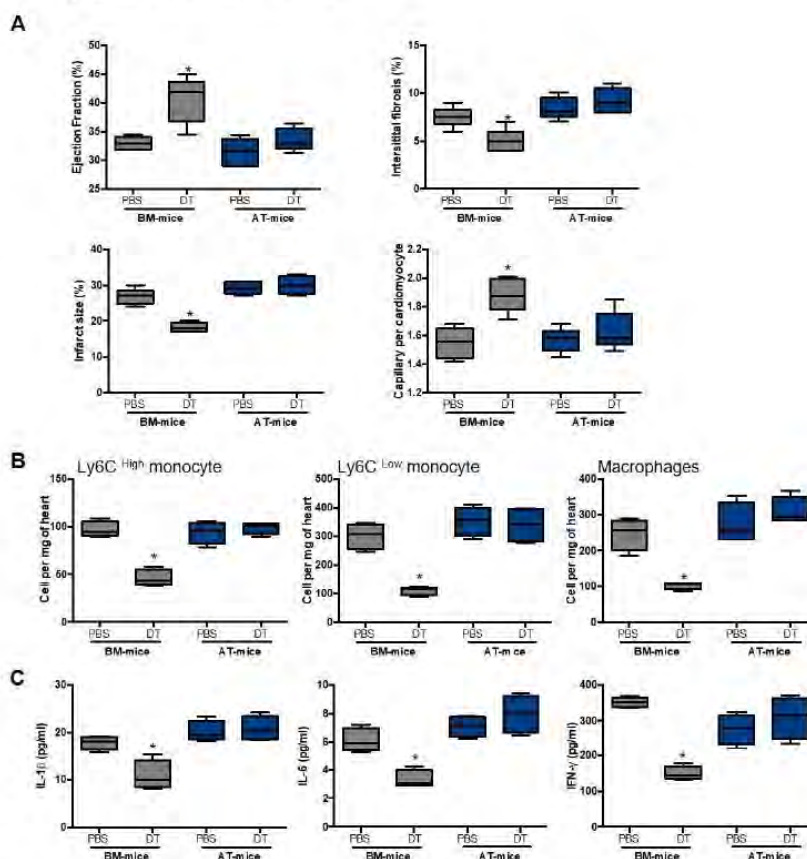


Figure 7. Adipose tissue-derived CD11c⁺ macrophage depletion did not regulate cardiac function and remodeling in diabetic mice. (A) Ejection fraction, interstitial fibrosis, infarct size and capillary density in diabetic BM- and AT-chimeric mice treated with or without diphtheria toxin (DT) (n = 6–8). (B) Monocyte and macrophage number in the heart of diabetic BM- and AT-chimeric mice treated with or without DT, (n = 6–8). (C) IL-1 α , IL-6 and IFN γ levels in the heart of diabetic BM- and AT-chimeric mice treated with or without diphtheria toxin (DT) (n = 4–6). Comparisons between groups were performed using Dunn's multiple comparisons test (* $p < 0.05$ in DT vs. PBS treated mice).

3. Discussion

In the present work, we demonstrated that a subset of cardiac inflammatory macrophages emerged from myeloid cells of AT origin and played a deleterious role in post MI cardiac remodeling. Furthermore, in diabetic conditions that worsen post-ischemic cardiac function and remodeling, the AT was no longer used as a reservoir for inflammatory macrophages.

Cardiac macrophages are a heterogeneous cell population of distinct origin exhibiting specific phenotype, function and localization. In steady state conditions, the adult heart contains subsets of resident macrophages of embryonic origin [20]. The low number of AT-derived cells in physiological conditions likely precludes a substantial role for these cells in cardiac homeostasis. In this line of reasoning, in physiological conditions, AT-derived immune cells primarily repopulate the AT immune compartment [2]. In sharp contrast, the contribution of the AT reservoir to the pool of cardiac monocytes and macrophages is substantial after acute MI. Ly6C^{High} monocytes are continuously recruited into the ischemic

tissue in the first week after MI, and maintenance of this influx depends on monocyte mobilization from a splenic reservoir and activation of emergency myelopoiesis to increase monocyte production in the bone marrow (medullary monopoiesis) and in the spleen (extramedullary monopoiesis) [10,11]. One can then speculate that AT could participate in the activation of emergency extramedullary myelopoiesis to increase inflammatory cell production and govern cardiac repair after acute MI.

Our results indicated that macrophages derived from AT-HSC promoted adverse ventricular remodeling and cardiac dysfunction. The deleterious role of AT-derived macrophages in post-ischemic cardiac remodeling contrasts with the beneficial function of these cells in the control of AT homeostasis and repair [4]. This dual role emphasizes the importance of macrophage imprinting by the cellular niche they reside in. Indeed, it has been shown that circulating monocytes engrafting in tissues, acquire the phenotype and functional properties of their resident counterparts [21]. Early after MI, the cardiac microenvironment is filled with pro-inflammatory mediators that are able to drive the polarization of macrophages [22]. One can, thus, postulate that AT-derived macrophages are shaped by the inflammatory post-ischemic cardiac niche and, thus, adopt an inflammatory profile, contributing to adverse remodeling of the infarcted heart.

This also indicates that cardiac macrophage states are strongly influenced by their tissue microenvironment, likely leading to substantial differences between mice and human macrophage-related effects. Macrophages within the mouse heart can be segregated into CCR2⁻ and CCR2⁺ subsets with distinct origins, repopulation processes and functions. On the same note, the human cardiac tissue comprises CCR2⁻ and CCR2⁺ macrophages with distinct functional properties and origins, equivalent to that of murine macrophages [23]. Nevertheless, even by using fate mapping studies in mice and single-cell RNA sequencing in humans to identify the most transcriptionally conserved subset of macrophages, these cells still display species-specific transcriptional differences [24]. In addition, human macrophages are a highly heterogeneous population of cells. It has been shown that stimulation of human macrophages with diverse activation signals, leads to the acquisition of a data set of 299 macrophage transcriptomes. Hence, although central transcriptional regulators associated with all human macrophage activation have been identified, they are under the control of stimulus-specific programs [25]. Furthermore, spatial multi-omic mapping of human myocardial infarction also reveals that a given cell state changes based on the cells' neighborhood. For example, gene-regulatory programs driving injury of cardiomyocytes, activated phagocytic macrophages and their relation to myofibroblast differentiation in cardiac tissue remodeling are dependent on specific myocardial tissue zones and disease stages [26]. Hence, tissue macrophage heterogeneity is a critical determinant of immune responses and likely governs the distinct ability of human or mouse macrophages to shape the infarcted heart.

Diabetes is associated with an increase in total macrophage number and pro-inflammatory cytokine production in the infarcted myocardium. In agreement with these data, we have previously shown that diabetes induces an alteration of endogenous myelopoiesis in the AT that leads to the production of pro-inflammatory macrophages [7]. A similar mechanism has been described for medullar HSC that undergo an epigenetic modification in diabetic mice, leading to increased macrophage number and pro-inflammatory polarization [27,28]. Although the total number of macrophages increased in the infarcted myocardium, the percentage of myeloid cells arising from the AT was severely decreased, showing that in diabetic conditions cardiac macrophages preferentially derive from circulating medullar monocytes. In agreement with this, the specific depletion of AT-derived macrophages had no effect on cardiac function after MI, whereas improvement of cardiac function was observed following depletion of BM-derived macrophages. Hence, in diabetes, AT-derived macrophages do not engraft in the myocardium and are, thus, not involved in cardiac remodeling. It is likely that medullar macrophages have a competitive advantage over AT-derived macrophages for engraftment in the diabetic cardiac niche. In this line of reasoning, the diabetic heart is

characterized by structural and metabolic abnormalities [29,30] that could explain differential cell engraftment.

We identified a novel population of cardiac macrophages that derives from endogenous AT hematopoiesis and accumulates in the infarcted myocardium, harboring deleterious effect in cardiac homeostasis. Identification of the molecular and cellular mechanisms that control AT-derived macrophages recruitment and polarization will provide new insights in the regulation of cardiac remodeling following MI.

4. Materials and Methods

Animals: Experiments were performed on 5 to 7 week-old male C57BL/6 mice (Envigo, Gannat, France), congenic male B6.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J (mTmG mice, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA, stock N°007676), and CD11c⁺-DTR mice. Animals were group-housed in a controlled environment (12 h light/dark cycles at 21 °C) with unrestricted access to water and a standard chow diet in a pathogen-free animal facility. For CD11c⁺ cell depletion, mice received an intraperitoneal injection of diphtheria toxin (20 ng/kg) at day 0, and 3 and 6 days after the onset of MI. Mice were euthanized by cervical dislocation under prior sedation by inhalation of isoflurane (2.5%).

Single cell suspensions: At mice necropsy, BM cells were immediately flushed from the sampled femurs and tibias with α -MEM medium (Life Technologies, Saint Aubin, France). Splenocyte suspensions were obtained by crushing the spleen through a 40 μ m cell strainer and a red blood cell lysing buffer (StemCell Technologies, Saint Egrève, France) was used to remove red blood cells. Subcutaneous AT was carefully dissected, mechanically dissociated and digested at 37 °C with collagenase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) for 30 min. Cells from the AT stroma vascular fraction (SVF) were collected by centrifugation after elimination of undigested fragments by filtration, as previously described [2]. Red blood cells were removed by incubation in hemolysis buffer (140 mM NH₄Cl and 20 mM Tris, pH 7.6). Left ventricles were collected and minced with fine scissors, gently passed with PBS/1% fetal bovine serum (FBS) through a 12-well Tissue Disaggregator (Bel-Art™ Scienceware™, Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France), and then filtered through 40 μ m nylon mesh to generate cardiac cell suspensions. Cells were then counted and used for flow cytometry, or real-time PCR.

Competitive repopulation assays: Competitive repopulation assays were conducted as described previously [2]. Briefly, 2.10³ Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺ cells (HSC) sorted from the AT or the BM of donor mice were mixed with 2.10⁵ competitor BM total cells from C57BL/6 mice. In all the experiments, control and experimental HSC were sorted from animals of equal age. The mixed population was intravenously injected into lethally irradiated (10Gy, ¹³⁷Cs source) recipient mice of equal age, previously anesthetized by inhalation of isoflurane (2.5%). Mice reconstituted with AT- or BM-HSC (AT- or BM-mice) were then allowed to recover for 8 weeks. All experiments were carried out in compliance with European Community Guidelines (2010/63/UE) and approved by the Institutional Ethics Committee (US 006/CREFRE; CEEA-122) and from the Ministry of National Education, Higher Education and Research (protocol reference: 10691). Chimerism was assessed by quantifying Tomato⁺ (dT⁺) cells among total CD45⁺ cells in the SVF.

Acute myocardial infarction: Myocardial infarction was induced by left coronary ligation as previously described [31,32]. All experiments were conducted according to the Ethical Committee for Animal Experimentation (University of Paris, CEEA 34) and the National Charter on the Ethics on Animal Experimentation from the French Minister of Higher Education and Research under the reference MESR: n° 01373.01. Briefly, after their anesthesia using ketamine (100 mg/kg body weight) and xylazine (10 mg/kg body weight), mice underwent a thoracotomy in the fourth left intercostal space, and a ligation of the left anterior descending artery. The same procedure was performed on the sham-operated mice except that the ligation was not tied. Transthoracic echocardiography was performed using an echocardiograph (ACUSON S3000 ultrasound) equipped with a 14 MHz linear

transducer (1415SP) as previously described [31,32]. Two-dimensional parasternal long-axis views of the left ventricle (LV) were obtained for guided B-mode measurements at the end of the diastole (d) and systole (s). For functional analysis of the LV viable myocardium, we evaluated the LV end diastolic and end systolic volume. Percentage ejection fraction (%EF) was calculated using the following formula: %EF = [(LVEDV-LVESV)/LVEDV] × 100 [32]. For evaluation of cardiac remodeling, hearts were excised, rinsed in PBS and frozen in liquid nitrogen. Hearts were cut by a cryostat (CM 3050S, Leica, Paris, France) into 5–7 µm thick sections. Masson's trichrome and Sirius red staining were performed for infarct size and myocardial fibrosis evaluation, respectively. Infarct size was calculated as the ratio of total infarct circumference divided by total left ventricle circumference, as previously described [31,32]. The collagen volume fraction was calculated as the ratio of the total area of interstitial fibrosis to the myocyte area in the entire visual field of the section. Endothelial cells within capillaries were visualized after Bandeiraea Simplicifolia lectin staining (1:100, FITC-conjugated Griffonia simplicifolia, Sigma-Aldrich, Saint-quentin Fallavier, France), and cardiomyocytes after wheat germ agglutinin staining (1:200, Texas Red-conjugated, ThermoFisher, Montigny le Bretonneux, France). The results are expressed as a ratio of the number of capillaries per cardiomyocytes.

Flow cytometry analysis and cell sorting: Single-cell suspensions of mice spleen, BM, heart, blood and SVF were stained in PBS containing FcR-blocking reagent for 30 min at 4 °C with fluorescent-conjugated antibodies. Phenotyping was performed by immunostaining with conjugated rat anti-mouse Abs and compared with isotype-matched control Abs (Supplementary Table S1). Events were then acquired on a LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences, Le pont de claux, France). Data acquisition and analysis were performed using Diva (version 8, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and Kalusa version 1.2 (Beckman Coulter, Villepinte, France) or FlowJo software version 10.4.2 (FlowJo LLC, Becton Dickinson, Ashland, OR, USA). Dead cells, debris or red blood cells were excluded according to forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) profiles. CD45⁺ leukocytes were then gated: dendritic cells were identified as CD11c^{high}MHCII^{high} cells, neutrophils as CD11b⁺Ly6G⁺ cells, monocytes as CD11b⁺F4/80⁻Ly6G⁻Ly6C^{high} or Ly6C^{low} cells, macrophages as CD11b⁺Ly6G⁻CD64⁺F4/80⁺ cells. CD11b⁻ leukocytes were recognized and then gated on B220 and CD3: B lymphocytes were characterized as B220⁺ cells, T cells as CD3⁺ cells and then stratified by CD4 and CD8 expression.

For HSC-sorting experiments, SVF cells were stained with Ly-6A/E (Sca-1), CD117 (c-Kit) antibodies, and Lineage Panel (Lin). Cells negative for lineage markers were gated, and Sca-1 and CD117 double-positive cells were sorted (BD FACSAria Fusion III Cell sorter, BD Biosciences), as previously described [2]. Enrichment of the HSC was determined by flow cytometry and varied between 92% and 97%.

For cardiac macrophage sorting, hearts were collected and enzymatically digested for 30 min in a buffer containing Collagenase II (1 mg/mL, Serlabo technologies, Entraigues, France), Collagenase IV (1 mg/mL, Serlabo technologies, Entraigues, France) and Protease XIV (0.1 mg/mL, Sigma-Aldrich). Single-cell suspension was then obtained by passing through a 40 µm cell strainer, before staining with fluorescently tagged antibodies and eFluor780-conjugated Fixable Viability Dye (eBioscience, Villebon sur Yvette, France).

Characterization of cardiac macrophages: FACS-sorted cardiac macrophages were then used to assess cytokine levels using Bio-Plex Multiplex Immunoassay System (Bio-Rad, Marnes la coquette, France).

Statistical analysis: Variance between three or more independent groups was compared by using Kruskal-Wallis one-way ANOVA. Statistical differences were measured using Dunn's multiple comparisons test or non-parametric Mann-Whitney Test. All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 9.0 software (Ritme, Paris, France). A *p* value < 0.05 was considered significant. The following symbols for statistical significance were used throughout the manuscript: * *p* < 0.05; ** *p* < 0.01; *** *p* < 0.001.

Supplementary Materials: The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms231810498/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, J.-S.S. and B.C.; methodology, validation and formal analysis, I.G. and V.R.; investigation, I.G., V.R., P.A., A.A., V.D., M.-L.R., J.V. and M.L.; writing—original draft preparation, review and editing, visualization, supervision, project administration and funding acquisition, J.-S.S. and B.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by French National Research Agency (ANR), Project «WAT-HEART» (ANR 16-CE14-0006-01 & ANR 16-CE14-0006-02).

Institutional Review Board Statement: The animal study protocols were carried out in compliance with European Community Guidelines (2010/63/UE), and approved by the institutional ethics committees (US 006/CREFRE; CEEA-122, and University of Paris, CEEA 34) and from the Ministry of National Education, Higher Education and Research (protocol reference: 10691 and 01373.01). The reporting in the manuscript follows the recommendations in the ARRIVE guidelines.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

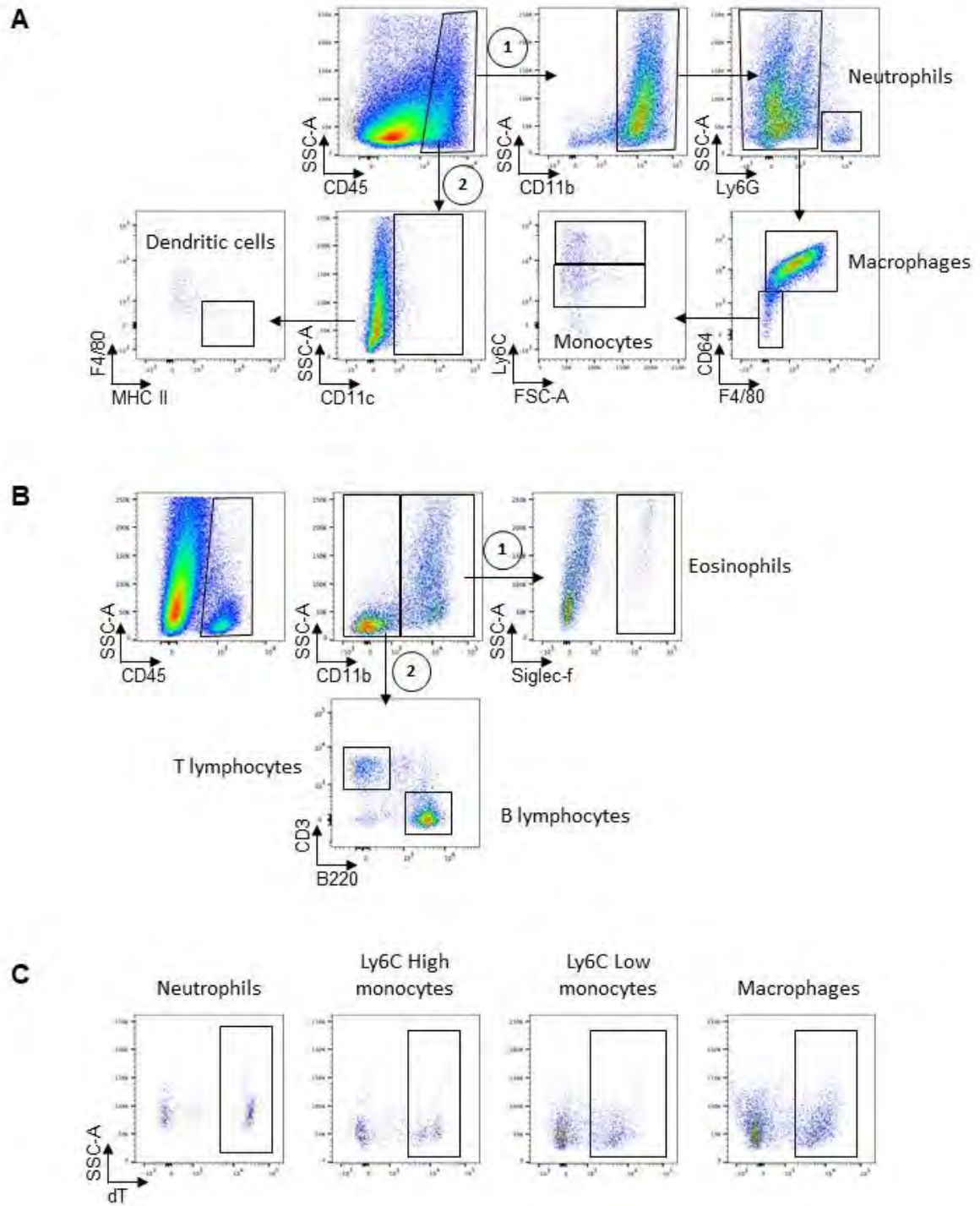
Acknowledgments: The authors thank the US006/CREFRE INSERM/UPS (Toulouse, France) and specifically the zootechnical core facility for animal care, as well as the imaging platform for small animals of Université de Paris for echocardiographic analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

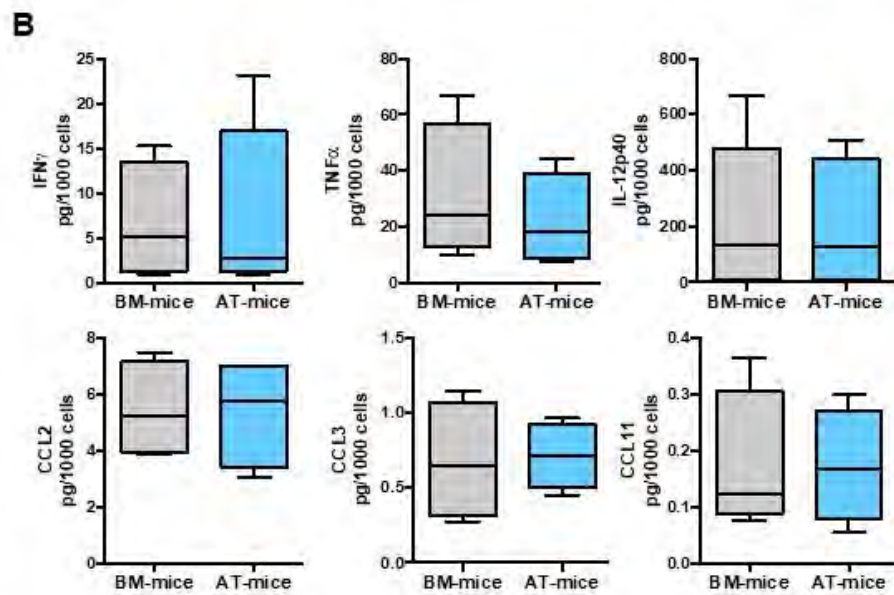
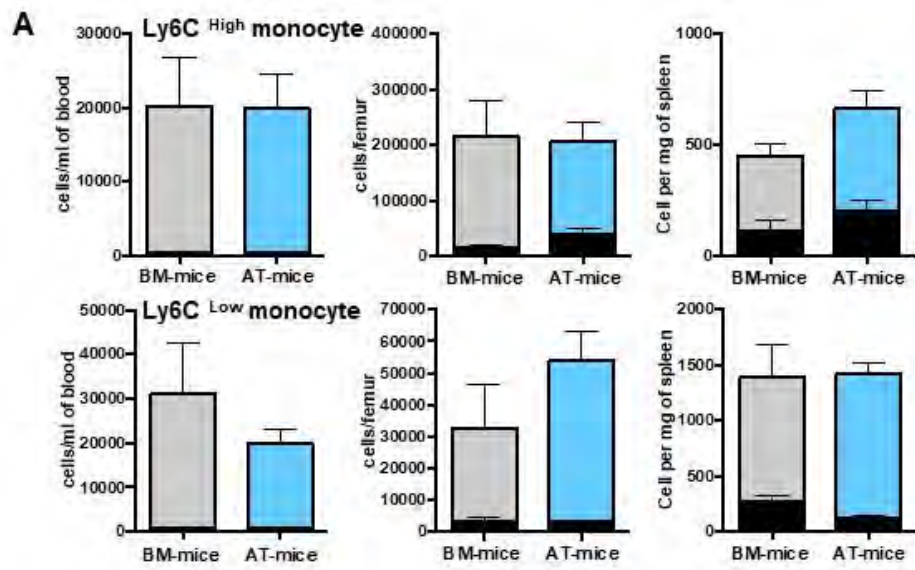
References

- Han, J.; Koh, Y.J.; Moon, H.R.; Ryoo, H.G.; Cho, C.H.; Kim, I.; Koh, G.Y. Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **2010**, *115*, 957–964. [CrossRef] [PubMed]
- Poglio, S.; De Toni, F.; Lewandowski, D.; Minot, A.; Arnaud, E.; Barroca, V.; Laharrague, P.; Casteilla, L.; Cousin, B. In situ production of innate immune cells in murine white adipose tissue. *Blood* **2012**, *120*, 4952–4962. [CrossRef] [PubMed]
- Cousin, B.; Casteilla, L.; Laharrague, P.; Luche, E.; Lorsignol, A.; Cuminetti, V.; Paupert, J. Immuno-metabolism and adipose tissue: The key role of hematopoietic stem cells. *Biochimie* **2016**, *124*, 21–26. [CrossRef] [PubMed]
- Rabiller, L.; Robert, V.; Arlat, A.; Labit, E.; Ousset, M.; Salon, M.; Coste, A.; Costa-Fernandes, D.; Monsarrat, P.; Ségui, B.; et al. Driving regeneration, instead of healing, in adult mammals: The decisive role of resident macrophages through efferocytosis. *NPJ Regen. Med.* **2021**, *6*, 1–12. [CrossRef]
- Poglio, S.; De Toni-Costes, F.; Arnaud, E.; Laharrague, P.; Espinosa, E.; Casteilla, L.; Cousin, B. Adipose tissue as a dedicated reservoir of functional mast cell progenitors. *Stem Cells* **2010**, *28*, 2065–2072. [CrossRef]
- Ngkelo, A.; Richart, A.; Kirk, J.A.; Bonnin, P.; Vilar, J.; Lemitre, M.; Marck, P.; Branchereau, M.; Le Gall, S.; Renault, N.; et al. Mast cells regulate myofilament calcium sensitization and heart function after myocardial infarction. *J. Exp. Med.* **2016**, *213*, 1353–1374. [CrossRef]
- Luche, E.; Robert, V.; Cuminetti, V.; Pomie, C.; Sastourne-Arrey, Q.; Waget, A.; Arnaud, E.; Varin, A.; Labit, E.; Laharrague, P.; et al. Corrupted adipose tissue endogenous myelopoiesis initiates diet-induced metabolic disease. *eLife* **2017**, *6*, e23194. [CrossRef]
- Peet, C.; Ivetic, A.; Bromage, D.I.; Shah, A.M. Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* **2020**, *116*, 1101–1112. [CrossRef]
- Nahrendorf, M.; Swirski, F.K.; Aikawa, E.; Stangenberg, L.; Wurdinger, T.; Figueiredo, J.L.; Libby, P.; Weissleder, R.; Pittet, M.J. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 3037–3047. [CrossRef]
- Swirski, F.K.; Nahrendorf, M.; Etzrodt, M.; Wildgruber, M.; Cortez-Retamozo, V.; Panizzi, P.; Figueiredo, J.L.; Kohler, R.H.; Chudnovskiy, A.; Waterman, P.; et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* **2009**, *325*, 612–616. [CrossRef]
- Leuschner, F.; Rauch, P.J.; Ueno, T.; Gorbатов, R.; Marinelli, B.; Lee, W.W.; Dutta, P.; Wei, Y.; Robbins, C.; Iwamoto, Y.; et al. Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. *J. Exp. Med.* **2012**, *209*, 123–137. [CrossRef] [PubMed]
- Sica, A.; Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. *J. Clin. Investig.* **2012**, *122*, 787–795. [CrossRef] [PubMed]

