



**HAL**  
open science

# Impact de la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux pour la régénération de la muqueuse intestinale dans le syndrome gastro-intestinal radio-induit

Lydia Bensemmane

► **To cite this version:**

Lydia Bensemmane. Impact de la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux pour la régénération de la muqueuse intestinale dans le syndrome gastro-intestinal radio-induit. Médecine humaine et pathologie. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS712 . tel-04590841

**HAL Id: tel-04590841**

**<https://theses.hal.science/tel-04590841v1>**

Submitted on 28 May 2024

**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.

# Sorbonne Université

Ecole doctorale 394 : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

*Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN)*

*PSE-SANTE/SERAMED/Laboratoire de radiobiologie des expositions médicales  
(LRMed)*

## **Impact de la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux pour la régénération de la muqueuse intestinale dans le syndrome gastro-intestinal radio-induit**

Présentée par

**Lydia Bensemmane**

Thèse de doctorat de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Dirigée par le Dr. Christine Linard et le Pr. Xavier Treton

Présentée et soutenue publiquement le 11 mai 2023

Devant un Jury composé de :

Pr. Onnik Agbulut (Professeur des Universités)	Président
Dr. Serge Candéias (Directeur de recherche)	Rapporteur
Dr. Nathalie Rouas-Freiss (Directeur de recherche)	Rapporteur
Dr. Vanessa Petit (Maître de conférences)	Examineur
Dr. Sébastien Banzet (Directeur de recherche-Médecin militaire)	Examineur
Dr. Christine Linard (Directeur de recherche)	Directeur de thèse
Pr. Xavier Treton (Professeur des Universités-Praticien hospitalier)	Co-directeur de thèse



*A ma Mère, A mon Père, ce manuscrit de thèse représente le fruit de vos années d'investissement. Je vous le dédie, veuillez y trouver le témoignage de ma grande reconnaissance. Merci d'avoir contribué à ma réussite et d'avoir continué à croire en moi, même lorsque je baissais les bras. Que Dieu vous garde.*

*A mon mari, merci d'avoir été mon pilier durant ces quatre années de thèse, tu as toute ma reconnaissance et mon amour.*

# Remerciements

Pour commencer, je tiens à remercier sincèrement les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse :

- ✓ Le président : le Professeur **Onnik Agbulut** pour avoir accepté de participer à ce jury
- ✓ Les rapporteurs : le Docteur **Nathalie Rouas Freiss** & le Docteur **Serge Candéias** pour avoir consacré du temps à la lecture ainsi qu'à l'évaluation de ce manuscrit
- ✓ Les examinateurs : le Professeur **Sébastien Banzet** d'avoir accepté d'être mon examinateur & le Docteur **Vanessa petit**, qui a par ailleurs suivi l'évolution de mon travail de thèse en tant qu'experte scientifique.

Merci également à ma tutrice de Sorbonne Université, **Agnès Ribeiro**, qui a suivi mes travaux de thèse ces quatre années, merci pour ta bienveillance et tes critiques toujours constructives, merci de t'être investie dans ce projet.

Je remercie toute l'équipe du LRMED pour la super bonne ambiance durant ces quatre années de thèse :

Tout d'abord, un immense merci à **Christine Linard**, mon directeur de thèse. Je te remercie de m'avoir fait confiance depuis le début, du stage jusqu'à aujourd'hui. Merci de m'avoir aidé à concrétiser ces travaux de thèse. Tu as suivi mon évolution, tu m'as permis de me recentrer dans mes résultats. Merci pour le temps que tu as passé à corriger ce manuscrit et tous les rapports qu'il fallait écrire. Merci pour les séances de shopping à Catane 😊 Je sais que je suis ta dernière thésarde alors j'espère avoir été à la hauteur et que tu garderas un bon souvenir. Merci pour toutes ces conversations en fin de journée ou on remettait en question tous nos résultats, merci pour tout ! Tu mérites tes vacances et par la même occasion ta retraite ! 😊

Je tenais à remercier mon deuxième directeur de thèse **Xavier Treton**. Je te remercie pour ta disponibilité malgré ton très gros planning, de m'avoir motivé pour les études de médecine. Merci pour tes précieux conseils, et pour ton investissement dans la recherche et la médecine.

Un grand merci à **Fabien Milliat**. Merci pour ta disponibilité, ton écoute, et tes conseils toujours pertinents qui m'ont permis de prendre du recul sur mes résultats. Ta bienveillance

et ton investissement à part égal dans tous les projets, permettent de faire avancer le labo et le fédère.

Merci à **Alain Chapel** pour tes conseils tout au long de cette thèse et m'avoir encouragé, tu es incollable sur l'utilisation des CSMs. J'attends avec impatience tes astuces concernant le métier de médecin/chercheur.

Merci à **Agnès François**, tu arrives toujours à innover en matière de questions. Tu trouves toujours les bons mots. J'admire ta bienveillance et ton esprit critique. Merci à **Olivier Guipaud**, pour ta bienveillance et les moments passés à l'ERRS. Je n'ai jamais vu quelqu'un aussi motivé pour gravir le volcan de l'ETNA la veille d'un congrès, tu as toute mon admiration.