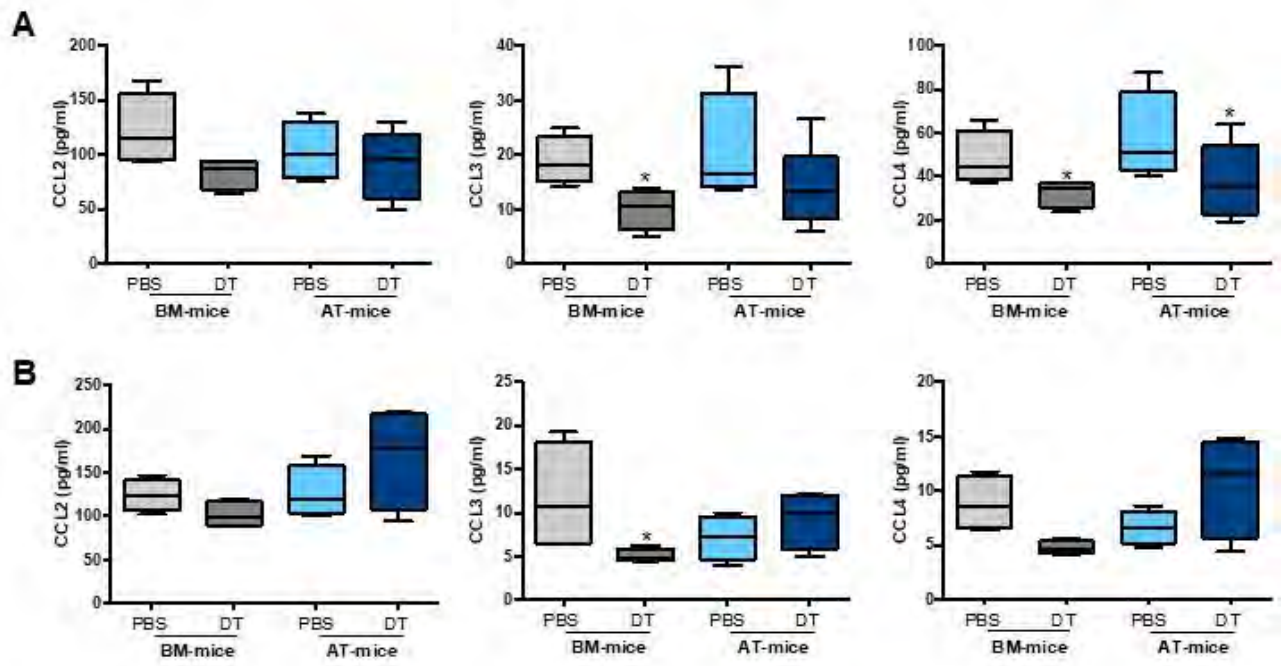
13. Howangyin, K.Y.; Zlatanova, I.; Pinto, C.; Ngkelo, A.; Cochain, C.; Rouanet, M.; Vilar, J.; Lemitre, M.; Stockmann, C.; Fleischmann, B.K.; et al. Myeloid-Epithelial-Reproductive Receptor Tyrosine Kinase and Milk Fat Globule Epidermal Growth Factor 8 Coordinately Improve Remodeling After Myocardial Infarction via Local Delivery of Vascular Endothelial Growth Factor. *Circulation* **2016**, *133*, 826–839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Singla, D.K.; Singla, R.D.; Abdelli, L.S.; Glass, C. Fibroblast growth factor-9 enhances M2 macrophage differentiation and attenuates adverse cardiac remodeling in the infarcted diabetic heart. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0120739. [[CrossRef](#)]
15. Fadini, G.P.; de Kreutzenberg, S.V.; Boscaro, E.; Albiero, M.; Cappellari, R.; Krankel, N.; Landmesser, U.; Toniolo, A.; Bolego, C.; Cignarella, A.; et al. An unbalanced monocyte polarisation in peripheral blood and bone marrow of patients with type 2 diabetes has an impact on microangiopathy. *Diabetologia* **2013**, *56*, 1856–1866. [[CrossRef](#)]
16. Jadhav, A.; Tiwari, S.; Lee, P.; Ndisang, J.F. The heme oxygenase system selectively enhances the anti-inflammatory macrophage-M2 phenotype, reduces pericardial adiposity, and ameliorated cardiac injury in diabetic cardiomyopathy in Zucker diabetic fatty rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2013**, *345*, 239–249. [[CrossRef](#)]
17. Nagareddy, P.R.; Murphy, A.J.; Stirzaker, R.A.; Hu, Y.; Yu, S.; Miller, R.G.; Ramkhalawon, B.; Distel, E.; Westerterp, M.; Huang, L.S.; et al. Hyperglycemia promotes myelopoiesis and impairs the resolution of atherosclerosis. *Cell Metab.* **2013**, *17*, 695–708. [[CrossRef](#)]
18. Miller, C.L.; Dykstra, B.; Eaves, C.J. Characterization of mouse hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr. Protoc. Immunol.* **2008**, *22*, 22B.2. [[CrossRef](#)]
19. Burcelin, R.; Crivelli, V.; Dacosta, A.; Roy-Tirelli, A.; Thorens, B. Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2002**, *282*, E834–E842. [[CrossRef](#)]
20. Zaman, R.; Hamidzada, H.; Epelman, S. Exploring cardiac macrophage heterogeneity in the healthy and diseased myocardium. *Curr. Opin. Immunol.* **2021**, *68*, 54–63. [[CrossRef](#)]
21. Guilliams, M.; Thierry, G.R.; Bonnardel, J.; Bajenoff, M. Establishment and Maintenance of the Macrophage Niche. *Immunity* **2020**, *52*, 434–451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Frantz, S.; Nahrendorf, M. Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease. *Cardiovasc. Res.* **2014**, *102*, 240–248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Bajpai, G.; Schneider, C.; Wong, N.; Bredemeyer, A.; Hulsmans, M.; Nahrendorf, M.; Epelman, S.; Kreisel, D.; Liu, Y.; Itoh, A.; et al. The human heart contains distinct macrophage subsets with divergent origins and functions. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 1234–1245. [[CrossRef](#)]
24. Dick, S.A.; Wong, A.; Hamidzada, H.; Nejat, S.; Nechanitzky, R.; Vohra, S.; Mueller, B.; Zaman, R.; Kantores, C.; Aronoff, L.; et al. Three tissue resident macrophage subsets coexist across organs with conserved origins and life cycles. *Sci. Immunol.* **2022**, *7*, eabf777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Xue, J.; Schmidt, S.V.; Sander, J.; Draffehn, A.; Krebs, W.; Quester, I.; De Nardo, D.; Gohel, T.D.; Emde, M.; Schmidleithner, L.; et al. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* **2014**, *40*, 274–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Kuppe, C.; Ramirez Flores, R.O.; Li, Z.; Hayat, S.; Levinson, R.T.; Liao, X.; Hannani, M.T.; Tanevski, J.; Wunnemann, F.; Nagai, J.S.; et al. Spatial multi-omic map of human myocardial infarction. *Nature* **2022**, *608*, 766–777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Yan, J.; Tie, G.; Wang, S.; Tutto, A.; DeMarco, N.; Khair, L.; Fazzio, T.G.; Messina, L.M. Diabetes impairs wound healing by Dnmt1-dependent dysregulation of hematopoietic stem cells differentiation towards macrophages. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 33. [[CrossRef](#)]
28. Barman, P.K.; Koh, T.J. Macrophage Dysregulation and Impaired Skin Wound Healing in Diabetes. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 528. [[CrossRef](#)]
29. Ritchie, R.H.; Abel, E.D. Basic Mechanisms of Diabetic Heart Disease. *Circ. Res.* **2020**, *126*, 1501–1525. [[CrossRef](#)]
30. Lopaschuk, G.D. Metabolic Abnormalities in the Diabetic Heart. *Heart Fail. Rev.* **2002**, *7*, 149. [[CrossRef](#)]
31. Zlatanova, I.; Pinto, C.; Bonnin, P.; Mathieu, J.R.; Bakker, W.; Vilar, J.; Lemitre, M.; Voehringer, D.; Vaulont, S.; Peyssonnaud, C.; et al. Iron Regulator Hepcidin Impairs Macrophage-Dependent Cardiac Repair After Injury. *Circulation* **2019**, *139*, 1530–1547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Lima Correa, B.; El Harane, N.; Gomez, I.; Rachid Hocine, H.; Vilar, J.; Desgres, M.; Bellamy, V.; Keiriththana, K.; Guillas, C.; Perotto, M.; et al. Extracellular vesicles from human cardiovascular progenitors trigger a reparative immune response in infarcted hearts. *Cardiovasc. Res.* **2021**, *117*, 292–307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



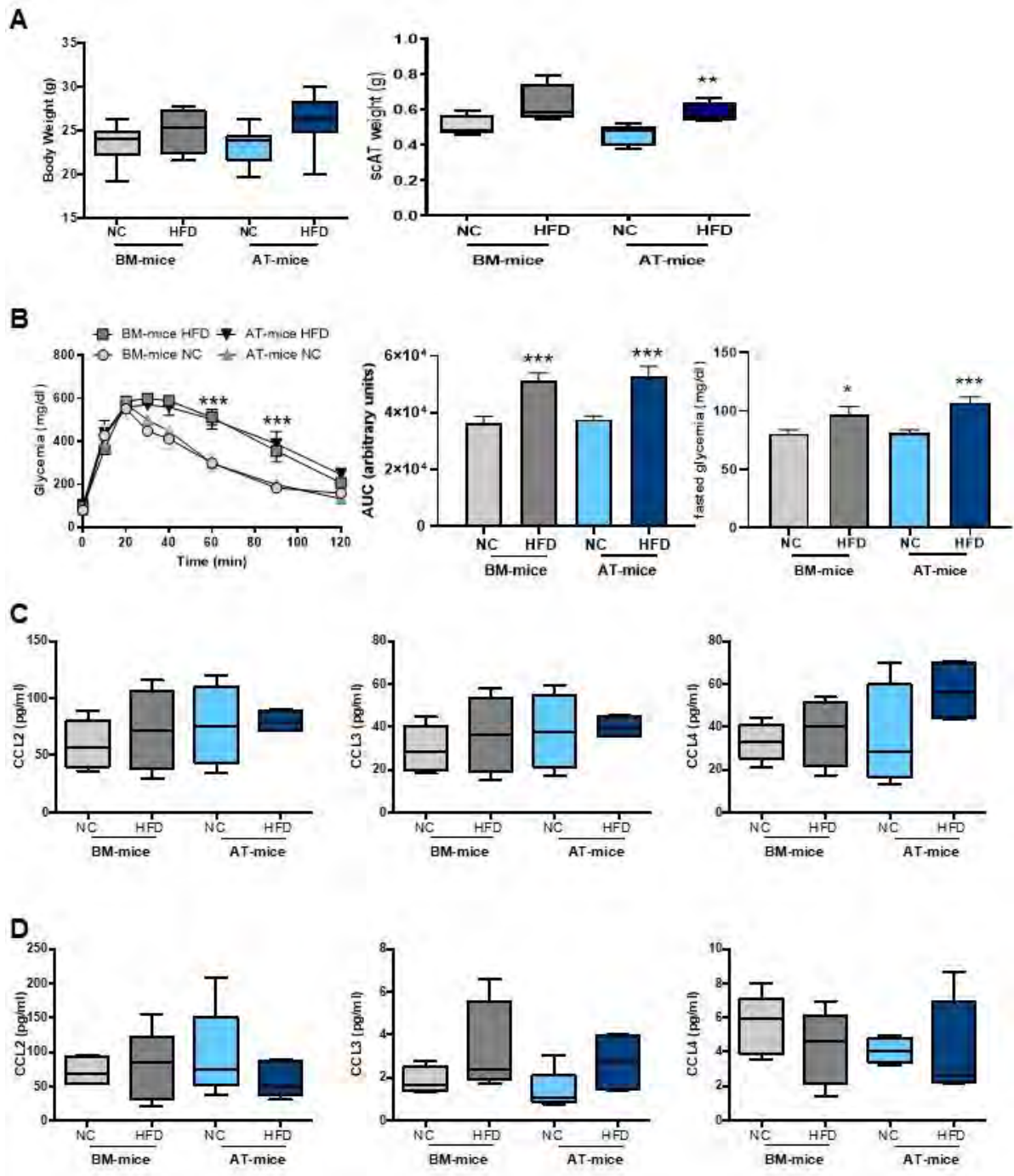
Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 3



Supplemental Figure 4

3. Un modèle de lésion particulier : le vieillissement

D'un point de vue biologique le vieillissement est caractérisé comme étant le produit de l'accumulation de dommages moléculaires et cellulaires, qui, avec le temps entraînent une perte d'homéostasie tissulaire se traduisant par une moins bonne capacité de réparation des organes (Schmauck-Medina et al. 2022). Il a été mis en évidence que l'inflammation joue un rôle primordial dans l'établissement de ce statut biologique. En effet, le vieillissement est caractérisé par une augmentation de la concentration de molécules pro-inflammatoires dans la circulation aussi appelé « inflammaging » (Franceschi & Campisi 2014). Cette inflammation chronique de bas grade est délétère pour le bon fonctionnement des organes notamment pour la réparation tissulaire car elle semble associée à la fibrose (Wynn & Ramalingam 2012b). Avec l'âge, le TA subit de nombreux changements et il a été proposé comme un indicateur de fragilité et de déclin de l'état de santé (Stout et al. 2017; Ou et al. 2022). En effet, il est l'un des premiers organes impacté par le vieillissement avec une accumulation de l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire et la production de matrice extra-cellulaire (Schaum et al. 2019) mais également avec une accumulation de cellules inflammatoires (Lumeng et al. 2011). Le TA semble également être une source importante de cytokines pro-inflammatoires au cours du vieillissement, participant à la mise en place de « l'inflammaging » (Starr et al. 2009).

Par ailleurs, le vieillissement se caractérise également par une modification de l'équilibre tissulaire en terme de composition en macrophages. En effet, il semblerait qu'au cours du temps, les macrophages résidents soient peu à peu remplacés par ceux dérivés des monocytes circulants (Molawi et al. 2014; Geissmann et al. 2003) et que les macrophages résidents des tissus acquièrent un phénotype pro-inflammatoire (Duong et al. 2021). Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle une perturbation de l'hématopoïèse du TA au cours du vieillissement ayant pour conséquence la modification phénotypique et/ou fonctionnelle des macrophages résidents du TA pourrait participer à la mise en place des dérégulations inflammatoires associées au vieillissement.

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé le même modèle de chimères hématopoïétiques que précédemment. Après avoir vérifié l'efficacité de la reconstitution

hématopoïétique 2 mois après la greffe par biopsies du TA, nous avons laissé les souris vieillir jusqu'à 12 à 15 mois, âge maximum de survie des chimères. Nous avons ensuite prélevé les TA sous-cutanés de ces chimères et avons quantifié par cytométrie de flux les populations de cellules immunitaires et analysé leur origine.

3.1. Résultats

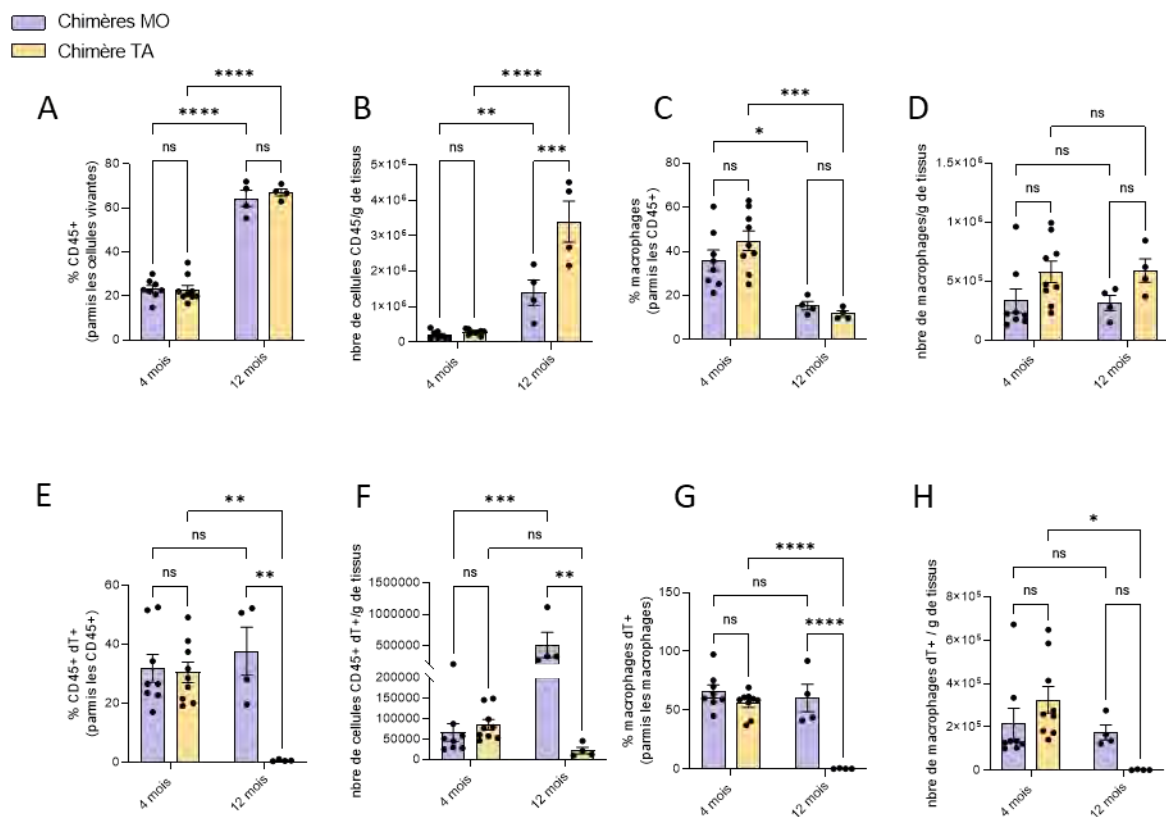


Figure 28 : Quantification de l'évolution des populations de CD45 et de macrophages dans le TA de souris jeunes et âgées et analyse de leur origine.

Après digestion des TA sous-cutanés des souris chimères MO et TA jeunes (4 mois) ou âgées (12 mois), la SVF a été marquée avec des anticorps anti-CD45, anti-CD11b, anti-F4/80 puis analysée en cytométrie de flux. Les pourcentages et nombres de cellules CD45⁺ parmi les cellules vivantes (A et B), de macrophages parmi les cellules CD45⁺ (C et D) ont été quantifiés dans chacune de ces conditions. La proportion et le nombre de cellules chimériques (dT⁺) dans chacune de ces populations a également été quantifiée (E, F, G et H).

Les principaux résultats obtenus montrent que les chimères MO et TA présentent les mêmes pourcentages de cellules CD45⁺ et de macrophages à 4 mois, comme à 12 mois (Figure 28A,

27B, 27C). En revanche, le vieillissement s'accompagne dans les deux types de chimères, d'une modification des populations immunitaires.

En effet, le pourcentage et le nombre de cellules CD45⁺ augmente significativement avec le vieillissement passant de 20 à plus 60% dans le TA sous-cutané (Figure 28A, 28B). En revanche, le pourcentage de macrophage est significativement diminué chez les chimères âgées comparées aux jeunes alors que le nombre reste identique (figure 28C et D), et ce, dans les deux types de chimères.

De façon intéressante, au cours du vieillissement, les cellules dérivées de l'hématopoïèse du TA n'évoluent pas de la même façon que celles dérivées de la MO. En effet, la proportion de cellules dT⁺ dans la population CD45⁺ n'est pas modifiée avec le vieillissement dans les chimères MO (Figure 28E) alors que leur nombre augmente (Figure 28F). Chez les chimères TA la proportion et le nombre de cellules hématopoïétique sont drastiquement diminués. En effet, on ne retrouve quasiment plus aucune cellule immunitaire dérivée de l'hématopoïèse du TA dans le TA sous-cutané des souris âgées (Figure 28G, 28H).

3.2. Conclusion

Ces résultats suggèrent en accord avec la littérature qu'avec l'âge, la composition immunitaire du TA est modifiée (Lumeng et al. 2011). L'augmentation de la proportion de cellules CD45⁺ corrélée à la diminution de cellules CD45 dT⁺ dans les chimères TA, et leur augmentation en nombre dans les chimères MO suggère une augmentation de l'infiltration de cellules CD45⁺ dérivées de l'hématopoïèse médullaire avec le vieillissement. La diminution de la proportion de macrophages parmi les cellules CD45⁺ mais leur stabilité en nombre au sein du TA indique que les cellules infiltrées ne sont pas des macrophages. En outre la diminution du chimérisme uniquement dans la population de macrophages issus des chimères TA indique que les macrophages dans le TA des souris âgées dérivent de l'hématopoïèse médullaire. Il serait intéressant de déterminer quelles sont ces populations infiltrées. Il pourrait s'agir de monocytes infiltrés de la MO, de neutrophiles ou de lymphocytes T et B qui participent à l'inflammation chronique du TA observée avec l'âge (Trim et al. 2018; Ou et al. 2022; Bapat et al. 2015).

L'hématopoïèse du TA semble donc bien altérée avec l'âge et même disparaître, remplacée par l'hématopoïèse médullaire. L'absence de chimérisme dans les chimères TA ne nous a pas permis d'isoler les macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA et d'analyser leur phénotype au cours du vieillissement. Cependant, l'absence de macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA pourrait contribuer à l'altération de la réparation tissulaire observée au cours du vieillissement.

Chapitre II : Etude des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA et comparaison avec les macrophages dérivés de l'hématopoïèse médullaire *in vitro*

1. La production de macrophages résidents du TA grâce à un modèle de culture 3D

Après avoir mis en évidence des différences fonctionnelles *in vivo* des macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA comparés aux macrophages dérivés de l'hématopoïèse médullaire nous avons cherché à caractériser *in vitro* leurs propriétés phénotypiques et fonctionnelles. Nous avons ainsi cherché à déterminer si les différences observées *in vivo* entre ces 2 types de macrophages étaient liées à des caractéristiques intrinsèques ou associées à leurs environnements.

L'étude *in vitro* des macrophages résidents nécessite leur mise en culture, ce qui constitue un réel enjeu. En effet, peu d'études décrivent l'isolement, la mise en culture et le maintien *in vitro* à moyen terme des macrophages résidents sans altération de leur fonction. Ainsi, récemment, l'étude de macrophages alvéolaires a été réalisée sur une culture de macrophages médullaires traités avec un cocktail de cytokines afin de reproduire au maximum le phénotype des macrophages résidents du poumon, car les macrophages alvéolaires ne se maintiennent pas en culture (Luo et al. 2021). Connaissant l'importance de l'origine développementale des macrophages présentée dans l'introduction (chapitre II,2.2), des altérations de phénotypes des macrophages purement résidents n'est pas à exclure dans ce type de différenciation. D'autres systèmes de culture des macrophages résidents ont été développés, notamment par la co-culture de ces macrophages avec les cellules stromales correspondant à leur tissu d'origine (Ogawa et al. 2019; Tsurutani et al. 2021). Bien que très efficaces pour le maintien à long terme et la préservation des fonctions de ces macrophages résidents, ces techniques nécessitent par la suite de séparer les macrophages des cellules stromales avant de pouvoir les analyser, et cette étape est souvent délétère pour les cellules.

Sur la base d'une étude menée au laboratoire, nous avons développé une autre stratégie de culture. La SVF de TA humain est effectivement capable de former spontanément des sphéroïdes après 5 à 7 jours en culture dans des plaques Ultra-low adherence (ULA). L'ajout de stem cell factor dans le milieu de culture induit l'apparition progressive et continue dans le temps d'une population pure de mastocytes à l'extérieur du sphéroïde (Paupert et al. 2018). Nous avons utilisé cette stratégie pour produire des macrophages de TA de souris *in vitro*. Pour cela, nous avons isolé la SVF du TA sous-cutané de souris et l'avons mise en culture dans des plaques ULA dans un milieu supplémenté en M-CSF murin (facteur de croissance permettant la différenciation des macrophages). De la même manière qu'avec le TA humain, nous avons observé la formation spontanée d'un sphéroïde après 4 jours de culture, et l'apparition de cellules adhérentes hors du sphéroïde, au fond des puits de culture à partir du 7ème jour de culture (Figure 29). Les cellules isolées disséminées autour du sphéroïde ont été analysées en cytométrie de flux, ce qui nous a permis de montrer que la population présente au fond du puit est homogène et a toutes les caractéristiques phénotypiques d'un macrophage : CD45+, CD11b+, F4/80+.

Ainsi, ce système de culture en 3 dimensions nous a permis de produire des macrophages résidents du TA pour pouvoir en étudier leurs caractéristiques et leurs fonctions et les comparer à celles des macrophages médullaires.

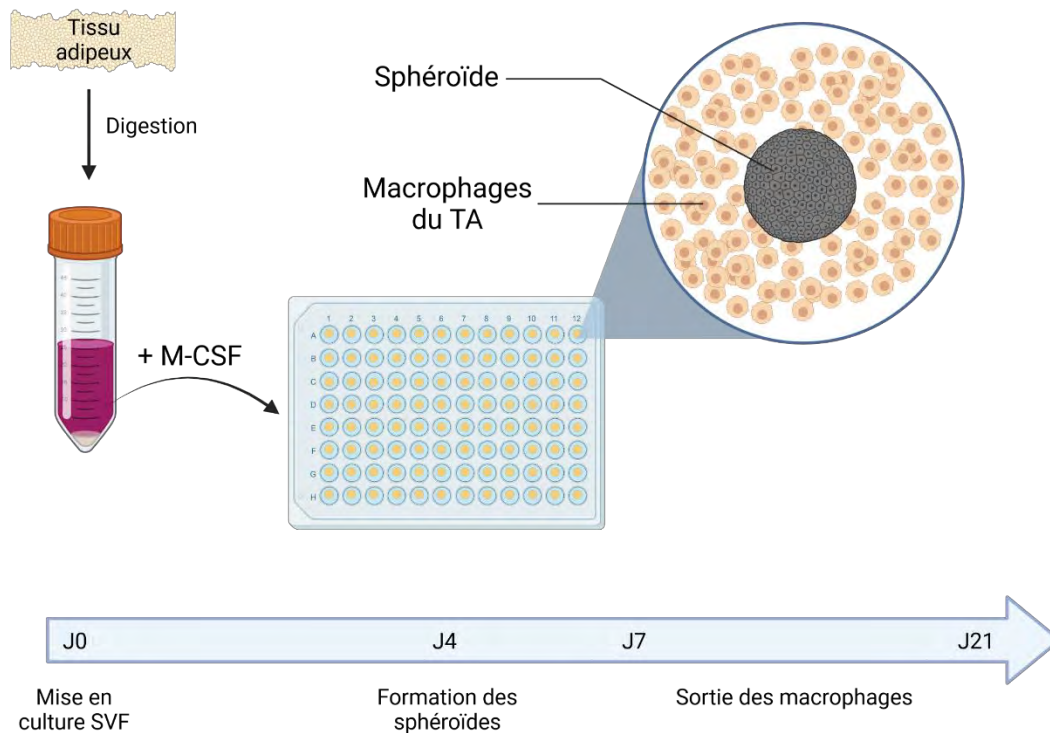


Figure 29 : Modèle de culture in vitro en 3D permettant la production de macrophages du TA
Généré avec BioRender

2. Résultats

Le système de culture en 3D nous a permis de produire en quantité suffisante des macrophages matures (expression du CD45, F4/80 et CD11b) à partir de SVF du TA sans tri préalable. Ainsi, nous avons pu étudier l'expression de marqueurs caractéristiques des macrophages en cytométrie de flux (CD206, Dectin, CMH-II, MerTK, CD16/32 et CD36) et les caractéristiques fonctionnelles par la production de cytokines (CXCL1, IL-6, TNF- α , IL12p40, IL12p70, TGF- β et CCL22), la respiration mitochondriale et glycolitique, la fonction de phagocytose (*E. Coli* et *Candida Albicans*) et la capacité de polarisation pro-inflammatoire (IFN γ) et anti-inflammatoire (IL-4) de ces macrophages en comparaison avec les macrophages dérivés des monocytes médullaires. Les résultats montrent que le phénotype des macrophages du TA est différent de celui des macrophages d'origine médullaire à l'état basal avec une signature CD206, CMHII, CD36 et Arginase-1. De façon surprenante, les macrophages du TA présentent à la fois une activité mitochondriale et une activité glycolitique plus importantes que les macrophages médullaires, ce qui suggère une flexibilité

énergétique beaucoup plus grande. Cependant, leur capacité de polarisation vers un phénotype pro-inflammatoire semble identique à celle des macrophages médullaires alors qu'ils répondent moins bien à la polarisation IL-4 que les macrophages médullaires. Cette différence de polarisation anti-inflammatoire pourrait être due à la surexpression des marqueurs anti-inflammatoires à l'état basal, qui ne permettrait pas l'augmentation de l'expression de ces marqueurs avec l'IL-4. Enfin, les capacités de phagocytose de bactéries (*E. Coli*) et de levures (*Candida Albicans*) semblent identiques entre les deux populations de macrophages. Cependant la capacité à lier *Candida Albicans* est augmentée pour les macrophages du TA ce qui concorde avec leur surexpression à l'état basal de CD206 et Dectine, deux récepteurs des mannanes exposés à la membrane des levures.

3. Conclusion

Cette étude nous a permis de mettre au point un outil efficace permettant la production de macrophages résidents du TA matures et fonctionnels avec des caractéristiques spécifiques de macrophages résidents du TA (Russo & Lumeng 2018). La comparaison de leur phénotype et de leur fonction avec les macrophages dérivés de la différenciation des monocytes médullaires montre que les macrophages du TA ont des caractéristiques particulières. En effet, ils semblent plus anti-inflammatoires que les macrophages médullaires mais ont la même capacité à s'orienter vers un phénotype pro-inflammatoire et à éliminer des pathogènes. Grâce à cette étude, la production de macrophages résidents *in vitro* et l'étude de différents challenges (molécules pharmaceutiques, modifications environnementales...) est rendue possible pour mieux identifier les différences de réponses entre macrophages résidents et ceux dérivés des monocytes médullaires.

Article 3 : Phenotypic and functional characteristics of adipose-tissue resident macrophages obtained in 3-dimensional culture and comparison with bone-marrow derived macrophages

Phenotypic and functional characteristics of adipose-tissue resident macrophages obtained in 3-dimensional culture and comparison with bone-marrow derived macrophages

Adèle Arlat, Marie-Laure Renoud, Jessica Fontaine, Jean Nakhle, Cédric Dray, Agnès Coste and Béatrice Cousin*

RESTORE Research Center, Université de Toulouse, INSERM 1301, CNRS 5070, EFS, ENVT, 31100 Toulouse, France

* Corresponding author

Key words : resident macrophage, adipose tissue, bone marrow, metabolism, phagocytosis

ABSTRACT

INTRODUCTION

Macrophages are distributed all over the body and are critical players in a wide variety of physiological processes, including development, regeneration of tissues and organs, removal of pathogens, inflammatory response). In adult mammals, two types of macrophages have been described in most tissues, tissue-resident macrophages and bone marrow (BM)-derived macrophages. Classically, tissue-resident macrophages are described to originate from yolk-sac progenitors, self-renew by proliferation under homeostatic conditions, and exhibit anti-inflammatory properties. In contrast, BM-derived macrophages differentiate from circulating monocytes, infiltrate tissues and are involved in inflammatory responses (Ginhoux & Guillemin 2016; Lee & Ginhoux 2022). In addition, in the adipose tissue (AT), we identified a specific and quantitatively significant hematopoietic process, relying on the presence of hematopoietic stem/progenitor cells, and contributing to the resident AT-macrophages population (Poglio et al. 2012). Interestingly, these AT-macrophages play crucial and specific roles in the control of AT homeostasis and regeneration in contrast to macrophages derived from the BM. Indeed, inflammatory macrophages derived from endogenous hematopoiesis specifically contribute to chronic inflammation and AT dysfunction in a diabetic context, in contrast to macrophages

derived from the BM (Luche et al. 2017). In addition, in contrast to BM macrophages, AT macrophages are the only ones able to exhibit efficient efferocytosis and rapid clearance of neutrophils in a model of AT resection and thus to drive tissue regeneration (Rabiller et al. 2021). Furthermore, a subset of cardiac inflammatory macrophages emerged from AT hematopoiesis and played a deleterious role in cardiac remodeling following myocardial infarction (Gomez et al. 2022). These beneficial or deleterious roles of AT-macrophages emphasize the importance of macrophage imprinting by the cellular niche they reside in, and have led us to study their intrinsic properties in vitro. In this study, we adapted an efficient method developed to produce mature and functional human AT-mastocytes (Paupert et al. 2018), to generate resident AT-macrophages. We demonstrate here that three-dimensional culture of AT stroma-vascular cells leads to the production of mature and functional AT-macrophages that display specific phenotypic, metabolic and functional characteristics compared to BM-derived macrophages.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Experiments were performed on 6 to 8 weeks old male C57Bl6/J Hsd mice (ENVIGO). Animals were group-housed in a controlled environment (12-h light/dark cycles at 21 °C) with unrestricted access to water and a standard chow diet in a pathogen-free animal facility. Before adipose tissue and femur removal, mice were killed by cervical dislocation. All experiments were carried out in compliance with European Community Guidelines (2010/63/UE).

Isolation of adipose derived stromal vascular cells fraction (SVF) and bone marrow cells

Sub-cutaneous adipose tissues (sc-AT) were collected, and lymph nodes removed. Femurs were collected and immediately flushed with α -MEM medium. Sc-AT sustained a mechanical dissociation and enzymatic digestion at 37°C with collagenase (NB4, Sigma) for 30 min. After filtration and centrifugation, stroma vascular cells were isolated as described previously (Rabiller et al. 2021). A red blood cells lysis (NH₄Cl 155 mM, K₂HPO₄ 5,7 mM et EDTA 0,1mM) was performed on bone marrow (BM) and adipose SVF and cells were then counted with Beckman coulter.

In vitro production of adipose tissue macrophages (ATM)

Adipose SVF cells were seeded on ultra-low adherence (ULA) 96 wells round bottom plates (COSTAR) (10^5 cells/well) with 200 μ L of RPMI supplemented with Glutamax medium (Gibco), Heat Inactivated Newborn Calf Serum (hiNBSC) (10%), a cocktail of Amphotericin, Streptomycin and Penicillin (1%) and M-CSF (10ng/mL) allowing spheroid formation. Cells were centrifuged briefly and incubated at 37 °C with 5% CO₂. After two days of culture there is a natural cell aggregation leading to a spheroid formation. At day 7, we can see cells leaving the spheroid and adhere to the culture plate.

In vitro macrophages culture

BM cells were seeded on non-adherent Petri dishes at a concentration of $2 \cdot 10^6$ cells in 10 mL of RPMI supplemented with Glutamax medium (Sigma), hiNBSC (10%), a cocktail of Amphotericin, Streptomycin and Penicillin (1%) and M-CSF (10ng/mL). Cells were then incubated at 37 °C with 5% CO₂.

After 13 days of culture, differentiated BM- and AT-macrophages were counted and seeded on adherent culture plates with RPMI supplemented with Glutamax medium (Sigma), hiNBSC (10%) and a cocktail of Amphotericin, Streptomycin and Penicillin (1%) overnight. Macrophages were then treated or not with IL4 (10ng/mL) or IFN γ (50ng/mL) for 4 hours (gene expression) or 24h (protein expression), or used for flow cytometry analyses or functional assays (phagocytosis and ROS production).

Spheroid dissociation

After 7, 13 or 21 days of culture spheroids were collected and dissociated with NB4 (1,7 U/mL) and dispase I (2,5U/mL) at 37°C for 40 minutes. Spheroid were then mechanically dissociated with a pipette and centrifuged to complete dissociation.

RNA Extraction and Real Time qPCR

RNA were extracted from AT and BM macrophages were lysed and purified using a Promega extraction kit (Relia PreP™ RNA Cell Miniprep). 250 ng of total RNA were reverse-transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). cDNA were diluted and mixed with FAST SYBR GREEN (Roche Dignostics), and primers (Supplementary Table) on a LightCycler 480 (Roche Applied Science). All relative

gene expression was determined using a standard curve realised with cDNA dilutions (1/5, 1/10, 1/20 and 1/40) and the ratio with GAPDH reporter gene.

Flow cytometry analysis

AT and BM macrophages or dissociated spheroid cells were incubated with live/dead reagent (Thermosienific) and FcR-blocking reagent for 15 min at 4°C (except for CD16/32 staining). Cells were then stained with conjugated rat anti-mouse antibodies and the specificity of each staining was checked using specific isotype controls (Supplementary Table). The intracellular staining was realized: cells were fixed with 2% PFA solution for 15 minutes and permeabilized with 0,5% Saponin. Then, cells were incubated with intracellular antibody's diluted in 0.5% Saponin for 40 minutes. Flow cytometry data were collected on an LSR Fortessa flow cytometer (BD Bioscience) using DIVA (Becton Dickinson) software. Data were analysed using Kaluza version 2.1 software. Unsupervised and nonlinear dimensionality reduction analysis of flow cytometry data (T-SNE) data was realized using FlowJo 10.8.1 software after a Arcsin normalization of fsc files. Data were homogeneized by downsampling of each sample (15 865 events/sample) and gated on alive, CD45⁺, F4/80⁺, CD11b⁺ cells before to apply the nonlinear dimensionality reduction to segregate populations into the expression of specific macrophage markers.

Cytokine and NO production analysis

After 24h of treatment (cf. in vitro macrophages culture) supernatants of AT or BM macrophage cultures were collected and Cytokines, Chemokines or NO production were measured. Cytokine and chemokines production were analyzed with Mouse Macrophage/Microglia LEGENDPlex™ fluorescence bead-based immunoassay (BioLegend) to probe and quantify the levels of 13 solubles factors (CXCL1, TGF-β1, IL-18, IL-23, CCL22, IL-10, IL-12p70, IL-6, TNF-α, G-CSF, CCL17, IL-12p40, IL-1β) following supplier's protocol. Raw data were given as the MFI of phycoerythrin (PE) signal. The concentration (pg/mL) of each soluble factor present in culture supernatants was determined by comparing the PE MFI for each target against 13 individual protein standards. Data were analysed using LEGENDplex™ v.8.1 data analysis software (BioLegend). NO production was quantified using Griess reagent (homemade ref). A NaNO₂ concentration range were realized (64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 and 0 μM) to measure sample NO concentration and deposited (50μL of each concentration) with

samples (50 μ L) on a white plate. Then Griess reagent were added (50 μ L). Absorbances were measured 30 minutes later in ENVISION (PerkinElmer) at 630 nm.

Metabolic flux analysis

AT and BM macrophages at 13 days of differentiation were seeded at 20,000 cells/well in a poly-D-lysine-coated Seahorse XFe96 cell culture microplate in complete RPMI/Glutamax medium supplemented with Heat Inactivated Newborn Calf Serum (hiNBSC) (10%) and a cocktail of Amphotericin, Streptomycin and Penicillin (1%) and incubated overnight at 37 °C in 5% CO₂. A minimum of 5 replicate wells were plated for each condition. Sensor cartridges were hydrated overnight in Seahorse XF calibrant at 37 °C without CO₂ supplementation. On the day of the assay, macrophages were thoroughly washed with PBS and the culture medium was replaced with XF DMEM supplemented with glutamine (2 mM), pyruvate (1 mM) and glucose (10 mM) for the Mito Stress Test or without glucose for the Glycolysis Stress Test. The plate was then incubated for 1 hour at 37 °C without CO₂ supplementation while the Seahorse XFe96 Analyzer was calibrated. Mito stress test consisted of the sequential injection of oligomycin (1 μ M), FCCP (1 μ M) and rotenone (1 μ M) + antimycin A (1 μ M). Glycolysis stress test was performed using glucose (10 mM), oligomycin (1 μ M) and 2-deoxyglucose (100 mM). OCR and ECAR were measured 3 times with 6 min intervals at the basal level then after each injection. All measures were normalized to the number of DAPI-stained nuclei per well at the end of the experiment, using the Operetta High Content Imaging System (Perkin Elmer). Cell density, plate coating and FCCP concentration were determined by a dedicated pilot experiment. Data were analyzed with the Agilent Wave desktop software.

***in vitro* study of phagocytosis**

To evaluate phagocytosis of E. Coli, AT or BM-macrophages were incubated with pHrodo E. coli Bioparticles (100 μ g/mL) (Invitrogen, Thermo Scientific) in S3 IncuCyte (sartorius). Pictures of bright field and red fluorescence were acquired each 15 minutes during 48 hours. Data were analysed with S3 IncuCyte software measuring red object intensity on cells area. Area under the curve were then calculated.

Candida Albicans strain was seeded on Sabouraud Petri dish 24 hours before experiment. AT- or BM-macrophages were washed with DMEM medium to remove serum and incubated with

Candida Albicans for 30 minutes at 37°C (ratio 3 yeasts per macrophages). Unbound yeasts were removed by successive washes. Macrophages were then incubated for 4 hours at 37°C with 5% CO₂ to evaluate killing of C. Albicans or stored at 4°C to evaluate binding of C. Albicans. Cells were then lysed by adding sterile H₂O 5 minutes at room temperature and PBS was added to stop the reaction. Cell lysates were seeded on Sabouraud medium and incubated for 24h at 37°C to determine yeast colony forming unit (CFU).

***In vitro* ROS production**

AT- or BM-macrophages ROS production was evaluated adding 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione (Luminol; Sigma) on culture dish. Basal chemiluminescence reflecting ROS production was measured continuously during 30 minutes at 37°C with luminometer ENVISION (PerkinElmer).

Statistics

Statistics analyses were performed using Prism v9.0 software (GraphPad) by paired t-test. A p value < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Generation of AT- macrophages from 3D culture system. To overcome the multiple obstacles in culturing ATM, we adapted a previously published protocol of 3D culture, used to generate mast cells from human AT (Papupert, 2018). Stromavascular fraction (SVF) of subcutaneous AT was plated on ultra-low adherent plates in medium supplemented in macrophage colony-stimulating factor (M-CSF). This led to the formation of spheroids after 4 days in culture, and the spheroids were maintained for at least 10 days (fig. 1A). The size of the spheroids (fig. 1B), and their cell content (fig. 1C) decreased from 4 to 13 days in culture. Spheroids composition was analyzed by flow cytometry after enzymatic dissociation. As uncultured SVF, spheroids contained 20 to 40% of CD45⁺ cells (fig. 1D), and this proportion remained stable over time. Interestingly, and in contrast to uncultured SVF, macrophages identified as CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁺ accounted for the major immune population within the spheroid (fig. 1E). Starting at day 10, dispersed cells surrounding the spheroid were observed (fig. 1F), and up to 5x10³ cell/spheroid were obtained at day 13 (fig. 1G). These cells formed an

homogeneous immune population mostly expressing the macrophage cell surface markers CD45, CD11b and F4/80 (fig. 1H, 1I). Macrophage purity reached 71.98 ± 2.42 % after 13 days in culture (fig. 1I). The 3-dimensional culture system also generated CD11b⁺/F4/80⁻ myeloid cells, accounting for 15.21 ± 2 % of the population surrounding the spheroid (fig. 1I). Flow cytometry analyses also showed that the large majority of macrophages expressed Ki67 (fig. 1J), indicating that they were proliferating in these conditions. Hence, this approach allows us to obtain alive tissue macrophages in culture without the need for purification by cell sorting.

Cultured AT-macrophage population exhibit specific features compared to macrophages derived from medullar monocytes. Macrophages generated from AT spheroids or from BM monocyte differentiation were harvested and then seeded on adherent culture dishes, for 24h before flow cytometry analysis. We used t-Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE) analysis to qualitatively assess the difference between AT- and BM- macrophages. In contrast to conventional sequential biaxial plot-based analysis, t-SNE analysis generated a single map in which the complex multi-dimensional geometric relationships between single cells were represented within a two-dimensional space. Singlet and viability gating was performed manually prior to data export for analysis (fig. 2A). Individual flow cytometry standard files of AT- and BM- macrophages were concatenated to ensure spatial alignment of the same population between samples. 15865 cells were randomly used per sample to create a final file containing 158650 total cells. The data set was analyzed with the t-SNE algorithm, that grouped cells in distinct clusters (Fig. 2B) in which the expression of each parameter was visualized with a color code from blue (low expression) to red (high expression) (Fig. 2C). Each population was then characterized based on the expression of each antigen as shown on their corresponding histograms (Fig. 2C) AT- and BM- macrophages clustered separately, mainly based on the expression of MHC Class II, MerTK, CD206, Dectin, CD36 and CD209 (DC-Sign) (fig. 2B, 2C).

The comparison between both population was then quantified using conventional flow cytometry analysis. The MFI (fig. 2D) and the percentage of positive populations (fig. 2E) were shown for classical core macrophage cell surface markers. Consistent with t-SNE visualization, we found an significantly higher MFI for MHC class II, MerTK, CD206, Dectin, CD16/32 and CD36 in AT-Macrophages compared with BM macrophages. In contrast, no

difference in the intensity level of CD209 was observed between both populations (fig. 2D). In addition, the percentages of CD206, CD36, CD209 (DC-Sign) and CD16/32 positive cells accounted for 76 to 97% of AT-macrophages. In contrast, Dectin, MHC class II and MerTK are expressed on 6 to 22% of the population (fig. 2E). It has to be noted that no/almost no BM-macrophages expressed these 4 markers.

In order to evaluate the functional capacity of AT and BM-macrophages, the production of cytokines was quantified in the cell culture supernatant in unstimulated conditions. We used LEGENDPlex bead-based assays to quantify the amount of secreted CXCL1, IL-6, TNF- α , IL12p40, IL12p70, TGF- β and CCL22 via flow cytometry. As expected, in the absence of stimulus, low levels of cytokine release were detected in BM-macrophages. We show that AT-macrophages were able to release cytokines to the same extent than BM-macrophages except for CXCL1, IL6 and CCL22 that were present in significantly higher amounts in the supernatants of AT-macrophage cultures as compared to BM-macrophages. Altogether, these results show that AT- and BM-macrophages display different phenotypic and functional characteristics. However, these did not allow to conclude about a pro- or anti-inflammatory phenotype. We next evaluated the expression of iNOS and Arginase-1 by RT-qPCR, as representative M1 and M2 polarisation marker respectively in unstimulated (Fig. 2G). Unstimulated AT-macrophages clearly expressed Arginase-1 in contrast to BM-macrophages that expressed iNOS. This signature was associated with a lower NO and ROS production by AT- macrophages, indicating that in unstimulated conditions, AT-macrophages exhibit a less pro-inflammatory phenotype than BM- macrophages and suggest that these two populations display different metabolic activities.

Cultured AT-macrophages display high metabolic rate. Specific metabolic pathways are increasingly being recognized as critical hallmarks of macrophage subsets. We sought to determine the energetic metabolism of AT and BM macrophages using the Seahorse technology, that allows for the real-time measurement of extracellular acidification rate (ECAR, indicative of glycolytic function) and oxygen consumption rate (OCR, indicative of oxidative phosphorylation), as readouts of cellular bioenergetic profiles in response to metabolic stressors. Glycolysis stress tests were performed to assess the macrophages glycolytic function. AT macrophages exhibited a higher ECAR than BM macrophages (Figure 3A), which translated into significantly higher key parameters of glycolytic function such as

glycolysis (3.7 fold), glycolytic capacity (5.9 fold) and glycolytic reserve (300 fold) (Figure 3B). To check if BM macrophages had a compensatory mitochondrial metabolism, we performed mitochondrial stress tests. Strikingly, AT macrophages also had a higher OCR than their BM counterparts (Figure 3C) with, in particular, a significantly higher basal respiration (2.2 fold), maximal respiration (3.6 fold) and respiration-coupled ATP production (2.4 fold) (Figure 3D). These results indicate that AT macrophages exhibit a highly energetic metabolic state (high glycolytic capacity and respiration concomitantly) at the contrary of BM macrophages that adopt a relatively low bioenergetic profile, evocative of a quiescent state (Figure 3E). In hand with these observations, the highly active metabolic state of AT macrophages translated into a high ATP production rate, that was twice greater than that of BM macrophages (Figure 3F).

M1/M2 polarisation induction of cultured AT- macrophages. We further compared a polarisation capacity of cultured AT- versus BM-macrophages to classical M1 or alternative M2 phenotype in response to 24 hours of stimulation with IFN-g and IL-4 respectively. To this end, pro- or anti-inflammatory cell surface markers induction and the production of pro- and anti- inflammatory cytokines in the cell culture supernatants were assessed by flow cytometry. As expected IFN-g treatment induced an increased expression of MHC ClassII in both AT- and BM-macrophages, in contrast to the expression level of CD209 that was unchanged by the treatment. In addition, IFNg treatment did not dramatically change the pourcentages of macrophages expressing MHC Class II and CD209. This phenotypic signature was associated with an increased secretion of TNF-a, IL-6, and IL-12p40 in a similar extent in both types of macrophages. Strikingly, CXCL1 levels were decreased only in BM-macrophages cultures under IFNg treatment, and the secretion of IL-12p70 remained unchanged.

IL-4 treatment was used to polarize macrophages towards an anti-inflammatory phenotype. As expected, CD206, Dectin and CD16/32 expression was enhanced by the treatment in both AT- and BM-macrophages. MerTK expression level remained unchanged while CD36 was induced only in BM-macrophages. IL-4 did not induce any change in the percentage of positive cells for each cell surface marker, except for Dectin in BM-macrophages. IL-4 treatment drastically increased CCL22 in both AT- nad BM- macrophages, with a higher induction in BM- than in AT cultures. TGFb secretion was slightly but not significantly induced by IL-A in AT- and BM- macrophages, and TNFa production decreased only in AT-

macrophages. Strikingly, CXCL1 secretion was decreased only in BM-macrophages cultures under IL-4 treatment.

Altogether these results showed that both AT-and BM macrophages are activated either by IFN γ towards a proinflammatory phenotype or by IL-4 towards an anti-inflammatory phenotype. However, although IFN γ induced similar changes in AT- and BM- macrophages, IL-4 polarisation was less pronounced in AT-macrophages than in BM ones.

AT-macrophages exhibit similar phagocytic activity than BM-Macrophages. The phagocytic capacity of AT macrophages was then assessed in vitro by incubating these cells with bacteria *E. Coli* or yeast *Candida Albicans*. Indeed, phagocytosis of *E. Coli* is classically used to measure macrophage function. In addition, the overexpression of CD206 and Dectin (both being receptors for mannans) in AT-macrophages suggests that these macrophages could be efficient in yeast phagocytosis. As shown in Fig. 5A and 5B, AT-macrophages produced in vitro were able to phagocytose *E. Coli* with the same efficiency than BM-macrophages. In addition, when incubated with *Candida Albicans*, AT-macrophages were able to bound and kill the yeasts. Interestingly, the binding capacity was significantly higher in AT than in BM-macrophages, although their killing efficiency was similar.

DISCUSSION

AT- macrophages play a crucial role in the control of AT homeostasis and development of metabolic diseases (Olefsky & Glass 2010; de Luca & Olefsky 2008; Heilbronn & Campbell 2008; Suganami & Ogawa 2010; Bourlier & Bouloumie 2009; Luche et al. 2017). However, their in vitro study is hindered due to the lack of a good culture system able to generate sufficient amounts of cells recapitulating in vivo features. In addition, most of the studies have been performed in obese mice, on sorted population. In this study, we developed a 3-dimensional in vitro system allowing the obtention of AT resident functional macrophages, without the need for cell sorting, and their culture for a couple week. Our system also paves the way for follow-up functional studies of these highly specialized cells.

Indeed, few studies describe the isolation, and the in vitro culture of resident macrophages without altering their function. Alveolar macrophage-like cells were obtained from BM

monocyte differentiation by adding cytokines in culture medium (Luo et al. 2021). Other systems for culturing resident macrophages have been developed, including co-culture of these macrophages with stromal cells (Ogawa et al. 2019; Tsurutani et al. 2021). Although very effective for long-term maintenance and preservation of function of these resident macrophages, these techniques subsequently require separation of the macrophages from the stromal cells before they can be analyzed, and this step is often deleterious to the cells.

Our system generates cells expressing specific cell surface markers of mature macrophages such as CD11b and F4/80. In addition the expression of CD206 suggests that these AT-macrophages exhibit phenotypic features of M2-like resident macrophages considered as a niche for adipocyte progenitors in AT (Nawaz & Tobe 2019). In our system, AT-macrophages were able to proliferate, as it is described in lean mice that show basal self-renewal of resident AT-macrophages (Li et al. 2020).

It is proposed that *in vivo*, AT-macrophages are of anti-inflammatory phenotype, associated with a high oxidative rate capacity and mitochondrial function (Huang et al. 2014). In contrast to these studies, AT-macrophages generated in our system display both high OCR (measure of oxidative phosphorylation) and ECAR (measure of aerobic glycolysis), showing a high metabolic activity after stimulation. This signature is often associated with activated macrophages in the peritoneum (Pavlou et al. 2017), and in obese AT (Serbulea et al. 2018; Sharma et al. 2020), although a recent study suggests that glycolysis is essential to the M2 macrophage polarization (Yu et al. 2020). Finally, AT-macrophages generated in our *in vitro* system exhibit functional hallmarks of mature macrophages, as they are able to respond to pro- and anti-inflammatory stimulation, by adapting their cell surface and secretory phenotype. In addition, they exhibit efficient phagocytosis of different pathogens.

This study is also dedicated to the comparison between AT-macrophages considered as resident, and macrophages obtained from classical monocyte differentiation. Little is known about this *in vitro* comparison, especially in AT. We show here a separate clustering between AT- and BM- macrophages, mainly based on different expression levels of macrophage markers. In addition, they differ in Arginase and iNOS expression, ROS production and basal respiration. Overall, the phenotypic and metabolic features of AT and BM- macrophages suggests a different polarization in the basal state, AT-macrophages showing a more anti-inflammatory phenotype than BM-ones, consistent with *in vivo* data on resident versus

monocyte-derived macrophages (Park et al. 2022; Lee & Ginhoux 2022). Although these 2 populations show phenotypic differences, we were not able to identify a cell surface marker specific for AT- or BM-macrophages. IL-4 treatment induces a higher response in BM-macrophages than in AT-macrophages and this could be related to the higher expression of M2 phenotypic markers in the basal state in these AT- macrophages than in BM-macrophages. In contrast, the effect of IFN γ is similar in both populations, consistent with the same phagocytic capacity. This has already been described for Kupffer cells, that are capable of responding to an infectious challenge in a similar way than bone marrow derived macrophages in vivo despite distinct transcriptomic signature (Beattie et al. 2016)

In conclusion, the results of our study provide an effective culture method for resident AT-macrophage that preserve their phenotypic and functional features. It provides an efficient tool for future studies to explore differentiation and function of AT-macrophages in vitro, in different physiological or pathological contexts.

BIBLIOGRAPHY

- Beattie L, Sawtell A, Mann J, Frame TCM, Teal B, de Labastida Rivera F, Brown N, Walwyn-Brown K, Moore JWJ, MacDonald S, Lim E-K, Dalton JE, Engwerda CR, MacDonald KP & Kaye PM (2016) Bone marrow-derived and resident liver macrophages display unique transcriptomic signatures but similar biological functions. *Journal of Hepatology* 65, 758–768.
- Bourlier V & Bouloumie A (2009) Role of macrophage tissue infiltration in obesity and insulin resistance. *Diabetes Metab* 35, 251–260.
- Ginhoux F & Guilliams M (2016) Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* 44, 439–449.
- Gomez I, Robert V, Alayrac P, Arlat A, Duval V, Renoud M-L, Vilar J, Lemitre M, Silvestre J-S & Cousin B (2022) Identification of Adipose Tissue as a Reservoir of Macrophages after Acute Myocardial Infarction. *Int J Mol Sci* 23, 10498.
- Heilbronn LK & Campbell LV (2008) Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Curr Pharm Des* 14, 1225–1230.
- Huang SC-C, Everts B, Ivanova Y, O’Sullivan D, Nascimento M, Smith AM, Beatty W, Love-Gregory L, Lam WY, O’Neill CM, Yan C, Du H, Abumrad NA, Urban JF, Artyomov MN, Pearce EL & Pearce EJ (2014) Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. *Nat Immunol* 15, 846–855.

- Lee CZW & Ginhoux F (2022) Biology of resident tissue macrophages. *Development* 149, dev200270.
- Li Y, Yun K & Mu R (2020) A review on the biology and properties of adipose tissue macrophages involved in adipose tissue physiological and pathophysiological processes. *Lipids in Health and Disease* 19, 164.
- de Luca C & Olefsky JM (2008) Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett* 582, 97–105.
- Luche E, Robert V, Cuminetti V, Pomié C, Sastourné-Arrey Q, Waget A, Arnaud E, Varin A, Labit E, Laharrague P, Burcelin R, Casteilla L & Cousin B (2017) Corrupted adipose tissue endogenous myelopoiesis initiates diet-induced metabolic disease. *eLife Sciences* 6, e23194.
- Luo M, Lai W, He Z & Wu L (2021) Development of an Optimized Culture System for Generating Mouse Alveolar Macrophage-like Cells. *The Journal of Immunology* 207, 1683–1693.
- Nawaz A & Tobe K (2019) M2-like macrophages serve as a niche for adipocyte progenitors in adipose tissue. *Journal of Diabetes Investigation* 10, 1394–1400.
- Ogawa K, Tsurutani M, Hashimoto A & Soeda M (2019) Simple propagation method for resident macrophages by co-culture and subculture, and their isolation from various organs. *BMC Immunol* 20, 34.
- Olefsky JM & Glass CK (2010) Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* 72, 219–246.
- Park MD, Silvin A, Ginhoux F & Merad M (2022) Macrophages in health and disease. *Cell* 185, 4259–4279.
- Paupert J, Espinosa E, Cenac N, Robert V, Laharrague P, Evrard SM, Casteilla L, Lorsignol A & Cousin B (2018) Rapid and Efficient Production of Human Functional Mast Cells through a Three-Dimensional Culture of Adipose Tissue-Derived Stromal Vascular Cells. *J. Immunol.* 201, 3815–3821.
- Pavlou S, Wang L, Xu H & Chen M (2017) Higher phagocytic activity of thioglycollate-elicited peritoneal macrophages is related to metabolic status of the cells. *Journal of Inflammation* 14, 4.
- Poglio S, Toni FD, Lewandowski D, Minot A, Arnaud E, Barroca V, Laharrague P, Casteilla L & Cousin B (2012) In situ production of innate immune cells in murine white adipose tissue. *Blood* 120, 4952–4962.
- Rabiller L, Robert V, Arlat A, Labit E, Ousset M, Salon M, Coste A, Da Costa-Fernandes L, Monsarrat P, Ségui B, André M, Guissard C, Renoud M-L, Silva M, Mithieux G, Raymond-Letron I, Pénicaud L, Lorsignol A, Casteilla L, Dromard Berthézène C & Cousin B (2021) Driving regeneration, instead of healing, in adult mammals: the decisive role of resident macrophages through efferocytosis. *NPJ Regen Med* 6, 41.

- Serbulea V, Upchurch CM, Schappe MS, Voigt P, DeWeese DE, Desai BN, Meher AK & Leitinger N (2018) Macrophage phenotype and bioenergetics are controlled by oxidized phospholipids identified in lean and obese adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, E6254–E6263.
- Sharma M, Boytard L, Hadi T, Koelwyn G, Simon R, Ouimet M, Seifert L, Spiro W, Yan B, Hutchison S, Fisher EA, Ramasamy R, Ramkhelawon B & Moore KJ (2020) Enhanced glycolysis and HIF-1 α activation in adipose tissue macrophages sustains local and systemic interleukin-1 β production in obesity. *Sci Rep* 10, 5555.
- Suganami T & Ogawa Y (2010) Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol* 88, 33–39.
- Tsurutani M, Horie H & Ogawa K (2021) Cell Properties of Lung Tissue-Resident Macrophages Propagated by Co-Culture with Lung Fibroblastic Cells from C57BL/6 and BALB/c Mice. *Biomedicines* 9, 1241.
- Yu Q, Wang Y, Dong L, He Y, Liu R, Yang Q, Cao Y, Wang Y, Jia A, Bi Y & Liu G (2020) Regulations of Glycolytic Activities on Macrophages Functions in Tumor and Infectious Inflammation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00287> [Accessed January 12, 2023].
- Zheng C, Yang Q, Cao J, Xie N, Liu K, Shou P, Qian F, Wang Y & Shi Y (2016) Local proliferation initiates macrophage accumulation in adipose tissue during obesity. *Cell Death Dis* 7, e2167.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1 : Generation of AT- macrophages from 3D culture system

Seeding of the SVF cells obtained from murine subcutaneous AT into low adherent plates leads to the formation of spheroids. **A.** Representative picture of these spheroids at 4, 7 and 13 days of culture. Acquisition was performed using an inverted Nikon Objective x40 (scale bar 200 μ m). **B.** Kinetic of the spheroid size. **C.** Spheroid cell number at day 7 and 13 of culture. **D, E** After dissociation, at day 7, 13 and 21, spheroid composition was analyzed by flow cytometry. **(D)** Percentage of hematopoietic (CD45+) and non hematopoietic (CD45-) cells within the spheroid, and **(E)** percentage of macrophages identified as CD45+/CD11b+/F4/80+ in the CD45+ population of the spheroid quantified by flow cytometry at day 7 and 13 and compared to uncultured SVF. **F, G, H, I.** Starting at day 10 of culture, dispersed cells migrate outside of the spheroids. **(F)** Representative picture of cells that have migrated out of the spheroid after 13 days in culture (scale bar 200 μ m). **(G)** Number of dispersed cells per spheroid obtained after 7 and 13 days in culture. **(H)** Representative dot plot of flow cytometry showing the expression of macrophage specific markers on the surface of cells

that have migrated out of the spheroid and selected among singlet alive cells **(I)**. Percentages of macrophages (CD45+/F4/80+/CD11b+) and monocytes (CD45+/CD11b+/F480-/Ly6C+) among CD45+ dispersed cells surrounding spheroids and quantified by flow cytometry at day 13 **(J)**. Representative histogram of flow cytometry showing the expression of Ki67 on macrophages surrounding spheroids. Results are expressed as mean + ou- SEM

Figure 2 : AT macrophages are mature and phenotypically different from BM macrophages

Macrophages generated from AT spheroids or from BM monocyte differentiation were harvested and then seeded on adherent culture dishes, for 24h. Cells and supernatant were then collected and analysed by flow cytometry **A, B and C**. Unbiased analysis of 5 independant samples of AT and BM-macrophages was realised using tSNE map with the signal strenght of key phenotypic macrophages markers, express with a blue-green-yellow-red continuous color scale. **A**. Gating strategies for BM macrophages (left) and AT macrophages (right). **B**. Cell clustering of both macrophage populations showing that BM and AT macrophages are distinct populations. **C**. Intensity of expression of each markers (F4/80, CD11b, CD209, CD45, CMHII, MerTK, CD16/32, CD36, Dectin-1, CD206). The expression of each parameter was visualized with a color code from blue (low expression) to red (high expression) on the t-SNE map, and each population was then characterized based on the expression of each antigen as shown on their corresponding histograms **D**. MFI of macrophages markers analyzed by flow cytometry in AT macrophages compared to BM macrophages (n=3 to 10). Results are expressed as percentage of values obtained in BM macrophages and compared using paired t-test. **E**. Percentage of AT and BM macrophage (CD45+, CD11b+, F480+) expressing extracellular markers : CD36, CD206, Dectin-1, MerTK, CD209, CD16/32, CMHII, TLR4 and TLR2 (n=3 to 10). Results are expressed as percentage of macrophage population and compared using paired t-test. **F**. Cytokine production was quantified by LEGENDplex in supernatant of AT and BM macrophages cultures in unstimulated condition. **G-I**. Arginase-1 and iNOS mRNA expression evaluated by RT-qPCR for (n=3) **(G)**. Nitric Oxyde (NO) production was quantified in the culture medium using Gries Reactif (n=5) **(H)**. ROS production was followed during 90min using Luminol and Luminescence was measured (n=10) **(I)**. Results are expressed in pg/μl and compared using paired t-test. * p<0,05, ** p<0,01 ; *** p<0,001 ; **** p< 0,0001

Figure 3 : AT macrophages are more metabolically active than BMDM

A,B, C and D. Mitochondrial respiration and glycolytic capacity of AT and BM macrophages were quantified using Seahorse Agilent Technologie 96eXF. Results were normalized to the cell number using DAPI staining after the assay. **A and B**. Extracellular Acidification Rate (ECAR) upon glycolytic stress (injection of Glucose, Oligomycin and 2-Deoxyglucose) was

measured. (A) Representation of real-time measurement of ECAR. (B) Glycolysis, glycolytic capacity and glycolytic reserve were calculated (n=5). **C and D.** Oxygen Consumption Rate (OCR) upon mitochondrial stress (injection of Oligomycin, FCCP, Rotenone and Antimycin A) was measured. (C) Representation of real-time measurement of OCR. (D) Basal respiration, maximal respiration and respiration-coupled ATP production were calculated (n=5). **E.** Energy map of maximal respiration versus glycolytic capacity after FCCP injection (n=5). **F.** Glyco- and mito-ATP production rates were calculated using the aforementioned ECAR and OCR data (n=5). Results were compared using Paired t-test. * p<0,05, ** p<0,01 ; *** p<0,001 ; **** p< 0,0001

Figure 4 : AT and BM macrophages are differentially polarized by IL-4 and IFN- γ

Macrophages produced by adipose tissue spheroids and BMDM were seeded on adherent culture dish for 24h, then, they were IL-4 stimulated or IFN- γ stimulated for 24h. After différenciation with IL-4 or IFN γ MFI (A and E) and % (B and G) expression of macrophages markers were analysed by flow cytometry (n=3 to 6) and supernatent were collected to analyse cytokine production by LEGENDPlex (D and H) (n= 5 to 6) in AT macrophages compared to BM macrophages. Representative MFI histogramm of unstimulated condition and stimulated condition were represent for MHC class-II and CD206 under IFN- γ (C) and IL-4 (F) stimulation respectively. A, B, C and D. IFN- γ stimulation. E, F, G and H. IL-4 stimulation. We used Paired t-test for data analysis to compare BM and AT macrophages. \$ p<0,05 ; \$\$ p<0,01. We used One Sample t-test analysis to compare stimulated condition to unstimulated * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001

Figure 5 : AT-macrophages are able to phagocyte with the same efficiency than BM-macrophages

Phagocytic capcity of macrophages was assessed using C. Albicans yeast or E.Coli. **A and B.** pHRodo E.Coli were added to macrophages and phagocytosis (apparition of red particles) was analysed on InCucyte during 48 hours **A** Representatives pictures (IncuCyte) of E. Coli phagocytose of BM- (up) and AT- (down) macrophages before (left) and after culture (right). **B.** Quantification of phagocytosis. Results are express in AUC of red particles reported to cells aera. (n=3) **C and D.** C. Albicans yeast were added on macrophages for 30 minutes then one culture plate was conserved at 4°C to evaluete binding capacity (C) and the other at 37°C to evaluate killing capacity (D). Macrophages were lysed and supernatent were spred on Sabouraud Petri. 24h later colonies were counted. Results are express in % of binding or killing colonies. (n=6) Results were compared using Paired t-test * p<0,05, ** p<0,01 ; *** p<0,001 ; **** p< 0,0001.

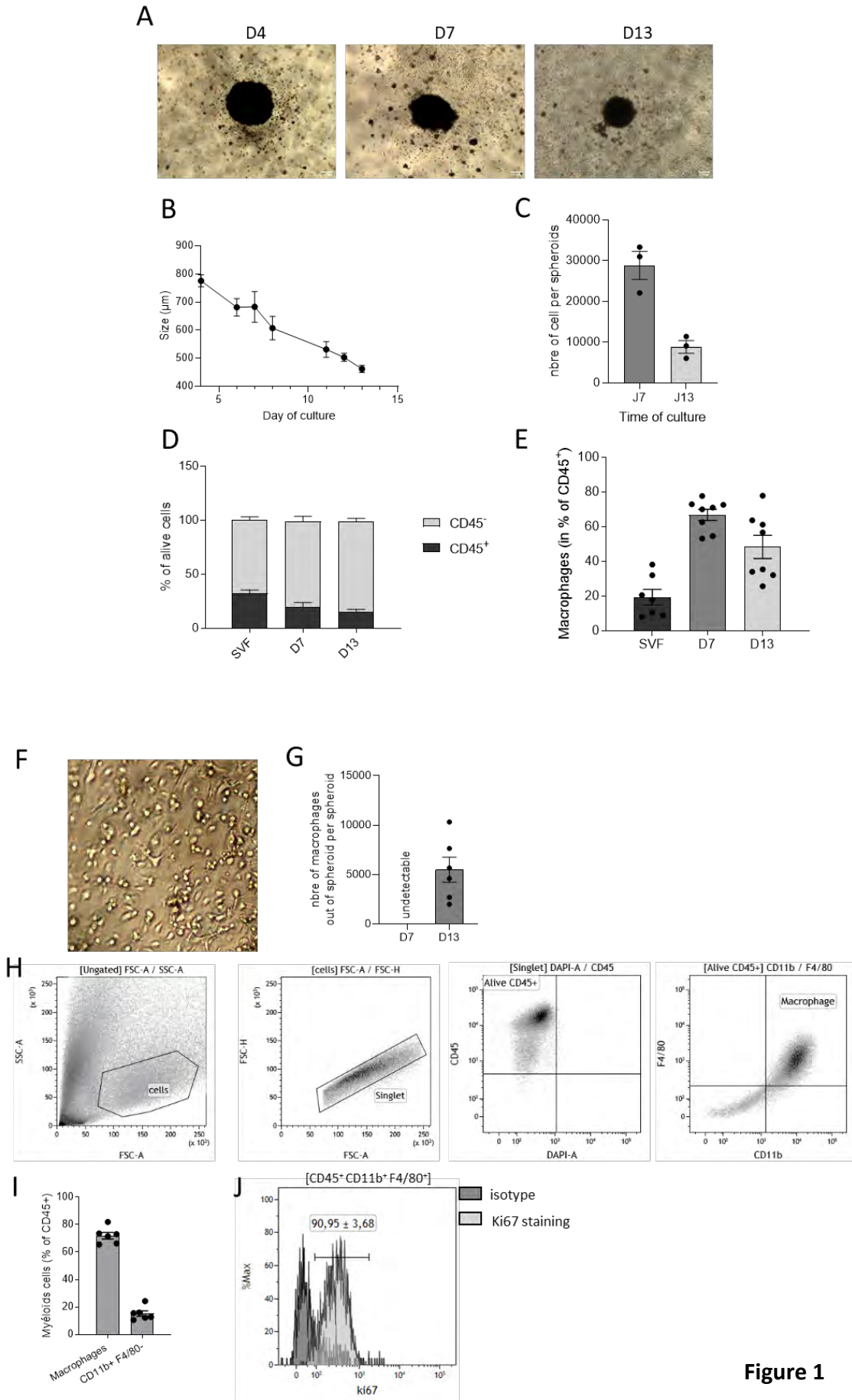


Figure 1

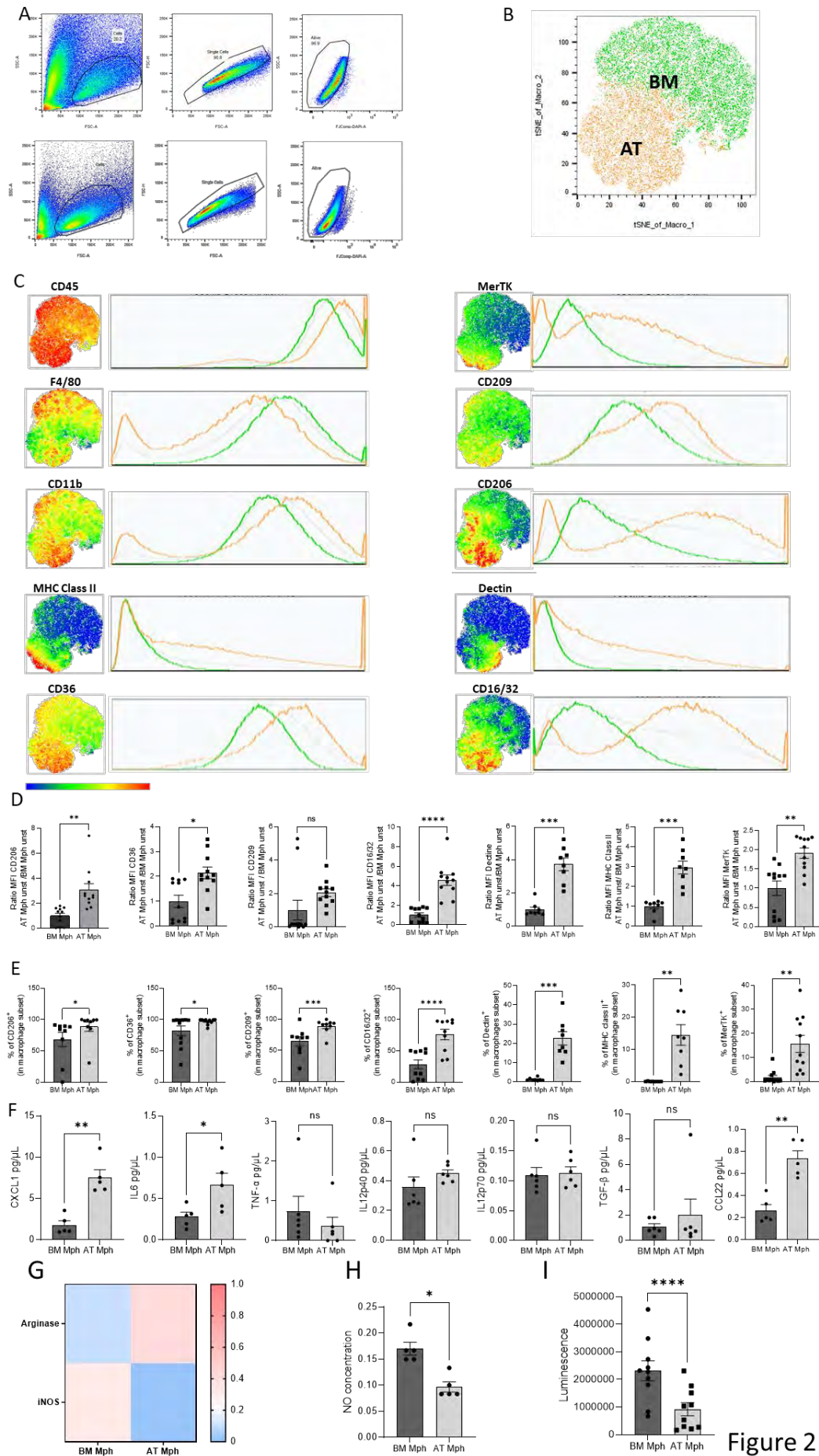


Figure 2

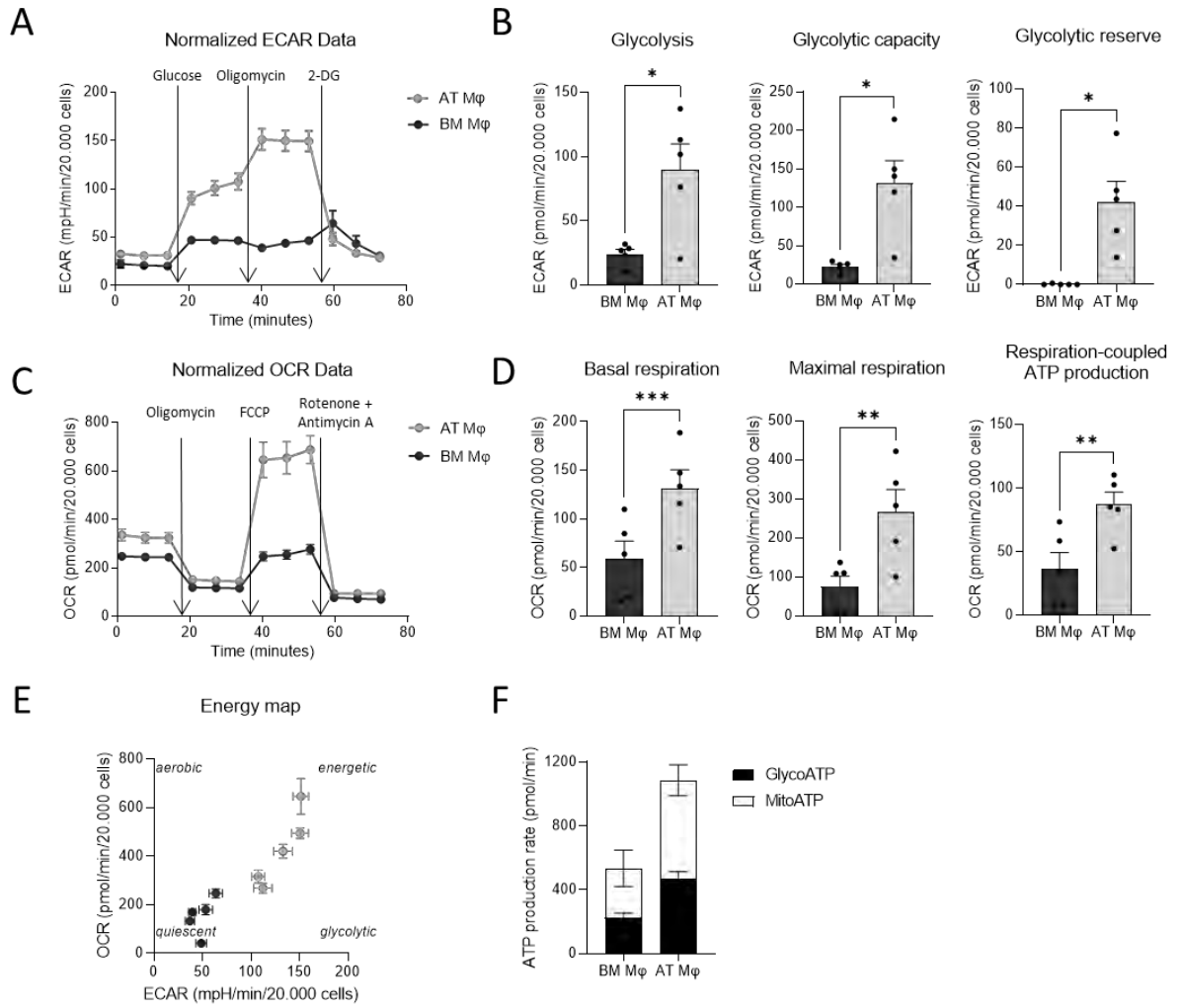


Figure 3

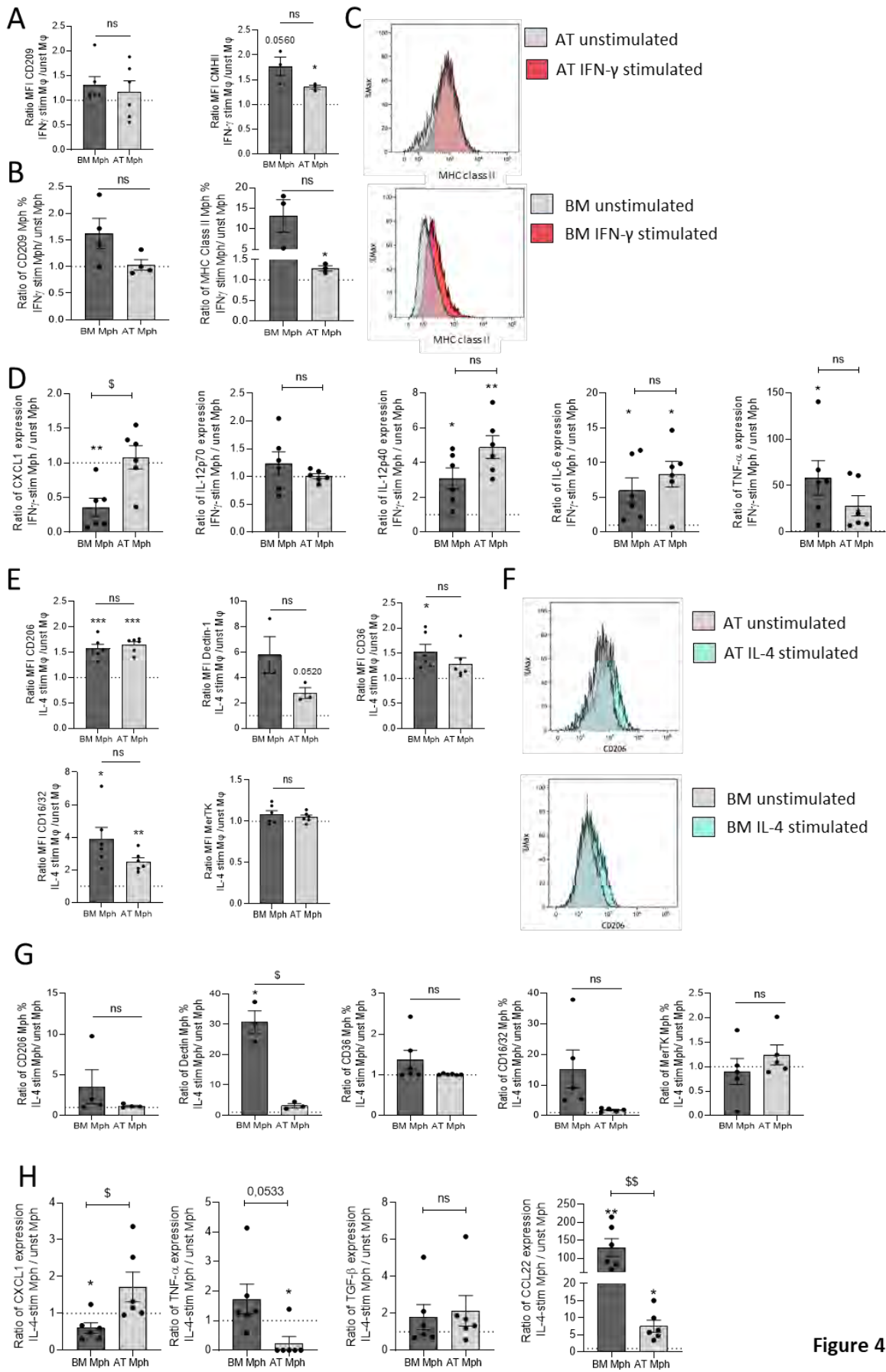


Figure 4

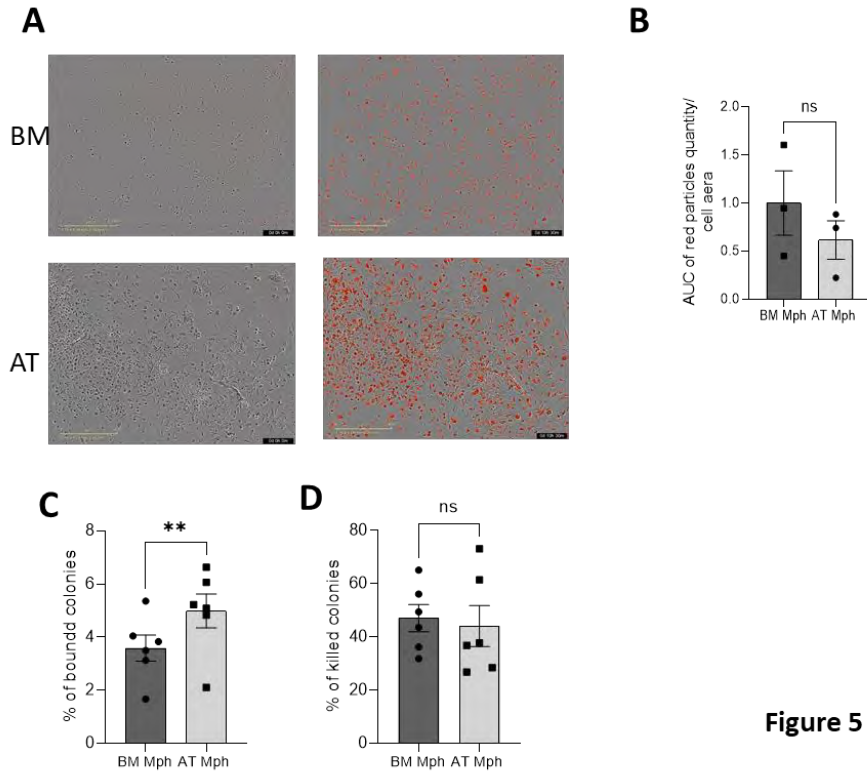


Figure 5

Antibody	Fluorescence	Provider	Clone
F4/80	PECy7	eBioscience	BM8
CD11b	PerCPCy5.5	BD	M1/70
CD45	APC-Cy7	BD	30F11
CD45	BV786	BD	30F11
MHC-II	V500	BD	M5-114-15.2
CD206	APC	eBioscience	MR6F2
Dectine-1	FITC	Miltenyi	REA263
CD209a	BV711	BD	5H10
CD36	PE	Biolegends	HM36
MerTK	BV650	BD	108928
CD16/32	APC-Cy7	BD	2.4G2

Supplementary Table 1 : Antibodies for cytometry stainings

Discussion

Comme évoqué dans l'introduction, les macrophages et particulièrement les macrophages résidents jouent un rôle primordial dans les processus de réparation tissulaire. L'existence d'une hématopoïèse extra-médullaire dans le TA remet en question les dogmes précédemment établis selon lesquels les macrophages présents dans les tissus et qui interviennent dans la réparation tissulaire sont issus soit de l'hématopoïèse embryonnaire soit de la différenciation des monocytes médullaires. Dans ce contexte, la mise en évidence des caractéristiques des macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA et la compréhension de leurs dynamiques d'intervention dans la réparation tissulaire a fait l'objet de mon travail de thèse.

Grâce au développement d'un système de culture en 3 dimensions, nous avons produit des macrophages ayant conservé des caractéristiques spécifiques des macrophages résidents du tissu adipeux (Russo & Lumeng 2018). Nous n'avons cependant pas pu déterminer si les macrophages produits étaient issus des CSH présentes dans la SVF du TA ou uniquement de leur prolifération. En effet, même si nous avons démontré la présence de CSH dans le sphéroïde, nous n'avons pas pu identifier la présence de progéniteurs myéloïdes. En revanche, lorsqu'on isole le sphéroïde des macrophages et qu'on le remet en culture en présence de M-CSF, il est de nouveau capable de générer des macrophages. Même si une partie des macrophages produits provient de la prolifération des macrophages présents initialement dans la SVF, ces résultats suggèrent que le sphéroïde est une source de cellules capables de se différencier en macrophages. La comparaison des deux populations de macrophages nous a permis de mettre en évidence une polarisation plus anti-inflammatoire des macrophages du TA à l'état basal que de ceux dérivés de la MO. Ce résultat est cohérent avec les données de la littérature qui montrent que les macrophages résidents du TA sont impliqués dans la production de cytokines anti-inflammatoires, le remodelage tissulaire via la clairance des cellules apoptotiques et la résolution de l'inflammation (Lumeng et al. 2008). Nous avons également démontré qu'ils sont au moins aussi plastiques que ceux de la MO car capables de répondre à des stimulations métaboliques et inflammatoires. Cette observation concorde avec la description de l'importance du microenvironnement dans l'acquisition du phénotype des macrophages notamment au cours de l'obésité où l'environnement

inflammatoire chronique les polarise peu à peu en macrophages pro-inflammatoires (Suganami & Ogawa 2010). Ces études s'ajoutent à celles déjà menées *in vivo* sur les macrophages résidents et l'importance de leur niche dans l'orientation de la polarisation des macrophages résidents (Guilliams et al. 2020).

Dans la biologie actuelle, définir la polarisation d'un macrophage au sein d'un tissu est une tâche complexe. En effet, la plasticité des macrophages leur confère la possibilité d'intégrer et de répondre à une multitude de signaux de l'environnement par l'acquisition d'une multitude de phénotypes et de fonction. Les macrophages ne peuvent donc plus être définis selon les anciennes nomenclatures définies *in vitro*.

De façon intéressante, cette plasticité du macrophage pourrait être comparée à celle de la cellule souche, capable de se différencier en une multitude de types cellulaires. Il a d'ailleurs été montré que les macrophages présentent un profil d'expression plus proche de celui d'une cellule progénitrice (myoblaste, pré-adipocyte, cellule souche embryonnaire) que d'une cellule différenciée (Charrière et al. 2006). Certains travaux montrent également que des macrophages matures et fonctionnels issus de monocytes sanguins humains, sont capables *in vitro* à la suite d'un traitement spécifique, d'exprimer les marqueurs de cellules d'un lignage non-hématopoïétique comme par exemple des cellules épithéliales ou endothéliales (expression de la kératine après traitement à l'EGF, du facteur de von Willebrand après traitement au VEGF, ...) (Zhao et al. 2003). Par ailleurs, d'autres études proposent que des cellules présentant des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des macrophages (ou « macrophage-like ») proviennent de cellules stromales tissulaires notamment dans le TA (Charrière et al. 2003; Cousin et al. 1999). On pourrait donc proposer que, à l'instar de la cellule souche (Zipori 2004), la fonction de macrophage puisse être assumée par plusieurs types cellulaires et soit donc un état, plutôt qu'une identité. Ceci pourrait aussi expliquer l'étendue des phénotypes des macrophages observés au sein des différents tissus et leur spécificité de fonction au sein de leur tissu de résidence.

Les résultats que nous avons obtenus *in vivo* dans nos deux modèles de réparation démontrent l'étendue de la plasticité des macrophages du TA. En effet, leur rôle réparateur au sein de leur niche et leur rôle délétère dans la réparation cardiaque montrent leur capacité d'adaptation environnementale.

Au sein de leur propre tissu, ils jouent un rôle bénéfique sur la réparation tissulaire de la même manière que les macrophages résidents sont protecteurs dans la réparation des tissus dans lesquels ils sont localisés et permettent le retour à l'homéostasie. Ici, nous avons démontré qu'au-delà de la réparation, ils sont indispensables à la régénération du TA normalement perdue chez le mammifère adulte. L'hématopoïèse du TA est orientée vers la différenciation myéloïde *in vivo*, et contribue donc au système immunitaire inné et très peu au système immunitaire adaptatif. Cela concorde avec les données de la littérature qui présentent la perte de capacité de régénération en corrélation avec l'apparition du système immunitaire adaptatif (Bertolotti et al. 2013; Sattler & Rosenthal 2016). Dans notre étude nous avons démontré que ce sont les macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA qui sont indispensables à la mise en place de la régénération. Cependant, ils ne permettent pas la régénération de manière spontanée du TA, montrant qu'il existe bien chez les mammifères adultes un verrou à la régénération qui agit sur les cellules de l'immunité innée dérivées de l'hématopoïèse du TA.

Le TA est un des tissus très conservé au cours de l'évolution (McKay et al. 2003). On le retrouve notamment chez l'insecte (très étudié chez la drosophile) sous le nom de corps gras où il est défini comme un organe multifonctionnel permettant le stockage d'énergie, la production endocrine mais également la réponse immunitaire par la production de peptides antimicrobiens (Yongmei Xi 2015). Même s'il semble constitué de façon très différente chez les vertébrés et les invertébrés, un grand nombre de gènes du métabolisme ont été étudiés et sont conservés au cours de l'évolution (Kadereit et al. 2008). A ce jour, il n'existe pas d'étude, à ma connaissance, ayant comparé la conservation des gènes de l'immunité présents dans le corps gras de la drosophile au cours de l'évolution, chez le poisson ou les amphibiens. Cependant, on retrouve bien des corrélation d'expression des protéines de l'immunité chez le mammifère et la drosophile (Charroux & Royet 2010) suggérant que le rôle immunitaire du TA a été conservé au cours de l'évolution. Chez les amphibiens et le poisson zèbre, l'étude du TA est limitée à sa capacité à stocker l'énergie. Les propriétés inflammatoires et la présence de cellules immunitaires dans le TA chez ces espèces n'ont été étudiées qu'au cours de maladies métaboliques telles que l'obésité mais jamais en conditions physiologiques (Gesta et al. 2007). L'importance du TA dans les phénomènes de régénération n'a pas non plus été étudiée chez ces organismes. En revanche, chez la souris, le TA du derme

est indispensable à la mise en place d'une réparation cutanée efficace notamment à travers l'activation de macrophages (Shook et al. 2020). On pourrait proposer que le TA est un organe primitif qui permet une réponse immunitaire innée plus adaptée aux phénomènes de régénération que la réponse immunitaire engagée par les cellules médullaires.

Nous avons démontré que les monocytes et les macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA sont des acteurs de la réparation cardiaque à distance. Précédemment, l'origine des macrophages intervenant dans la réparation post-infarctus du myocarde était limitée à la présence des macrophage résidents du cœur et à l'infiltration des monocytes médullaires (Bajpai et al. 2019). Nous avons clairement démontré ici, qu'à la suite d'un infarctus du myocarde les monocytes et les macrophages du TA infiltrèrent le cœur et participent à la mise en place de la fibrose cardiaque. Alors que physiologiquement, on ne retrouve pas de cellules dérivées de l'hématopoïèse du TA dans le sang des souris, on a pu en identifier à la suite d'un infarctus du myocarde comme cela est observé pour les monocytes médullaires (Dutta & Nahrendorf 2015). L'infarctus active également une hématopoïèse d'urgence dans la rate et induit la migration de monocytes spléniques vers le site infarcté (Swirski et al. 2009; Leuschner et al. 2012). Ainsi, le TA pourrait servir de réservoir dans lequel l'hématopoïèse d'urgence serait activée par les signaux pro-inflammatoires induits par la lésion et interviendrait plus rapidement que les monocytes médullaires. En revanche, nos études ne nous ont pas permis de déterminer si ces cellules myéloïdes étaient issues du TA péri-cardiaque ou d'un tissu adipeux plus éloigné comme le TA sous-cutané, qui est le dépôt adipeux dans lequel l'hématopoïèse est la plus efficace. Il serait également intéressant de déterminer la nature des cellules qui migrent vers les organes lésés. Deux hypothèses coexistent, soit les macrophages sont recrutés directement depuis le dépôt adipeux, soit ce sont des monocytes qui circulent comme c'est le cas des monocytes médullaires (Rizzo et al. 2022). Physiologiquement, le TA contient très peu de monocytes. L'activation de l'hématopoïèse par des signaux inflammatoires pourrait induire leur production et leur migration vers le site de la lésion. Ceci a déjà été démontré pour les mastocytes dérivés de l'hématopoïèse du TA. En effet, alors qu'ils représentent une population minoritaire dans le TA, l'infarctus du myocarde entraîne une forte infiltration des mastocytes du TA (Ngkelo et al. 2016).

L'hématopoïèse du TA semble donc comme celle de la rate jouer un rôle d'hématopoïèse d'urgence, au moins dans le cœur en fournissant des cellules immunitaires au tissu lésé. Alors

que les mastocytes dérivés de l'hématopoïèse du TA jouent un rôle bénéfique dans la réparation cardiaque post-infarctus en augmentant la contractilité des fibres cardiaques (Ngkelo et al. 2016), les macrophages jouent un rôle délétère, similaire à celui des monocytes recrutés depuis la MO avec des actions pro-inflammatoires et pro-fibrotiques (Kratofil et al. 2017). Des études sur le cœur plusieurs mois après l'infarctus pourraient également révéler si, comme les macrophages dérivés des monocytes médullaires, les macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA peuvent rester dans le tissu cardiaque à long terme et participer à l'inflammation de bas grade qui persiste post-infarctus (Kain et al. 2014).

La proximité du TA avec la plupart des organes suggère que les cellules immunitaires (notamment les macrophages et les monocytes) pourraient intervenir lors de microlésions qui surviennent dans les organes au cours de la vie. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus, montrent que l'hématopoïèse du TA diminue avec l'âge et que la majorité des macrophages du TA provient de la MO chez la souris âgée. En outre, nos études *in vitro*, renforcent ce message puisque nous avons été dans l'incapacité de produire des macrophages avec notre système de production en 3 dimensions à partir de TA sous-cutané de souris âgées (résultats non montrés). L'augmentation de l'inflammation observée dans le TA avec le vieillissement (Schaum et al. 2019) pourrait donc être due au moins en partie, à un remplacement des macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA par ceux dérivés de l'hématopoïèse médullaire plutôt qu'à des modifications phénotypiques des macrophages produits par l'hématopoïèse endogène du TA.

Enfin, un nombre croissant d'études décrit l'existence de progéniteurs hématopoïétiques au sein d'autres tissus que la MO, y compris en conditions physiologiques (Mende & Laurenti 2021). On retrouve ainsi des CSH ou des progéniteurs hématopoïétique dans la rate, le foie, le poumon, le muscle, la gencive, le rein et l'intestin grêle (Asakura & Rudnicki 2002; Kotton et al. 2005; Lefrançais et al. 2017; McKinney-Freeman et al. 2003; Krishnan et al. 2021). Les études préliminaires menées sur ces progéniteurs ont montré qu'ils étaient capables, *in vitro*, de produire des colonies (Asakura & Rudnicki 2002). *In vivo*, les CSH musculaires de manière identique aux CSH du TA ont permis la reconstitution hématopoïétique de souris irradiées (McKinney-Freeman et al. 2003). En revanche la capacité de repeuplement des CSH de la rate semble moins efficace que celle des CSH de MO mais elles permettent la production localement de cellules immunitaires participant au pool de cellules immunitaires spléniques

(Morita et al. 2011). Des résultats très préliminaires obtenus avec notre système de culture en 3 dimensions montrent qu'il est possible de produire des macrophages à partir de poumons et de foie, ce qui serait cohérent avec l'existence au sein de ces tissus d'une hématopoïèse endogène permettant la production de cellules immunitaires, même si nous n'avons pas clairement identifié le mécanisme de production des macrophages dans notre système de culture.

La présence d'une hématopoïèse endogène dans différents organes pourrait remettre en question le dogme selon lequel les cellules immunitaires tissulaires proviennent exclusivement de l'hématopoïèse embryonnaire ou médullaire adulte et pourrait expliquer au moins en partie les altérations hématopoïétiques observées avec l'âge. Etant donné l'importance de la niche dans la différenciation des CSH, les modifications du stroma qui accompagnent le vieillissement pourraient être à l'origine d'une modification voire d'une incapacité des CSH à générer des cellules hématopoïétiques différenciées. En effet, la fibrose observée avec l'âge dans les différents organes et notamment dans le TA où elle apparaît précocement (Schaum et al. 2019), pourrait contraindre les CSH à un état de quiescence forcé, et donc diminuer voire abolir leur différenciation en cellules immunitaires résidentes. Ces dernières devraient alors être remplacées par les cellules immunitaires d'origine médullaire afin de maintenir l'équilibre tissulaire. L'altération de l'hématopoïèse extra-médullaire, ajoutée aux modifications de la niche médullaire chez le sujet âgé pourrait donc expliquer le biais de différenciation des CSH médullaires vers la myélopoïèse observé au cours du vieillissement (Kovtonyuk et al. 2016). L'excès de cellules dérivées de l'hématopoïèse médullaire considérées plus pro-inflammatoires que les cellules résidentes au sein des tissus participerait ensuite à l'accentuation du profil inflammatoire des tissus observée au cours du vieillissement.

En conclusion, le travail décrit dans ce manuscrit montre que les macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA ont des caractéristiques particulières et jouent un rôle spécifique dans les processus de réparation tissulaire. Le rôle exact des cellules à l'état physiologique n'a pas encore été élucidé. Elles pourraient constituer une population immunitaire d'urgence susceptible d'être recrutée en cas de besoin, et/ou une réminiscence de l'évolution. L'ensemble de ces études remet en cause le dogme selon lequel l'hématopoïèse adulte a lieu

uniquement au sein de la MO et interroge sur le devenir des CSH tissulaires au cours du vieillissement.

Bibliographie

- Abnave P & Ghigo E (2019) Role of the immune system in regeneration and its dynamic interplay with adult stem cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 87, 160–168.
- Abshagen K, Eipel C, Kalff JC, Menger MD & Vollmar B (2007) Loss of NF- κ B activation in Kupffer cell-depleted mice impairs liver regeneration after partial hepatectomy. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 292, G1570–G1577.
- Acar MB, Ayaz-Güner Ş, Di Bernardo G, Güner H, Murat A, Peluso G, Özcan S & Galderisi U (2020) Obesity induced by high-fat diet is associated with critical changes in biological and molecular functions of mesenchymal stromal cells present in visceral adipose tissue. *Aging (Albany NY)* 12, 24894–24913.
- Acharya D, Li XR (Lisa), Heineman RE-S & Harrison RE (2020) Complement Receptor-Mediated Phagocytosis Induces Proinflammatory Cytokine Production in Murine Macrophages. *Frontiers in Immunology* 10. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.03049> [Accessed January 9, 2023].
- Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, Bryder D, Yang L, Borge O-J, Thoren LAM, Anderson K, Sitnicka E, Sasaki Y, Sigvardsson M & Jacobsen SEW (2005) Identification of Flt3⁺ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 121, 295–306.
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM & Rossi FMV (2011) Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci* 14, 1142–1149.
- Akgul C & Edwards SW (2003) Review Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors. 60.
- Akimenko M-A, Marí-Beffa M, Becerra J & Géraudie J (2003) Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration. *Developmental Dynamics* 226, 190–201.
- Alexopoulou L, Desnues B & Demaria O (2012) Le récepteur Toll- like 8: Un TLR pas comme les autres. *Med Sci (Paris)* 28, 96–102.
- Altincicek B & Vilcinskis A (2008) Comparative analysis of septic injury-inducible genes in phylogenetically distant model organisms of regeneration and stem cell research, the planarian *Schmidtea mediterranea* and the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Front Zool* 5, 6.
- Andreeva ER, Andrianova IV, Gornostaeva AN, Gogiya BS & Buravkova LB (2018) Evaluation of committed and primitive cord blood progenitors after expansion on adipose stromal cells. *Cell Tissue Res* 372, 523–533.
- Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK & Chazaud B (2007) Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 204, 1057–1069.
- Asakura A & Rudnicki MA (2002) Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation. *Experimental Hematology* 30, 1339–1345.

- Asterholm IW, Tao C, Morley TS, Wang QA, Delgado-Lopez F, Wang ZV & Scherer PE (2014) Adipocyte Inflammation is Essential for Healthy Adipose Tissue Expansion and Remodeling. *Cell Metab* 20, 103–118.
- Aurora AB & Olson EN (2014) Immune Modulation of Stem Cells and Regeneration. *Cell Stem Cell* 15, 14–25.
- Bain CC, Bravo-Blas A, Scott CL, Perdiguero EG, Geissmann F, Henri S, Malissen B, Osborne LC, Artis D & Mowat AM (2014) Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat. Immunol.* 15, 929–937.
- Bajpai G, Bredemeyer A, Li W, Zaitsev K, Koenig AL, Lokshina I, Mohan J, Ivey B, Hsiao H-M, Weinheimer C, Kovacs A, Epelman S, Artyomov M, Kreisel D & Lavine KJ (2019) Tissue Resident CCR2– and CCR2+ Cardiac Macrophages Differentially Orchestrate Monocyte Recruitment and Fate Specification Following Myocardial Injury. *Circulation Research* 124, 263–278.
- Bapat SP, Myoung Suh J, Fang S, Liu S, Zhang Y, Cheng A, Zhou C, Liang Y, LeBlanc M, Liddle C, Atkins AR, Yu RT, Downes M, Evans RM & Zheng Y (2015) Depletion of fat-resident Treg cells prevents age-associated insulin resistance. *Nature* 528, 137–141.
- Belyavsky A, Petinati N & Drize N (2021) Hematopoiesis during Ontogenesis, Adult Life, and Aging. *Int J Mol Sci* 22, 9231.
- Bennett FC, Bennett ML, Yaqoob F, Mulinyawe SB, Grant GA, Hayden Gephart M, Plowey ED & Barres BA (2018) A Combination of Ontogeny and CNS Environment Establishes Microglial Identity. *Neuron* 98, 1170-1183.e8.
- Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF & Senger DR (1992) Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *MBoC* 3, 211–220.
- Bertolotti E, Malagoli D & Franchini A (2013) Skin wound healing in different aged *Xenopus laevis*. *Journal of Morphology* 274, 956–964.
- Biernacka A & Frangogiannis NG (2011) Aging and Cardiac Fibrosis. *Aging Dis* 2, 158–173.
- Blériot C, Barreby E, Dunsmore G, Ballaire R, Chakarov S, Ficht X, Simone GD, Andreatta F, Fumagalli V, Guo W, Wan G, Gessain G, Khalilnezhad A, Zhang XM, Ang N, Chen P, Morgantini C, Azzimato V, Kong WT, Liu Z, Pai R, Lum J, Shihui F, Low I, Xu C, Malleret B, Kairi MFM, Balachander A, Cexus O, Larbi A, Lee B, Newell EW, Ng LG, Phoo WW, Sobota RM, Sharma A, Howland SW, Chen J, Bajenoff M, Yvan-Charvet L, Venticlef N, Iannacone M, Aouadi M & Ginhoux F (2021) A subset of Kupffer cells regulates metabolism through the expression of CD36. *Immunity* 54, 2101-2116.e6.
- Blériot C, Chakarov S & Ginhoux F (2020) Determinants of Resident Tissue Macrophage Identity and Function. *Immunity* 52, 957–970.
- Böiers C, Carrelha J, Lutteropp M, Luc S, Green JCA, Azzoni E, Woll PS, Mead AJ, Hultquist A, Swiers G, Perdiguero EG, Macaulay IC, Melchiori L, Luis TC, Kharazi S, Bouriez-Jones T, Deng Q, Pontén A, Atkinson D, Jensen CT, Sitnicka E, Geissmann F, Godin I, Sandberg R, de Bruijn MFTR & Jacobsen SEW (2013) Lymphomyeloid contribution of an immune-restricted

progenitor emerging prior to definitive hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 13, 535–548.

- Bonnefoy F, Gauthier T, Vallion R, Martin-Rodriguez O, Misse A, Daoui A, Valmary-Degano S, Saas P, Couturier M & Perruche S (2018) Factors Produced by Macrophages Eliminating Apoptotic Cells Demonstrate Pro-Resolutive Properties and Terminate Ongoing Inflammation. *Front Immunol* 9. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6277856/> [Accessed February 4, 2019].
- Bournazos S, Gupta A & Ravetch JV (2020) The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement. *Nat Rev Immunol* 20, 633–643.
- Bowie MB, Kent DG, Dykstra B, McKnight KD, McCaffrey L, Hoodless PA & Eaves CJ (2007) Identification of a new intrinsically timed developmental checkpoint that reprograms key hematopoietic stem cell properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5878–5882.
- Bradley T & Metcalf D (1966) The Growth of Mouse Bone Marrow Cells in Vitro. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* 44, 287–300.
- Brain SD & Williams TJ (1990) Leukotrienes and inflammation. *Pharmacol Ther* 46, 57–66.
- Brancato SK & Albina JE (2011) Wound Macrophages as Key Regulators of Repair. *Am J Pathol* 178, 19–25.
- Brockes JP & Kumar A (2002) Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 566–574.
- Buckley CD, Gilroy DW & Serhan CN (2014) Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity* 40, 315–327.
- Bühling F, Röcken C, Brasch F, Hartig R, Yasuda Y, Saftig P, Brömme D & Welte T (2004) Pivotal Role of Cathepsin K in Lung Fibrosis. *Am J Pathol* 164, 2203–2216.
- Cabrera S, Gaxiola M, Arreola JL, Ramírez R, Jara P, D’Armiento J, Richards T, Selman M & Pardo A (2007) Overexpression of MMP9 in macrophages attenuates pulmonary fibrosis induced by bleomycin. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 2324–2338.
- Canton J, Neculai D & Grinstein S (2013) Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol* 13, 621–634.
- Canton M, Sánchez-Rodríguez R, Spera I, Venegas FC, Favia M, Viola A & Castegna A (2021) Reactive Oxygen Species in Macrophages: Sources and Targets. *Frontiers in Immunology* 12. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.734229> [Accessed November 30, 2022].
- Cantor AB & Orkin SH (2001) Hematopoietic development: a balancing act. *Current Opinion in Genetics & Development* 11, 513–519.
- Cassado A dos A, D’Império Lima MR & Bortoluci KR (2015) Revisiting Mouse Peritoneal Macrophages: Heterogeneity, Development, and Function. *Frontiers in Immunology* 6. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00225> [Accessed January 14, 2023].

- Cassetta L, Cassol E & Poli G (2011) Macrophage Polarization in Health and Disease. *ScientificWorldJournal* 11, 2391–2402.
- Castillo M, Liu K, Bonilla L & Rameshwar P (2007) The Immune Properties of Mesenchymal Stem Cells. *Int J Biomed Sci* 3, 76–80.
- Challen GA, Boles N, Lin KK & Goodell MA (2009) Mouse Hematopoietic Stem Cell Identification And Analysis. *Cytometry A* 75, 14–24.
- Chandrasekharan JA & Sharma-Walia N (2015) Lipoxins: nature’s way to resolve inflammation. *J Inflamm Res* 8, 181–192.
- Charrière G, Cousin B, Arnaud E, André M, Bacou F, Pénicaud L & Casteilla L (2003) Preadipocyte Conversion to Macrophage: EVIDENCE OF PLASTICITY*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 9850–9855.
- Charrière GM, Cousin B, Arnaud E, Saillan-Barreau C, André M, Massoudi A, Dani C, Pénicaud L & Casteilla L (2006) Macrophage characteristics of stem cells revealed by transcriptome profiling. *Exp Cell Res* 312, 3205–3214.
- Charroux B & Royet J (2010) Drosophila immune response: From systemic antimicrobial peptide production in fat body cells to local defense in the intestinal tract. *Fly* 4, 40–47.
- Chen G & Robert J (2011) Antiviral Immunity in Amphibians. *Viruses* 3, 2065–2086.
- Cheng H, Zheng Z & Cheng T (2020) New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein Cell* 11, 34–44.
- Chiu S-C, Liu H-H, Chen C-L, Chen P-R, Liu M-C, Lin S-Z & Chang K-T (2015) Extramedullary hematopoiesis (EMH) in laboratory animals: offering an insight into stem cell research. *Cell Transplant* 24, 349–366.
- Choi H-J, Kim N-E, Kim BM, Seo M & Heo JH (2018) TNF- α -Induced YAP/TAZ Activity Mediates Leukocyte-Endothelial Adhesion by Regulating VCAM1 Expression in Endothelial Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 3428.
- Chorro L, Sarde A, Li M, Woollard KJ, Chambon P, Malissen B, Kissenpfennig A, Barbaroux J-B, Groves R & Geissmann F (2009) Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *J Exp Med* 206, 3089–3100.
- Chow DC, Wenning LA, Miller WM & Papoutsakis ET (2001) Modeling pO₂ Distributions in the Bone Marrow Hematopoietic Compartment. I. Krogh’s Model. *Biophysical Journal* 81, 675–684.
- Christensen JL, Wright DE, Wagers AJ & Weissman IL (2004) Circulation and Chemotaxis of Fetal Hematopoietic Stem Cells Douglas Melton, ed. *PLoS Biol* 2, e75.
- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS & Obin MS (2005) Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid Res.* 46, 2347–2355.
- Clark LD, Clark RK & Heber-Katz E (1998) A New Murine Model for Mammalian Wound Repair and Regeneration. *Clinical Immunology and Immunopathology* 88, 35–45.

- Colvin GA, Berz D, Quesenberry PJ, Papa E & Liu L (2009) Short-Term Hematopoietic Stem Cells (ST-HSC) Have Full Long-Term Capacity with Sustained but Reduced Potential Compared with LT-HSC. *Blood* 114, 2550.
- Corre J, Barreau C, Cousin B, Chavoïn J-P, Caton D, Fournial G, Penicaud L, Casteilla L & Laharrague P (2006) Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors. *Journal of Cellular Physiology* 208, 282–288.
- Cousin B, André M, Arnaud E, Pénicaud L & Casteilla L (2003) Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301, 1016–1022.
- Cousin B, Munoz O, Andre M, Fontanilles AM, Dani C, Cousin JL, Laharrague P, Casteilla L & Pénicaud L (1999) A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *The FASEB Journal* 13, 305–312.
- D'Alessio FR, Kurzhagen JT & Rabb H (2019) Reparative T lymphocytes in organ injury. *J Clin Invest* 129, 2608–2618.
- Daley JM, Brancato SK, Thomay AA, Reichner JS & Albina JE (2010) The phenotype of murine wound macrophages. *J Leukoc Biol* 87, 59–67.
- Das A, Sinha M, Datta S, Abas M, Chaffee S, Sen CK & Roy S (2015) Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration. *Am J Pathol* 185, 2596–2606.
- Davies LC, Rosas M, Jenkins SJ, Liao C-T, Scurr MJ, Brombacher F, Fraser DJ, Allen JE, Jones SA & Taylor PR (2013) Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. *Nat Commun* 4, 1886.
- Davis JR, Huang C-Y, Zanet J, Harrison S, Rosten E, Cox S, Soong DY, Dunn GA & Stramer BM (2012) Emergence of embryonic pattern through contact inhibition of locomotion. *Development* 139, 4555–4560.
- De Grandis M, Lhoumeau A-C, Mancini SJC & Aurrand-Lions M (2016) Adhesion receptors involved in HSC and early-B cell interactions with bone marrow microenvironment. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 687–703.
- De Lorenzo BHP, Godoy LC, Novaes e Brito RR, Pagano RL, Amorim-Dias MA, Grosso DM, Lopes JD & Mariano M (2010) Macrophage suppression following phagocytosis of apoptotic neutrophils is mediated by the S100A9 calcium-binding protein. *Immunobiology* 215, 341–347.
- De Toni F, Poglio S, Youcef AB, Cousin B, Pflumio F, Bourin P, Casteilla L & Laharrague P (2011) Human adipose-derived stromal cells efficiently support hematopoiesis in vitro and in vivo: a key step for therapeutic studies. *Stem Cells Dev.* 20, 2127–2138.
- Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, Michael LH, Rollins BJ, Entman ML & Frangogiannis NG (2005) CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 Regulates Inflammatory Responses Critical to Healing Myocardial Infarcts. *Circulation Research* 96, 881–889.
- Dick SA, Wong A, Hamidzada H, Nejat S, Nechanitzky R, Vohra S, Mueller B, Zaman R, Kantores C, Aronoff L, Momen A, Nechanitzky D, Li WY, Ramachandran P, Crome SQ, Becher B, Cybulsky MI, Billia F, Keshavjee S, Mital S, Robbins CS, Mak TW & Epelman S (2022) Three tissue

resident macrophage subsets coexist across organs with conserved origins and life cycles. *Science Immunology* 7, eabf7777.

Ding L, Saunders TL, Enikolopov G & Morrison SJ (2012) Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 481, 457–462.

Doran AC, Yurdagul A & Tabas I (2020) Efferocytosis in health and disease. *Nat Rev Immunol* 20, 254–267.

Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Lang R & Iredale JP (2005) Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* 115, 56–65.

Dunjic A, Maisin H, Maisin J, Maldague P & Sempoux D (1956) [Studies on erythropoiesis in irradiated rats with the aid of Fe 59; recent research]. *C R Seances Soc Biol Fil* 150, 1031–1036.

Duong L, Radley H, Lee B, Dye D, Pixley F, Grounds M, Nelson D & Jackaman C (2021) Macrophage function in the elderly and impact on injury repair and cancer. *Immunity & Ageing* 18, 4.

Dutta P & Nahrendorf M (2015) Monocytes in Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35, 1066–1070.

Edholm E-S, Rhoo KH & Robert J (2017) Evolutionary Aspects of Macrophages Polarization. *Results Probl Cell Differ* 62, 3–22.

Eigenbrod T, Park J-H, Harder J & Iwakura Y (2009) Critical Role for Mesothelial Cells in Necrosis-Induced Inflammation through the Recognition of IL-1 α Released from Dying Cells.

Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, Lysiak JJ, Harden TK, Leitinger N & Ravichandran KS (2009) Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal for phagocytic clearance. *Nature* 461, 282–286.

Elliott MR, Koster KM & Murphy PS (2017) Efferocytosis signaling in the regulation of macrophage inflammatory responses. *J Immunol* 198, 1387–1394.

Elliott SA & Sánchez Alvarado A (2013) THE HISTORY AND ENDURING CONTRIBUTIONS OF PLANARIANS TO THE STUDY OF ANIMAL REGENERATION. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2, 301–326.

Enoksson M, Lyberg K, Möller-Westerberg C, Fallon PG, Nilsson G & Lunderius-Andersson C (2011) Mast cells as sensors of cell injury through IL-33 recognition. *J Immunol* 186, 2523–2528.

Epelman S, Lavine KJ, Beaudin AE, Sojka DK, Carrero JA, Calderon B, Brija T, Gautier EL, Ivanov S, Satpathy AT, Schilling JD, Schwendener R, Sergin I, Razani B, Forsberg EC, Yokoyama W, Unanue ER, Colonna M, Randolph GJ & Mann DL (2014) Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* 40, 91–104.

Fadok VA, Bratton DL & Henson PM (2001) Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest* 108, 957–962.

- Fadok VA, Warner ML, Bratton DL & Henson PM (1998) CD36 Is Required for Phagocytosis of Apoptotic Cells by Human Macrophages That Use Either a Phosphatidylserine Receptor or the Vitronectin Receptor ($\alpha v\beta 3$). *The Journal of Immunology* 161, 6250–6257.
- Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhodzhiy S, Peri F, Wilson SW & Ruhrberg C (2010) Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* 116, 829–840.
- Fernández-García M, Yañez RM, Sánchez-Domínguez R, Hernando-Rodríguez M, Peces-Barba M, Herrera G, O'Connor JE, Segovia JC, Bueren JA & Lamana ML (2015) Mesenchymal stromal cells enhance the engraftment of hematopoietic stem cells in an autologous mouse transplantation model. *Stem Cell Res Ther* 6, 165.
- Ferracini M, Rios FJO, Pecenin M & Jancar S (2013) Clearance of Apoptotic Cells by Macrophages Induces Regulatory Phenotype and Involves Stimulation of CD36 and Platelet-Activating Factor Receptor. *Mediators Inflamm* 2013. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3854564/> [Accessed May 22, 2019].
- Ferretti P, Zhang F & O'Neill P (2003) Changes in spinal cord regenerative ability through phylogenesis and development: Lessons to be learnt. *Developmental Dynamics* 226, 245–256.
- Ferrucci L & Fabbri E (2018) Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol* 15, 505–522.
- Forbes SJ & Rosenthal N (2014) Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy. *Nat Med* 20, 857–869.
- Foudi A, Hochedlinger K, Van Buren D, Schindler JW, Jaenisch R, Carey V & Hock H (2009) Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol* 27, 84–90.
- Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C & Rossi AG (2010) Neutrophil Apoptosis: Relevance to the Innate Immune Response and Inflammatory Disease. *J Innate Immun* 2, 216–227.
- Franceschi C & Campisi J (2014) Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 69, S4–S9.
- Freeman SA & Grinstein S (2014) Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunological Reviews* 262, 193–215.
- Freytes DO, Kang JW, Marcos-Campos I & Vunjak-Novakovic G (2013) Macrophages modulate the viability and growth of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 114, 220–229.
- Frohnert BI & Bernlohr DA (2013) Protein Carbonylation, Mitochondrial Dysfunction, and Insulin Resistance. *Adv Nutr* 4, 157–163.
- Fuster JJ, Ouchi N, Gokce N & Walsh K (2016) Obesity-Induced Changes in Adipose Tissue Microenvironment and Their Impact on Cardiovascular Disease. *Circulation Research* 118, 1786–1807.

- Galván-Peña S & O'Neill LAJ (2014) Metabolic Reprograming in Macrophage Polarization. *Front Immunol* 5, 420.
- García-García E & Rosales C (2002) Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *Journal of Leukocyte Biology* 72, 1092–1108.
- Geering B & Simon H-U (2011) Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ* 18, 1457–1469.
- Geissmann F, Jung S & Littman DR (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71–82.
- Georgountzou A & Papadopoulos NG (2017) Postnatal Innate Immune Development: From Birth to Adulthood. *Frontiers in Immunology* 8. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00957> [Accessed December 23, 2022].
- Gesta S, Tseng Y-H & Kahn CR (2007) Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell* 131, 242–256.
- Gibbons MA, MacKinnon AC, Ramachandran P, Dhaliwal K, Duffin R, Phythian-Adams AT, van Rooijen N, Haslett C, Howie SE, Simpson AJ, Hirani N, Gauldie J, Iredale JP, Sethi T & Forbes SJ (2011) Ly6Chi monocytes direct alternatively activated profibrotic macrophage regulation of lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 184, 569–581.
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM & Merad M (2010) Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* 330, 841–845.
- Ginhoux F & Guilliams M (2016) Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* 44, 439–449.
- Godwin JW, Pinto AR & Rosenthal NA (2013) Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 9415–9420.
- Gordon S (2016) Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity* 44, 463–475.
- Greenbaum A, Hsu Y-MS, Day RB, Schuettpelez LG, Christopher MJ, Borgerding JN, Nagasawa T & Link DC (2013) CXCL12 Production by Early Mesenchymal Progenitors is Required for Hematopoietic Stem Cell Maintenance. *Nature* 495, 227–230.
- Greenhalgh DG (2003) Wound healing and diabetes mellitus. *Clinics in Plastic Surgery* 30, 37–45.
- Griseri T, McKenzie BS, Schiering C & Powrie F (2012) Dysregulated hematopoietic stem and progenitor cell activity promotes interleukin-23-driven chronic intestinal inflammation. *Immunity* 37, 1116–1129.
- Gude DR, Alvarez SE, Paugh SW, Mitra P, Yu J, Griffiths R, Barbour SE, Milstien S & Spiegel S (2008) Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a “come-and-get-me” signal. *FASEB J* 22, 2629–2638.
- Guilliams M, De Kleer I, Henri S, Post S, Vanhoutte L, De Prijck S, Deswarte K, Malissen B, Hammad H & Lambrecht BN (2013) Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that

differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J Exp Med* 210, 1977–1992.

Guilliams M & Scott CL (2017) Does niche competition determine the origin of tissue-resident macrophages? *Nature Reviews Immunology* 17, 451–460.

Guilliams M, Thierry GR, Bonnardel J & Bajenoff M (2020) Establishment and Maintenance of the Macrophage Niche. *Immunity* 52, 434–451.

Gula G, Rumiński S, Niderla-Bielińska J, Jasińska A, Kiernozek E, Jankowska-Steifer E, Flaht-Zabost A & Ratajska A (2021) Potential functions of embryonic cardiac macrophages in angiogenesis, lymphangiogenesis and extracellular matrix remodeling. *Histochem Cell Biol* 155, 117–132.

Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y & Longaker MT (2008) Wound repair and regeneration. *Nature* 453, 314–321.

Gvaramia D, Müller E, Müller K, Atallah P, Tsurkan M, Freudenberg U, Bornhäuser M & Werner C (2017) Combined influence of biophysical and biochemical cues on maintenance and proliferation of hematopoietic stem cells. *Biomaterials* 138, 108–117.

Han J, Koh YJ, Moon HR, Ryoo HG, Cho C-H, Kim I & Koh GY (2010) Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 115, 957–964.

Han J, Lee J-E, Jin J, Lim JS, Oh N, Kim K, Chang S-I, Shibuya M, Kim H & Koh GY (2011) The spatiotemporal development of adipose tissue. *Development* 138, 5027–5037.

Han M, Yang X, Jangwoo L, Allan CH & Muneoka K (2008) Development and Regeneration of the Neonatal Digit Tip in Mice. *Dev Biol* 315, 125–135.

Harizi H, Corcuff J-B & Gualde N (2008) Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in Molecular Medicine* 14, 461–469.

Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, Becker CD, See P, Price J, Lucas D, Greter M, Mortha A, Boyer SW, Forsberg EC, Tanaka M, van Rooijen N, García-Sastre A, Stanley ER, Ginhoux F, Frenette PS & Merad M (2013) Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes. *Immunity* 38, 792–804.

Hasnain Waqas SF, Noble A, Hoang AC, Ampem G, Popp M, Strauß S, Guille M & Röszer T (2017) Adipose tissue macrophages develop from bone marrow-independent progenitors in *Xenopus laevis* and mouse. *J Leukoc Biol* 102, 845–855.

Hilgendorf I, Gerhardt LMS, Tan TC, Winter C, Holderried TAW, Chousterman BG, Iwamoto Y, Liao R, Zirlik A, Scherer-Crosbie M, Hedrick CC, Libby P, Nahrendorf M, Weissleder R & Swirski FK (2014) Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium. *Circ Res* 114, 1611–1622.

Hochreiter-Hufford A & Ravichandran KS (2013) Clearing the Dead: Apoptotic Cell Sensing, Recognition, Engulfment, and Digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a008748.

- Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, Schindler JW, Saleque S, Fujiwara Y & Orkin SH (2004) Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature* 431, 1002–1007.
- Hoeffel G & Ginhoux F (2015) Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages. *Front Immunol* 6, 486.
- Hoving JC, Wilson GJ & Brown GD (2014) Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cell Microbiol* 16, 185–194.
- Hoyer FF, Naxerova K, Schloss MJ, Hulsmans M, Nair AV, Dutta P, Calcagno DM, Herisson F, Anzai A, Sun Y, Wojtkiewicz G, Rohde D, Frodermann V, Vandoorne K, Courties G, Iwamoto Y, Garris CS, Williams DL, Breton S, Brown D, Whalen M, Libby P, Pittet MJ, King KR, Weissleder R, Swirski FK & Nahrendorf M (2019) Tissue-Specific Macrophage Responses to Remote Injury Impact the Outcome of Subsequent Local Immune Challenge. *Immunity* 51, 899-914.e7.
- Hu M, Lu Y, Zeng H, Zhang Z, Chen S, Qi Y, Xu Y, Chen F, Tang Y, Chen M, Du C, Shen M, Wang F, Su Y, Wang S & Wang J (2021) MicroRNA-21 maintains hematopoietic stem cell homeostasis through sustaining the NF- κ B signaling pathway in mice. *Haematologica* 106, 412–423.
- Huang SC-C, Everts B, Ivanova Y, O’Sullivan D, Nascimento M, Smith AM, Beatty W, Love-Gregory L, Lam WY, O’Neill CM, Yan C, Du H, Abumrad NA, Urban JF, Artyomov MN, Pearce EL & Pearce EJ (2014) Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. *Nat Immunol* 15, 846–855.
- Hulsmans M, Clauss S, Xiao L, Aguirre AD, King KR, Hanley A, Hucker WJ, Wülfers EM, Seemann G, Courties G, Iwamoto Y, Sun Y, Savol AJ, Sager HB, Lavine KJ, Fishbein GA, Capen DE, Silva ND, Miquerol L, Wakimoto H, Seidman CE, Seidman JG, Sadreyev RI, Naxerova K, Mitchell RN, Brown D, Libby P, Weissleder R, Swirski FK, Kohl P, Vinegoni C, Milan DJ, Ellinor PT & Nahrendorf M (2017) Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart. *Cell* 169, 510-522.e20.
- von Hundelshausen P, Weber KS, Huo Y, Proudfoot AE, Nelson PJ, Ley K & Weber C (2001) RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation* 103, 1772–1777.
- Ikuta K & Weissman IL (1992) Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1502–1506.
- Illingworth CM (1974) Trapped fingers and amputated finger tips in children. *Journal of Pediatric Surgery* 9, 853–858.
- Imani Fooladi AA, Mousavi SF, Seghatoleslami S, Yazdani S & Nourani MR (2011) Toll-like receptors: role of inflammation and commensal bacteria. *Inflamm Allergy Drug Targets* 10, 198–207.
- Ivanovs A, Rybtsov S, Welch L, Anderson RA, Turner ML & Medvinsky A (2011) Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Journal of Experimental Medicine* 208, 2417–2427.
- Jackson SP (2007) The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* 109, 5087–5095.
- Janssen WJ, Barthel L, Muldrow A, Oberley-Deegan RE, Kearns MT, Jakubzick C & Henson PM (2011) Fas determines differential fates of resident and recruited macrophages during resolution of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 184, 547–560.

- Jenkins SJ, Ruckerl D, Thomas GD, Hewitson JP, Duncan S, Brombacher F, Maizels RM, Hume DA & Allen JE (2013) IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond homeostatic levels controlled by CSF-1. *J Exp Med* 210, 2477–2491.
- Jha AK, Huang SC-C, Sergushichev A, Lampropoulou V, Ivanova Y, Loginicheva E, Chmielewski K, Stewart KM, Ashall J, Everts B, Pearce EJ, Driggers EM & Artyomov MN (2015) Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity* 42, 419–430.
- Julien E, El Omar R & Tavian M (2016) Origin of the hematopoietic system in the human embryo. *FEBS Letters* 590, 3987–4001.
- Julier Z, Park AJ, Briquez PS & Martino MM (2017) Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. *Acta Biomaterialia* 53, 13–28.
- Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G-I, De los Santos K, Sparwasser T, Wu S, Vuthoori S, Ko K, Zavala F, Pamer EG, Littman DR & Lang RA (2002) In Vivo Depletion of CD11c+ Dendritic Cells Abrogates Priming of CD8+ T Cells by Exogenous Cell-Associated Antigens. *Immunity* 17, 211–220.
- Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, Mosekilde L, Steiniche T & Kassem M (2001) Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis.
- Kadereit B, Kumar P, Wang W-J, Miranda D, Snapp EL, Severina N, Torregroza I, Evans T & Silver DL (2008) Evolutionarily conserved gene family important for fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 94–99.
- Kadomoto S, Izumi K & Mizokami A (2022) Macrophage Polarity and Disease Control. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 144.
- Kain V, Prabhu SD & Halade GV (2014) Inflammation revisited: inflammation versus resolution of inflammation following myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 109, 444.
- Kangale LJ, Raoult D, Fournier P-E, Abnave P & Ghigo E (2021) Planarians (Platyhelminthes)—An Emerging Model Organism for Investigating Innate Immune Mechanisms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.619081> [Accessed December 22, 2022].
- Kapur SK & Katz AJ (2013) Review of the adipose derived stem cell secretome. *Biochimie* 95, 2222–2228.
- Karina, Pawitan JA & Rosadi I (2020) Adipose-derived stem cells and their microenvironment (Niche) in type 2 diabetes mellitus. *Stem Cell Investigation* 7. Available at: <https://sci.amegroups.com/article/view/36473> [Accessed December 27, 2022].
- Katayama Y, Battista M, Kao W-M, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA & Frenette PS (2006) Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* 124, 407–421.
- Kawai T & Akira S (2009) The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* 21, 317–337.

- Kieusseian A, de la Grange PB, Burlen-Defranoux O, Godin I & Cumano A (2012) Immature hematopoietic stem cells undergo maturation in the fetal liver. *Development* 139, 3521–3530.
- Kilroy GE, Foster SJ, Wu X, Ruiz J, Sherwood S, Heifetz A, Ludlow JW, Stricker DM, Potiny S, Green P, Halvorsen Y-DC, Cheatham B, Storms RW & Gimble JM (2007) Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: Expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *Journal of Cellular Physiology* 212, 702–709.
- Kono H, Onda A & Yanagida T (2014) Molecular determinants of sterile inflammation. *Current Opinion in Immunology* 26, 147–156.
- Kotani M, Kikuta J, Klauschen F, Chino T, Kobayashi Y, Yasuda H, Tamai K, Miyawaki A, Kanagawa O, Tomura M & Ishii M (2013) Systemic Circulation and Bone Recruitment of Osteoclast Precursors Tracked by Using Fluorescent Imaging Techniques. *The Journal of Immunology* 190, 605–612.
- Kotton DN, Fabian AJ & Mulligan RC (2005) A novel stem-cell population in adult liver with potent hematopoietic-reconstitution activity. *Blood* 106, 1574–1580.
- Kovtonyuk LV, Fritsch K, Feng X, Manz MG & Takizawa H (2016) Inflamm-Aging of Hematopoiesis, Hematopoietic Stem Cells, and the Bone Marrow Microenvironment. *Frontiers in Immunology* 7. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5107568/> [Accessed February 17, 2023].
- Krafts KP (2010) Tissue repair. *Organogenesis* 6, 225–233.
- Kratofil RM, Kubes P & Deniset JF (2017) Monocyte Conversion During Inflammation and Injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 37, 35–42.
- Krishnan S, Wemyss K, Prise IE, McClure FA, O’Boyle C, Bridgeman HM, Shaw TN, Grainger JR & Konkel JE (2021) Hematopoietic stem and progenitor cells are present in healthy gingiva tissue. *J Exp Med* 218, e20200737.
- Kumaravelu P, Hook L, Morrison AM, Ure J, Zhao S, Zuyev S, Ansell J & Medvinsky A (2002) Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development* 129, 4891–4899.
- Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, Ahmed J, Pinho S, Zhang D, Mizoguchi T, Wei Q, Lucas D, Ito K, Mar JC, Bergman A & Frenette PS (2013) Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* 502, 637–643.
- van de Laar L, Saelens W, De Prijck S, Martens L, Scott CL, Van Isterdael G, Hoffmann E, Beyaert R, Saey Y, Lambrecht BN & Guilliams M (2016) Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* 44, 755–768.
- Labit E, Rabiller L, Rampon C, Guissard C, André M, Barreau C, Cousin B, Carrière A, Eddine MA, Pipy B, Pénicaud L, Lorsignol A, Vríz S, Dromard C & Casteilla L (2018) Opioids prevent regeneration in adult mammals through inhibition of ROS production. *Sci Rep* 8, 12170.

- Lai AY & Kondo M (2006) Asymmetrical lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *J Exp Med* 203, 1867–1873.
- Lai AY, Lin SM & Kondo M (2005) Heterogeneity of Flt3-expressing multipotent progenitors in mouse bone marrow. *J Immunol* 175, 5016–5023.
- Landén NX, Li D & Ståhle M (2016) Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol Life Sci* 73, 3861–3885.
- Laskin DL, Sunil VR, Fakhrzadeh L, Groves A, Gow AJ & Laskin JD (2010) Macrophages, reactive nitrogen species, and lung injury. *Ann N Y Acad Sci* 1203, 60–65.
- Lauber K, Bohn E, Kröber SM, Xiao Y, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S, Xu Y, Autenrieth IB, Schulze-Osthoff K, Belka C, Stuhler G & Wesselborg S (2003) Apoptotic Cells Induce Migration of Phagocytes via Caspase-3-Mediated Release of a Lipid Attraction Signal. *Cell* 113, 717–730.
- Laurenti E & Göttgens B (2018) From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature* 553, 418–426.
- Lauterbach MA, Hanke JE, Serefidou M, Mangan MSJ, Kolbe C-C, Hess T, Rothe M, Kaiser R, Hoss F, Gehlen J, Engels G, Kreutzenbeck M, Schmidt SV, Christ A, Imhof A, Hiller K & Latz E (2019) Toll-like Receptor Signaling Rewires Macrophage Metabolism and Promotes Histone Acetylation via ATP-Citrate Lyase. *Immunity* 51, 997-1011.e7.
- Lavin Y, Mortha A, Rahman A & Merad M (2015) Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol* 15, 731–744.
- Lavin Y, Winter D, Blecher-Gonen R, David E, Keren-Shaul H, Merad M, Jung S & Amit I (2014) Tissue-Resident Macrophage Enhancer Landscapes Are Shaped by the Local Microenvironment. *Cell* 159, 1312–1326.
- Lechman ER, Gentner B, van Galen P, Giustacchini A, Saini M, Boccalatte FE, Hiramatsu H, Restuccia U, Bachi A, Voisin V, Bader GD, Dick JE & Naldini L (2012) Attenuation of miR-126 Activity Expands HSC In Vivo without Exhaustion. *Cell Stem Cell* 11, 799–811.
- Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Kotliansky V, Shipley JM, Gotwals P, Noble P, Chen Q, Senior RM & Elias JA (2001) Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med* 194, 809–821.
- Lee CZW & Ginhoux F (2022) Biology of resident tissue macrophages. *Development* 149, dev200270.
- Lee KY (2019) M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review. *Med Biol Sci Eng* 2, 1–5.
- Lee MS & Kim Y-J (2007) Signaling Pathways Downstream of Pattern-Recognition Receptors and Their Cross Talk. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 447–480.
- Lee S, Islam MN, Boostanpour K, Aran D, Jin G, Christenson S, Matthay MA, Eckalbar WL, DePianto DJ, Arron JR, Magee L, Bhattacharya S, Matsumoto R, Kubota M, Farber DL, Bhattacharya J, Wolters PJ & Bhattacharya M (2021) Molecular programs of fibrotic change in aging human lung. *Nat Commun* 12, 6309.

- Lefterovich JM, Bedelbaeva K, Samulewicz S, Zhang X-M, Zwas D, Lankford EB & Heber-Katz E (2001) Heart regeneration in adult MRL mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 9830–9835.
- Lefrançois E, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, Thornton EE, Headley MB, David T, Coughlin SR, Krummel MF, Leavitt AD, Passegué E & Looney MR (2017) The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for hematopoietic progenitors. *Nature* 544, 105–109.
- Leuschner F, Rauch PJ, Ueno T, Gorbato R, Marinelli B, Lee WW, Dutta P, Wei Y, Robbins C, Iwamoto Y, Sena B, Chudnovskiy A, Panizzi P, Keliher E, Higgins JM, Libby P, Moskowitz MA, Pittet MJ, Swirski FK, Weissleder R & Nahrendorf M (2012) Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. *J Exp Med* 209, 123–137.
- Lévesque JP, Takamatsu Y, Nilsson SK, Haylock DN & Simmons PJ (2001) Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 98, 1289–1297.
- Li D & Wu M (2021) Pattern recognition receptors in health and diseases. *Sig Transduct Target Ther* 6, 1–24.
- Li J, Tan J, Martino MM & Lui KO (2018) Regulatory T-Cells: Potential Regulator of Tissue Repair and Regeneration. *Frontiers in Immunology* 9. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00585> [Accessed December 26, 2022].
- Lin S-L, Li B, Rao S, Yeo E-J, Hudson TE, Nowlin BT, Pei H, Chen L, Zheng JJ, Carroll TJ, Pollard JW, McMahon AP, Lang RA & Duffield JS (2010) Macrophage Wnt7b is critical for kidney repair and regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 4194–4199.
- Liu Y, Elf SE, Miyata Y, Sashida G, Liu Y, Huang G, Di Giandomenico S, Lee JM, Deblasio A, Menendez S, Antipin J, Reva B, Koff A & Nimer SD (2009) p53 Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence. *Cell Stem Cell* 4, 37–48.
- Liu Y-C, Zou X-B, Chai Y-F & Yao Y-M (2014) Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases. *International Journal of Biological Sciences* 10, 520–529.
- Locati M, Curtale G & Mantovani A (2020) Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annu Rev Pathol* 15, 123–147.
- Lu H, Huang D, Saederup N, Charo IF, Ransohoff RM & Zhou L (2011) Macrophages recruited via CCR2 produce insulin-like growth factor-1 to repair acute skeletal muscle injury. *FASEB J* 25, 358–369.
- Lu I-N, Dobersalske C, Rauschenbach L, Teuber-Hanselmann S, Steinbach A, Ullrich V, Prasad S, Blau T, Kebir S, Siveke JT, Becker JC, Sure U, Glas M, Scheffler B & Cima I (2021) Tumor-associated hematopoietic stem and progenitor cells positively linked to glioblastoma progression. *Nat Commun* 12, 3895.
- Lubbers R, van Essen MF, van Kooten C & Trouw LA (2017) Production of complement components by cells of the immune system. *Clin Exp Immunol* 188, 183–194.

- Lucas D (2021) Structural organization of the bone marrow and its role in hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* 28, 36–42.
- Lucas T, Waisman A, Ranjan R, Roes J, Krieg T, Müller W, Roers A & Eming SA (2010) Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair. *The Journal of Immunology* 184, 3964–3977.
- Luche E, Robert V, Cuminetti V, Pomié C, Sastourné-Arrey Q, Waget A, Arnaud E, Varin A, Labit E, Laharrague P, Burcelin R, Casteilla L & Cousin B (2017) Corrupted adipose tissue endogenous myelopoiesis initiates diet-induced metabolic disease. *eLife Sciences* 6, e23194.
- Luche E, Sengenès C, Arnaud E, Laharrague P, Casteilla L & Cousin B (2015) Differential Hematopoietic Activity in White Adipose Tissue Depending on its Localization. *J Cell Physiol* 230, 3076–3083.
- Lumeng CN, DelProposto JB, Westcott DJ & Saltiel AR (2008) Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes* 57, 3239–3246.
- Lumeng CN, Liu J, Geletka L, Delaney C, DelProposto J, Desai A, Oatmen K, Martinez-Santibanez G, Julius A, Garg S & Yung RL (2011) Aging is associated with an increase in T cells and inflammatory macrophages in visceral adipose tissue. *J Immunol* 187, 6208–6216.
- Luo D, Lin S, Parent MA, Kanevsky IM, Szaba FM, Kummer LW, Duso DK, Tighe M, Hill J, Gruber A, Mackman N, Gailani D & Smiley ST (2013) Fibrin facilitates both innate and T cell-mediated defense against *Yersinia pestis*. *J Immunol* 190, 4149–4161.
- Luo M, Lai W, He Z & Wu L (2021) Development of an Optimized Culture System for Generating Mouse Alveolar Macrophage-like Cells. *The Journal of Immunology* 207, 1683–1693.
- Luong Q, Huang J & Lee KY (2019) Deciphering White Adipose Tissue Heterogeneity. *Biology* 8, 23.
- Mandel J, Casari M, Stepanyan M, Martyanov A & Deppermann C (2022) Beyond Hemostasis: Platelet Innate Immune Interactions and Thromboinflammation. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 3868.
- Marí-Beffa M, Santamaría JA, Murciano C, Santos-Ruiz L, Andrades JA, Guerado E & Becerra J (2007) Zebrafish Fins as a Model System for Skeletal Human Studies. *The Scientific World JOURNAL* 7, 1114–1127.
- Masamoto Y, Arai S, Sato T, Kubota N, Takamoto I, Kadowaki T & Kurokawa M (2017) Adiponectin Enhances Quiescence Exit of Murine Hematopoietic Stem Cells and Hematopoietic Recovery Through mTORC1 Potentiation. *Stem Cells* 35, 1835–1848.
- Mass E, Ballesteros I, Farlik M, Halbritter F, Günther P, Crozet L, Jacome-Galarza CE, Händler K, Klughammer J, Kobayashi Y, Gomez-Perdiguero E, Schultze JL, Beyer M, Bock C & Geissmann F (2016) Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science* 353, aaf4238.
- Matsumoto A, Takeishi S, Kanie T, Susaki E, Onoyama I, Tateishi Y, Nakayama K & Nakayama KI (2011) p57 Is Required for Quiescence and Maintenance of Adult Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 9, 262–271.

- Matsuoka T, Hirata M, Tanaka H, Takahashi Y, Murata T, Kabashima K, Sugimoto Y, Kobayashi T, Ushikubi F, Aze Y, Eguchi N, Urade Y, Yoshida N, Kimura K, Mizoguchi A, Honda Y, Nagai H & Narumiya S (2000) Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma. *Science* 287, 2013–2017.
- McKay RM, McKay JP, Avery L & Graff JM (2003) *C. elegans*: A Model for Exploring the Genetics of Fat Storage. *Developmental Cell* 4, 131–142.
- McKinney-Freeman SL, Majka SM, Jackson KA, Norwood K, Hirschi KK & Goodell MA (2003) Altered phenotype and reduced function of muscle-derived hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 31, 806–814.
- Mende N & Laurenti E (2021) Hematopoietic stem and progenitor cells outside the bone marrow: where, when, and why. *Experimental Hematology* 104, 9–16.
- Merad M, Manz MG, Karsunky H, Wagers A, Peters W, Charo I, Weissman IL, Cyster JG & Engleman EG (2002) Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* 3, 1135–1141.
- Metcalf D (2008) Hematopoietic cytokines. *Blood* 111, 485–491.
- Metchnikoff E (1892) *Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation: faites à l'Institut Pasteur en avril et mai 1891*, G. Masson.
- Migliaccio G, Migliaccio AR, Petti S, Mavilio F, Russo G, Lazzaro D, Testa U, Marinucci M & Peschle C (1986) Human embryonic hemopoiesis. Kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac----liver transition. *J. Clin. Invest.* 78, 51–60.
- Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ & Hill AM (2000) M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm1. *The Journal of Immunology* 164, 6166–6173.
- Min C, Park J, Kim G, Moon H, Lee S-A, Kim D, Moon B, Yang S, Lee J, Kim K, Cho H, Park J, Lee D-H, Lee G & Park D (2020) Tim-4 functions as a scavenger receptor for phagocytosis of exogenous particles. *Cell Death Dis* 11, 1–10.
- Miron VE, Boyd A, Zhao J-W, Yuen TJ, Ruckh JM, Shadrach JL, van Wijngaarden P, Wagers AJ, Williams A, Franklin RJM & ffrench-Constant C (2013) M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci* 16, 1211–1218.
- Molawi K, Wolf Y, Kandalla PK, Favret J, Hagemeyer N, Frenzel K, Pinto AR, Klapproth K, Henri S, Malissen B, Rodewald H-R, Rosenthal NA, Bajenoff M, Prinz M, Jung S & Sieweke MH (2014) Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. *J. Exp. Med.* 211, 2151–2158.
- Morioka S, Perry JSA, Raymond MH, Medina CB, Zhu Y, Zhao L, Serbulea V, Onengut-Gumuscu S, Leitinger N, Kucenas S, Rathmell JC, Makowski L & Ravichandran KS (2018) Efferocytosis induces a novel SLC program to promote glucose uptake and lactate release. *Nature* 563, 714–718.
- Morita Y, Iseki A, Okamura S, Suzuki S, Nakauchi H & Ema H (2011) Functional characterization of hematopoietic stem cells in the spleen. *Exp Hematol* 39, 351-359.e3.

- Morrison SJ & Scadden DT (2014) The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505, 327–334.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA & Coffman RL (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology* 136, 2348–2357.
- Mossadegh-Keller N, Sarrazin S, Kandalla PK, Espinosa L, Stanley ER, Nutt SL, Moore J & Sieweke MH (2013) M-CSF instructs myeloid lineage fate in single haematopoietic stem cells. *Nature* 497, 239–243.
- Mosser DM, Hamidzadeh K & Goncalves R (2021) Macrophages and the maintenance of homeostasis. *Cell Mol Immunol* 18, 579–587.
- Mounier R, Théret M, Arnold L, Cuvellier S, Bultot L, Göransson O, Sanz N, Ferry A, Sakamoto K, Foretz M, Viollet B & Chazaud B (2013) AMPK α 1 regulates macrophage skewing at the time of resolution of inflammation during skeletal muscle regeneration. *Cell Metab* 18, 251–264.
- Mouton AJ, DeLeon-Pennell KY, Rivera Gonzalez OJ, Flynn ER, Freeman TC, Saucerman JJ, Garrett MR, Ma Y, Harmancey R & Lindsey ML (2018) Mapping macrophage polarization over the myocardial infarction time continuum. *Basic Res Cardiol* 113, 26.
- Mu X, Fan H, Wang P, Li Y, Domenico K, Li Q, Wang X, Essandoh K, Chen J, Peng T & Fan G-C (2021) Sectm1a Facilitates Protection against Inflammation-Induced Organ Damage through Promoting TRM Self-Renewal. *Mol Ther* 29, 1294–1311.
- Munder M, Eichmann K, Morán JM, Centeno F, Soler G & Modolell M (1999) Th1/Th2-Regulated Expression of Arginase Isoforms in Murine Macrophages and Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 163, 3771–3777.
- Murphy K (Kenneth M) (2012) *Janeway's immunobiology*, New York : Garland Science. Available at: <http://archive.org/details/janewaysimmunobi0000murp> [Accessed February 22, 2023].
- Murray PJ (2016) Macrophage Polarization. *annual review of physiology* 79:541-566.
- Murray PJ & Wynn TA (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11, 723–737.
- Myers CL, Wertheimer SJ, Schembri-King J, Parks T & Wallace RW (1992) Induction of ICAM-1 by TNF-alpha, IL-1 beta, and LPS in human endothelial cells after downregulation of PKC. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 263, C767–C772.
- Naeini MB, Bianconi V, Pirro M & Sahebkar A (2020) The role of phosphatidylserine recognition receptors in multiple biological functions. *Cellular & Molecular Biology Letters* 25, 23.
- Nahrendorf M & Swirski FK (2016) Abandoning M1/M2 for a Network Model of Macrophage Function. *Circ Res* 119, 414–417.
- Naik SH, Perié L, Swart E, Gerlach C, van Rooij N, de Boer RJ & Schumacher TN (2013) Diverse and heritable lineage imprinting of early haematopoietic progenitors. *Nature* 496, 229–232.

- Nakao N, Nakayama T, Yahata T, Muguruma Y, Saito S, Miyata Y, Yamamoto K & Naoe T (2010) Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Facilitate Hematopoiesis in Vitro and in Vivo. *Am J Pathol* 177, 547–554.
- Nakatani Y, Kawakami A & Kudo A (2007) Cellular and molecular processes of regeneration, with special emphasis on fish fins. *Development, Growth & Differentiation* 49, 145–154.
- Nathan C & Cunningham-Bussel A (2013) Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol* 13, 349–361.
- Nedvídková J, Smitka K, Kopský V & Hainer V (2005) Adiponectin, an adipocyte-derived protein. *Physiol Res*, 133–140.
- Ngkelo A, Richart A, Kirk JA, Bonnin P, Vilar J, Lemitre M, Marck P, Branchereau M, Le Gall S, Renault N, Guerin C, Ranek MJ, Kervadec A, Danelli L, Gautier G, Blank U, Launay P, Camerer E, Bruneval P, Menasche P, Heymes C, Luche E, Casteilla L, Cousin B, Rodewald H-R, Kass DA & Silvestre J-S (2016) Mast cells regulate myofilament calcium sensitization and heart function after myocardial infarction. *J. Exp. Med.* 213, 1353–1374.
- Nicholson LB (2016) The immune system. *Essays in Biochemistry* 60, 275–301.
- Ogawa K, Tsurutani M, Hashimoto A & Soeda M (2019) Simple propagation method for resident macrophages by co-culture and subculture, and their isolation from various organs. *BMC Immunol* 20, 34.
- Oguro H, Ding L & Morrison SJ (2013) SLAM family markers resolve functionally distinct subpopulations of hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. *Cell Stem Cell* 13, 102–116.
- Okabe Y & Medzhitov R (2016) Tissue biology perspective on macrophages. *Nat Immunol* 17, 9–17.
- de Oliveira S, Rosowski EE & Huttenlocher A (2016) Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat Rev Immunol* 16, 378–391.
- Olsson A, Venkatasubramanian M, Chaudhri VK, Aronow BJ, Salomonis N, Singh H & Grimes HL (2016) Single-cell analysis of mixed-lineage states leading to a binary cell fate choice. *Nature* 537, 698–702.
- Orkin SH (1995) Hematopoiesis: how does it happen? *Current Opinion in Cell Biology* 7, 870–877.
- Orkin SH & Zon LI (2008) Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell* 132, 631–644.
- Ortega-Gómez A, Perretti M & Soehnlein O (2013) Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med* 5, 661–674.
- Osawa M, Hanada K, Hamada H & Nakauchi H (1996) Long-Term Lymphohematopoietic Reconstitution by a Single CD34-Low/Negative Hematopoietic Stem Cell. *Science* 273, 242–245.
- Ou M-Y, Zhang H, Tan P-C, Zhou S-B & Li Q-F (2022) Adipose tissue aging: mechanisms and therapeutic implications. *Cell Death Dis* 13, 300.

- Palis J (2016) Hematopoietic stem cell-independent hematopoiesis: emergence of erythroid, megakaryocyte, and myeloid potential in the mammalian embryo. *FEBS Letters* 590, 3965–3974.
- Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C & Keller G (1999) Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 126, 5073–5084.
- Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D & Gross CT (2011) Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science* 333, 1456–1458.
- Parish CL, Beljajeva A, Arenas E & Simon A (2007) Midbrain dopaminergic neurogenesis and behavioural recovery in a salamander lesion-induced regeneration model. *Development* 134, 2881–2887.
- Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR & Gan W-B (2013) Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell* 155, 1596–1609.
- Parkin J & Cohen B (2001) An overview of the immune system. *The Lancet* 357, 1777–1789.
- Passegué E, Jamieson CHM, Ailles LE & Weissman IL (2003) Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 11842–11849.
- Patel AA, Zhang Y, Fullerton JN, Boelen L, Rongvaux A, Maini AA, Bigley V, Flavell RA, Gilroy DW, Asquith B, Macallan D & Yona S (2017) The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J Exp Med* 214, 1913–1923.
- Paupert J, Espinosa E, Cenac N, Robert V, Laharrague P, Evrard SM, Casteilla L, Lorsignol A & Cousin B (2018) Rapid and Efficient Production of Human Functional Mast Cells through a Three-Dimensional Culture of Adipose Tissue-Derived Stromal Vascular Cells. *J. Immunol.* 201, 3815–3821.
- Peiris TH, Hoyer KK & Oviedo NJ (2014) Innate immune system and tissue regeneration in planarians: an area ripe for exploration. *Semin. Immunol.* 26, 295–302.
- Periayah MH, Halim AS & Mat Saad AZ (2017) Mechanism Action of Platelets and Crucial Blood Coagulation Pathways in Hemostasis. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 11, 319–327.
- Perié L & Duffy KR (2016) Retracing the in vivo haematopoietic tree using single-cell methods. *FEBS Letters* 590, 4068–4083.
- Pessoa Rodrigues C & Akhtar A (2021) Differential H4K16ac levels ensure a balance between quiescence and activation in hematopoietic stem cells. *Science Advances* 7, eabi5987.
- Petrie TA, Strand NS, Yang C-T, Rabinowitz JS & Moon RT (2015) Macrophages modulate adult zebrafish tail fin regeneration. *Development* 142, 406–406.
- Peyssonnaud C, Datta V, Cramer T, Doedens A, Theodorakis EA, Gallo RL, Hurtado-Ziola N, Nizet V & Johnson RS (2005) HIF-1 α expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest* 115, 1806–1815.

- Poglio S, Toni FD, Lewandowski D, Minot A, Arnaud E, Barroca V, Laharrague P, Casteilla L & Cousin B (2012) In situ production of innate immune cells in murine white adipose tissue. *Blood* 120, 4952–4962.
- Poglio S, Toni-Costes FD, Arnaud E, Laharrague P, Espinosa E, Casteilla L & Cousin B (2010) Adipose tissue as a dedicated reservoir of functional mast cell progenitors. *Stem cells* 28, 2065–2072.
- Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN & Sadek HA (2011) Transient Regenerative Potential of the Neonatal Mouse Heart. *Science* 331, 1078–1080.
- Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Johnson BA, Grinsfelder D, Canseco D, Mammen PP, Rothermel BA, Olson EN & Sadek HA (2013) Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 187–192.
- Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, André M, Pénicaud L & Casteilla L (2006) From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Exp. Cell Res.* 312, 727–736.
- Quinton LJ, Nelson S, Zhang P, Boé DM, Happel KI, Pan W & Bagby GJ (2004) Selective transport of cytokine-induced neutrophil chemoattractant from the lung to the blood facilitates pulmonary neutrophil recruitment. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 286, L465–L472.
- Rackaityte E & Halkias J (2020) Mechanisms of Fetal T Cell Tolerance and Immune Regulation. *Frontiers in Immunology* 11. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00588> [Accessed December 23, 2022].
- Radbill BD, Gupta R, Ramirez MCM, DiFeo A, Martignetti JA, Alvarez CE, Friedman SL, Narla G, Vrabie R, Bowles R, Saiman Y & Bansal MB (2011) Loss of Matrix Metalloproteinase-2 Amplifies Murine Toxin-Induced Liver Fibrosis by Upregulating Collagen I Expression. *Dig Dis Sci* 56, 406–416.
- Reader J, Holt D & Fulton A (2011) Prostaglandin E2 EP Receptors as Therapeutic Targets in Breast Cancer. *Cancer Metastasis Rev* 30, 449–463.
- Rehwinkel J & Gack MU (2020) RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nat Rev Immunol* 20, 537–551.
- Rekhtman N, Radparvar F, Evans T & Skoultchi AI (1999) Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev* 13, 1398–1411.
- Rieger MA & Schroeder T (2012) Hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a008250.
- Rizzo G, Gropper J, Piollet M, Vafadarnejad E, Rizakou A, Bandi SR, Arampatzi P, Krammer T, DiFabion N, Dietrich O, Arias-Loza AP, Prinz M, Mack M, Schlepckow K, Haass C, Silvestre JS, Zerneck A, Saliba AE & Cochain C (2022) Dynamics of monocyte-derived macrophage diversity in experimental myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, cvac113.
- Robb L (2007) Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene* 26, 6715–6723.

- Robert J & Cohen N (1998) Evolution of immune surveillance and tumor immunity: studies in *Xenopus*. *Immunological Reviews* 166, 231–243.
- Roche PA & Furuta K (2015) The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* 15, 203–216.
- Rodríguez-Prados J-C, Través PG, Cuenca J, Rico D, Aragonés J, Martín-Sanz P, Cascante M & Boscá L (2010) Substrate Fate in Activated Macrophages: A Comparison between Innate, Classic, and Alternative Activation. *The Journal of Immunology* 185, 605–614.
- Rogler G & Hausmann M (2017) Factors Promoting Development of Fibrosis in Crohn’s Disease. *Frontiers in Medicine* 4. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2017.00096> [Accessed December 23, 2022].
- Rollins-Smith LA (1998) Metamorphosis and the amphibian immune system. *Immunological Reviews* 166, 221–230.
- Ruggeri ZM (2007) The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thromb Res* 120, S5–S9.
- Russo L & Lumeng CN (2018) Properties and functions of adipose tissue macrophages in obesity. *Immunology* 155, 407–417.
- Saclier M, Yacoub-Youssef H, Mackey AL, Arnold L, Ardjoune H, Magnan M, Sailhan F, Chelly J, Pavlath GK, Mounier R, Kjaer M & Chazaud B (2013) Differentially Activated Macrophages Orchestrate Myogenic Precursor Cell Fate During Human Skeletal Muscle Regeneration. *Stem Cells* 31, 384–396.
- Sahni A, Odrlijić T & Francis CW (1998) Binding of Basic Fibroblast Growth Factor to Fibrinogen and Fibrin*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 7554–7559.
- Sancho D & Reis e Sousa C (2012) Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. *Annu Rev Immunol* 30, 491–529.
- Sansbury BE & Spite M (2016) Resolution of Acute Inflammation and the Role of Resolvins in Immunity, Thrombosis, and Vascular Biology. *Circ Res* 119, 113–130.
- Sattler S & Rosenthal N (2016) The neonate versus adult mammalian immune system in cardiac repair and regeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863, 1813–1821.
- Sawant KV, Sepuru KM, Lowry E, Penaranda B, Frevert CW, Garofalo RP & Rajarathnam K (2021) Neutrophil recruitment by chemokines Cxcl1/KC and Cxcl2/MIP2: Role of Cxcr2 activation and glycosaminoglycan interactions. *Journal of Leukocyte Biology* 109, 777–791.
- Scaffidi P, Misteli T & Bianchi ME (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418, 191–195.
- Schaum N, Lehallier B, Hahn O, Hosseinzadeh S, Lee SE, Sit R, Lee DP, Losada PM, Zardeneta ME, Pálóvcics R, Fehlmann T, Webber J, McGeever A, Zhang H, Berdnik D, Tan W, Zee A, Tan M, Consortium TTM, Pisco A, Karkanas J, Neff NF, Keller A, Darmanis S, Quake SR & Wyss-

- Coray T (2019) The murine transcriptome reveals global aging nodes with organ-specific phase and amplitude. *bioRxiv*, 662254.
- Scheller EL, Doucette CR, Learman BS, Cawthorn WP, Khandaker S, Schell B, Wu B, Ding S-Y, Bredella MA, Fazeli PK, Khoury B, Jepsen KJ, Pilch PF, Klibanski A, Rosen CJ & MacDougald OA (2015) Region-specific variation in the properties of skeletal adipocytes reveals regulated and constitutive marrow adipose tissues. *Nat Commun* 6, 7808.
- Schmauck-Medina T, Molière A, Lautrup S, Zhang J, Chlopicki S, Madsen HB, Cao S, Soendenbroe C, Mansell E, Vestergaard MB, Li Z, Shiloh Y, Opresko PL, Egly J-M, Kirkwood T, Verdin E, Bohr VA, Cox LS, Stevnsner T, Rasmussen LJ & Fang EF (2022) New hallmarks of ageing: a 2022 Copenhagen ageing meeting summary. *Aging (Albany NY)* 14, 6829–6839.
- Schwab JM, Chiang N, Arita M & Serhan CN (2007) Resolvin E1 and Protectin D1 Activate Inflammation-Resolution Programs. *Nature* 447, 869–874.
- Scott CL, Zheng F, De Baetselier P, Martens L, Saeys Y, De Prijck S, Lippens S, Abels C, Schoonooghe S, Raes G, Devoogdt N, Lambrecht BN, Beschin A & Guillemins M (2016) Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nat Commun* 7, 10321.
- Seifert AW, Kiama SG, Seifert MG, Goheen JR, Palmer TM & Maden M (2012) Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*). *Nature* 489, 561–565.
- Seita J & Weissman IL (2010) Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2, 640–653.
- Serhan CN & Savill J (2005) Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 6, 1191–1197.
- Serrano-Lopez J, Hegde S, Kumar S, Serrano J, Fang J, Wellendorf AM, Roche PA, Rangel Y, Carrington LJ, Geiger H, Grimes HL, Luther S, Maillard I, Sanchez-Garcia J, Starczynowski DT & Cancelas JA (2021) Inflammation rapidly recruits mammalian GMP and MDP from bone marrow into regional lymphatics. *Elife* 10, e66190.
- Shahbazian LM, Quinton LJ, Bagby GJ, Nelson S, Wang G & Zhang P (2004) *Escherichia coli* pneumonia enhances granulopoiesis and the mobilization of myeloid progenitor cells into the systemic circulation. *Crit Care Med* 32, 1740–1746.
- Shen F-H, Wang S-W, Yeh T-M, Tung Y-Y, Hsu S-M & Chen S-H (2013) Absence of CXCL10 Aggravates Herpes Stromal Keratitis with Reduced Primary Neutrophil Influx in Mice. *J Virol* 87, 8502–8510.
- Shimokado K, Raines EW, Madtes DK, Barrett TB, Benditt EP & Ross R (1985) A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell* 43, 277–286.
- Shin JY, Hu W, Naramura M & Park CY (2014) High c-Kit expression identifies hematopoietic stem cells with impaired self-renewal and megakaryocytic bias. *J Exp Med* 211, 217–231.
- Shook BA, Wasko RR, Mano O, Rutenberg-Schoenberg M, Rudolph MC, Zarak B, Rivera-Gonzalez GC, López-Giráldez F, Zarini S, Rezza A, Clark DA, Rendl M, Rosenblum MD, Gerstein MB & Horsley V (2020) Dermal adipocyte lipolysis and myofibroblast conversion are required for efficient skin repair. *Cell Stem Cell* 26, 880-895.e6.

- Sica A & Mantovani A (2012) Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122, 787–795.
- Spangrude GJ, Heimfeld S & Weissman IL (1988) Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241, 58–62.
- Stanley ER, Hansen G, Woodcock J & Metcalf D (1975) Colony stimulating factor and the regulation of granulopoiesis and macrophage production. *Fed Proc* 34, 2272–2278.
- Starr ME, Evers BM & Saito H (2009) Age-Associated Increase in Cytokine Production During Systemic Inflammation: Adipose Tissue as a Major Source of IL-6. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 64A, 723–730.
- Stein M, Keshav S, Harris N & Gordon S (1992) Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 176, 287–292.
- Stout MB, Justice JN, Nicklas BJ & Kirkland JL (2017) Physiological Aging: Links Among Adipose Tissue Dysfunction, Diabetes, and Frailty. *Physiology (Bethesda)* 32, 9–19.
- Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O & Michalek J (2012) Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev* 21, 2724–2752.
- Su B & O'Connor J (2013) NSAID Therapy Effects on Healing of Bone, Tendon, and the Enthesis. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 115.
- Suganami T & Ogawa Y (2010) Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol* 88, 33–39.
- Suzuki N, Ohneda O, Minegishi N, Nishikawa M, Ohta T, Takahashi S, Engel JD & Yamamoto M (2006) Combinatorial Gata2 and Sca1 expression defines hematopoietic stem cells in the bone marrow niche. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2202–2207.
- Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo J-L, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E, Mempel TR, Libby P, Weissleder R & Pittet MJ (2009) Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. *Science* 325, 612–616.
- Taban Q, Mumtaz PT, Masoodi KZ, Haq E & Ahmad SM (2022) Scavenger receptors in host defense: from functional aspects to mode of action. *Cell Communication and Signaling* 20, 2.
- Takeuchi O & Akira S (2010) Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, 805–820.
- Takubo K, Nagamatsu G, Kobayashi CI, Nakamura-Ishizu A, Kobayashi H, Ikeda E, Goda N, Rahimi Y, Johnson RS, Soga T, Hirao A, Suematsu M & Suda T (2013) Regulation of Glycolysis by Pdk Functions as a Metabolic Checkpoint for Cell Cycle Quiescence in Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 12, 49–61.
- Tamoutounour S, Williams M, Montanana Sanchis F, Liu H, Terhorst D, Malosse C, Pollet E, Ardouin L, Luche H, Sanchez C, Dalod M, Malissen B & Henri S (2013) Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* 39, 925–938.

- Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ & Lotze MT (2012) PAMPs and DAMPs: signal Os that spur autophagy and immunity. *Immunological Reviews* 249, 158–175.
- Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, Frezza C, Bernard NJ, Kelly B, Foley NH, Zheng L, Gardet A, Tong Z, Jany SS, Corr SC, Haneklaus M, Caffery BE, Pierce K, Walmsley S, Beasley FC, Cummins E, Nizet V, Whyte M, Taylor CT, Lin H, Masters SL, Gottlieb E, Kelly VP, Clish C, Auron PE, Xavier RJ & O'Neill L a. J (2013) Succinate is a danger signal that induces IL-1 β via HIF-1 α . *Nature* 496, 238.
- Tavian M, Coulombel L, Luton D, Clemente HS, Dieterlen-Lièvre F & Péault B (1996) Aorta-Associated CD34+ Hematopoietic Cells in the Early Human Embryo. *Blood* 87, 67–72.
- Tavian M, Robin C, Coulombel L & Péault B (2001) The Human Embryo, but Not Its Yolk Sac, Generates Lympho-Myeloid Stem Cells: Mapping Multipotent Hematopoietic Cell Fate in Intraembryonic Mesoderm. *Immunity* 15, 487–495.
- Thau L, Asuka E & Mahajan K (2022) Physiology, Opsonization. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534215/> [Accessed January 9, 2023].
- Theurl M, Theurl I, Hochegger K, Obrist P, Subramaniam N, van Rooijen N, Schuemann K & Weiss G (2008) Kupffer cells modulate iron homeostasis in mice via regulation of hepcidin expression. *J Mol Med* 86, 825–835.
- Thompson RW, Pesce JT, Ramalingam T, Wilson MS, White S, Cheever AW, Ricklefs SM, Porcella SF, Li L, Ellies LG & Wynn TA (2008) Cationic Amino Acid Transporter-2 Regulates Immunity by Modulating Arginase Activity. *PLoS Pathog* 4, e1000023.
- Trim W, Turner JE & Thompson D (2018) Parallels in Immunometabolic Adipose Tissue Dysfunction with Ageing and Obesity. *Front Immunol* 9, 169.
- Tsai JJ, Dudakov JA, Takahashi K, Shieh J-H, Velardi E, Holland AM, Singer NV, West ML, Smith OM, Young LF, Shono Y, Ghosh A, Hanash AM, Tran HT, Moore MAS & van den Brink MRM (2013) Nrf2 regulates haematopoietic stem cell function. *Nat Cell Biol* 15, 309–316.
- Tsou C-L, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M & Charo IF (2007) Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J. Clin. Invest.* 117, 902–909.
- Tsurutani M, Horie H & Ogawa K (2021) Cell Properties of Lung Tissue-Resident Macrophages Propagated by Co-Culture with Lung Fibroblastic Cells from C57BL/6 and BALB/c Mice. *Biomedicines* 9, 1241.
- Ueno M, Fujita Y, Tanaka T, Nakamura Y, Kikuta J, Ishii M & Yamashita T (2013) Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat Neurosci* 16, 543–551.
- Underhill DM & Goodridge HS (2012) Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol* 12, 492–502.
- Uribe-Querol E & Rosales C (2020) Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Frontiers in Immunology* 11. Available at:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01066> [Accessed November 28, 2022].

- Ussing AP & Rosenkilde P (1995) Effect of Induced Metamorphosis on the Immune System of the Axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *General and Comparative Endocrinology* 97, 308–319.
- Van Lookeren Campagne M, Wiesmann C & Brown EJ (2007) Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cellular Microbiology* 9, 2095–2102.
- Van den Bossche J, Baardman J, Otto NA, van der Velden S, Neele AE, van den Berg SM, Luque-Martin R, Chen H-J, Boshuizen MCS, Ahmed M, Hoeksema MA, de Vos AF & de Winther MPJ (2016) Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. *Cell Reports* 17, 684–696.
- Varga T, Mounier R, Horvath A, Cuvellier S, Dumont F, Poliska S, Ardjoune H, Juban G, Nagy L & Chazaud B (2016) Highly Dynamic Transcriptional Signature of Distinct Macrophage Subsets during Sterile Inflammation, Resolution, and Tissue Repair. *The Journal of Immunology* 196, 4771–4782.
- Varga-Szabo D, Pleines I & Nieswandt B (2008) Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 403–412.
- Wang F, Zhang S, Vuckovic I, Jeon R, Lerman A, Folmes CD, Dzeja PP & Herrmann J (2018) Glycolytic Stimulation is not a Requirement for M2 Macrophage Differentiation. *Cell Metab* 28, 463–475.e4.
- Wang LD & Wagers AJ (2011) Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 643–655.
- Wang P, Mariman E, Renes J & Keijer J (2008) The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *Journal of Cellular Physiology* 216, 3–13.
- Wasnik S, Tiwari A, Kirkland MA & Pande G (2012) Chapter Three - Osteohematopoietic Stem Cell Niches in Bone Marrow. In K. W. Jeon, ed. *International Review of Cell and Molecular Biology*. Academic Press, pp.95–133. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123943095000031> [Accessed December 27, 2022].
- Wculek SK, Dunphy G, Heras-Murillo I, Mastrangelo A & Sancho D (2022) Metabolism of tissue macrophages in homeostasis and pathology. *Cell Mol Immunol* 19, 384–408.
- Wei S, Lightwood D, Ladyman H, Cross S, Neale H, Griffiths M, Adams R, Marshall D, Lawson A, McKnight AJ & Stanley ER (2005) Modulation of CSF-1-regulated post-natal development with anti-CSF-1 antibody. *Immunobiology* 210, 109–119.
- Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL & Ferrante AW (2006) CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 116, 115–124.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL & Ferrante AW (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796–1808.

- Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR & Thompson CB (2009) ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science (New York, N.Y.)* 324, 1076.
- Westerterp M, Gourion-Arsiquaud S, Murphy AJ, Shih A, Cremers S, Levine RL, Tall AR & Yvan-Charvet L (2012) Regulation of hematopoietic stem and progenitor cell mobilization by cholesterol efflux pathways. *Cell Stem Cell* 11, 195–206.
- Wood W, Faria C & Jacinto A (2006) Distinct mechanisms regulate hemocyte chemotaxis during development and wound healing in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* 173, 405–416.
- Wu C, Ning H, Liu M, Lin J, Luo S, Zhu W, Xu J, Wu W-C, Liang J, Shao C-K, Ren J, Wei B, Cui J, Chen M-S & Zheng L (2018) Spleen mediates a distinct hematopoietic progenitor response supporting tumor-promoting myelopoiesis. *J Clin Invest* 128, 3425–3438.
- Wynn TA & Barron L (2010) Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Semin Liver Dis* 30, 245–257.
- Wynn TA & Ramalingam TR (2012a) Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* 18, 1028–1040.
- Wynn TA & Ramalingam TR (2012b) Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* 18, 1028–1040.
- Wynn TA & Vannella KM (2016) Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* 44, 450–462.
- Xu M, Liu PP & Li H (2019) Innate Immune Signaling and Its Role in Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Physiological Reviews* 99, 893–948.
- Yamada T, Park CS, Burns A, Nakada D & Lacorazza HD (2012) The Cytosolic Protein G0S2 Maintains Quiescence in Hematopoietic Stem Cells. *PLOS ONE* 7, e38280.
- Yamamoto R, Morita Y, Ooehara J, Hamanaka S, Onodera M, Rudolph KL, Ema H & Nakauchi H (2013) Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell* 154, 1112–1126.
- Yanagihashi Y, Segawa K, Maeda R, Nabeshima Y & Nagata S (2017) Mouse macrophages show different requirements for phosphatidylserine receptor Tim4 in efferocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 8800–8805.
- Yang L, Bryder D, Adolfsson J, Nygren J, Månsson R, Sigvardsson M & Jacobsen SEW (2005) Identification of Lin[−]Sca1⁺kit⁺CD34⁺Flt3[−] short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood* 105, 2717–2723.
- Yang X, Chen D, Long H & Zhu B (2020) The mechanisms of pathological extramedullary hematopoiesis in diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 77, 2723–2738.
- Yao Y, Xu X-H & Jin L (2019) Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Frontiers in Immunology* 10. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00792> [Accessed December 2, 2022].

- Yeung DKW, Griffith JF, Antonio GE, Lee FKH, Woo J & Leung PC (2005) Osteoporosis is associated with increased marrow fat content and decreased marrow fat unsaturation: A proton MR spectroscopy study. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 22, 279–285.
- Yona S, Kim K-W, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, Strauss-Ayali D, Viukov S, Guillemins M, Misharin A, Hume DA, Perlman H, Malissen B, Zelzer E & Jung S (2013) Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79–91.
- Yongmei Xi YZ (2015) Fat Body Development and its Function in Energy Storage and Nutrient Sensing in *Drosophila melanogaster*. *J Tissue Sci Eng* 06. Available at: <http://omicsonline.org/open-access/fat-body-development-and-its-function-in-energy-storage-and-nutrient-sensing-in-drosophila-melanogaster-2157-7552.1000141.php?aid=36443> [Accessed January 14, 2023].
- Zarbock A, Singbartl K & Ley K (2006) Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *J Clin Invest* 116, 3211–3219.
- Zhang CC & Lodish HF (2008) Cytokines regulating hematopoietic stem cell function. *Curr Opin Hematol* 15, 307–311.
- Zhang D, Leung N, Weber E, Saftig P & Brömme D (2011) The effect of cathepsin K deficiency on airway development and TGF- β 1 degradation. *Respir Res* 12, 72.
- Zhang J, Supakorndej T, Krambs JR, Rao M, Abou-Ezzi G, Ye RY, Li S, Trinkaus K & Link DC (2019) Bone marrow dendritic cells regulate hematopoietic stem/progenitor cell trafficking. *J Clin Invest* 129, 2920–2931.
- Zhang J, Zhou S, Zhou Y, Feng F, Wang Q, Zhu X, Zhao J, Fu H, Lv M, Ai H, Huang X & Zhang X (2016) Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (ADSCs) with the Potential to Ameliorate Platelet Recovery, Enhance Megakaryopoiesis, and Inhibit Apoptosis of Bone Marrow Cells in a Mouse Model of Radiation-Induced Thrombocytopenia. *Cell Transplant* 25, 261–273.
- Zhang P, Zhang C, Li J, Han J, Liu X & Yang H (2019) The physical microenvironment of hematopoietic stem cells and its emerging roles in engineering applications. *Stem Cell Research & Therapy* 10, 327.
- Zhang S, Weinberg S, DeBerge M, Gainullina A, Schipma M, Kinchen JM, Ben-Sahra I, Gius DR, Yvan-Charvet L, Chandel NS, Schumacker PT & Thorp EB (2019) Efferocytosis Fuels Requirements of Fatty Acid Oxidation and the Electron Transport Chain to Polarize Macrophages for Tissue Repair. *Cell Metab* 29, 443–456.e5.
- Zhao L, He R, Long H, Guo B, Jia Q, Qin D, Liu S-Q, Wang Z, Xiang T, Zhang J, Tan Y, Huang J, Chen J, Wang F, Xiao M, Gao J, Yang X, Zeng H, Wang X, Hu C, Alexander PB, Symonds ALJ, Yu J, Wan Y, Li Q-J, Ye L & Zhu B (2018) Late-stage tumors induce anemia and immunosuppressive extramedullary erythroid progenitor cells. *Nat Med* 24, 1536–1544.
- Zhao Y, Glesne D & Huberman E (2003) A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2426–2431.
- Zhu J & Emerson SG (2002) Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* 21, 3295–3313.

Zipori D (2004) The nature of stem cells: state rather than entity. *Nat Rev Genet* 5, 873–878.