Merci à **Vincent Paget**, de m'avoir initié à la cytométrie en flux, et de m'avoir encouragé tout au long de ma thèse, tu es la personne la plus rigoureuse que je connaisse.

Je remercie aussi **Christelle Demarquay** et **Noelle Mathieu** pour les échanges que nous avons pu avoir, et l'aide que vous avez pu m'apporter dans ce travail de thèse. **Christelle** merci pour ton investissement auprès du LRMed et de m'avoir initié à plusieurs techniques de labo, **Noelle** merci pour les moments passés ensemble à la SFBR.

Un grand Merci à **Georges Tarlet**, pour le temps que tu as passé sur mes manip single cell (et il y'en a eu !) tu as apporté sans t'en rendre compte une pierre à l'édifice de cette thèse. Merci aussi pour ta super humeur à toute épreuve ! 😊 Merci à **Valérie Buard**, pour ces conversations dans le couloir qui n'ont rien à voir avec la science ! merci d'avoir coordonné le déménagement de nos bureaux, et de t'être toujours soucie de notre bien-être 😊.

Merci également à **Amine Benadjaoud**, d'avoir travaillé sur mes datas single cell et merci à toi pour ton soutien durant cette thèse, merci pour le temps que tu m'as accordé concernant les tests statistiques !

Merci à **Claire Squiban**, tu m'as formé à plusieurs techniques pendant mon stage et ma thèse dont les organoïdes. J'ai galéré à les obtenir au début mais finalement j'ai réussi ! merci pour ton investissement dans ma thèse. Merci à **Alexandra Semont**, pour ces conversations de couloirs, et ta bonne humeur 😊

Je tiens à remercier **Miray Razanajatovo**, tu es une collègue qui est chère à mon cœur, et aujourd'hui tu es bien plus que ça tu es mon amie. On a commencé ensemble à l'IRSN et dorénavant tu vas devoir continuer sans moi cela fait un peu bizarre. Tu as été présente de A à Z, tu as été dans « les backstage » de la thèse, merci pour ton soutien sans faille depuis 4 ans, d'avoir été là dans les hauts et les bas du projet. Merci pour toutes ces fins de journées de digestion à éteindre le FACS (ça durait littéralement 100 ans 😊), merci d'avoir toujours libéré un créneau pour moi à Alphée même si cela signifiait devoir venir plus tôt. Merci pour ta bonne humeur, tu es vraiment quelqu'un de géniale et tu mérites le meilleur.

Ensuite merci à **Mani Mega**, tu as été là que deux ans mais comme Miray tu es devenue une amie, merci ma Mani pour ton soutien, ta présence et ces heures de rigolades qu'on a passé ensemble, tu m'as appris pleins de trucs sur ton domaine, j'ai aimé t'accompagner dans les changements de tous les DAKIN du service ! 😊 Merci pour ta disponibilité et de m'avoir tenu compagnie au FACS. J'ai adoré passer des moments avec toi !

Un immense merci à **Romain Granger**, si je commence à énumérer le nombre de merci que je te dois on n'en finirait pas ! 😊 Tu es le bras droit de Christine, sans toi les expérimentations animales n'auraient sûrement pas avancé, tu m'as beaucoup beaucoup beaucoup aidé et je t'en suis reconnaissante ! Merci pour ces conversations auprès de nos chères souris 😊 ! Merci pour ta confiance et je compte sur toi pour l'épanouissement de plume. Merci à **Cloé Bourelrier**, je t'ai connu tard dans ma thèse mais tu es une personne géniale et authentique ! Merci de m'avoir fait découvrir les patchs chauffants et merci d'être mon agence de voyage haha

Une personne qui est partie depuis 3 ans mais que je n'oublie pas au LRMed **Mariam Ben kacem**, merci de m'avoir accompagné en tant que bébé thésard au labo, tu es devenue une amie et j'ai aimé te retrouver sur tes temps libres entre Paris et Houston ! Tu m'as beaucoup apporté surtout dans mon début de thèse sans le savoir ! Et finalement nous sommes enfin arrivés au jour de ma soutenance haha, tu vois que ça passe vite ! Merci 😊

Merci à **Mallia Geiger**, tu as été mon compagnon de bureau pendant 4 ans, tout se passait bien avant que **Martin Jestin** arrive haha (je plaisante sans rancune Martin), merci pour ta bonne humeur, je ne regrette pas d'avoir partagé mon bureau avec toi, tu as toujours réussi à trouver les mots même lorsque j'étais stressée. Merci à **Martin Jestin**, ou devrais-je dire Papa

Martin, tu es la touche de Peps de notre bureau ! toi et **Mallia** vous êtes des personnes géniales restez comme vous êtes. J'attends ton installation à Rennes ! 😊 Merci à **Batoul Chouaib**, tu es arrivée en cours de thèse mais tu m'as beaucoup apporté surtout à la fin de celle-ci. Merci pour tous tes conseils en tant que dentiste haha comme en tant que post doc ! j'attends avec impatience l'ouverture de ton cabinet.

Merci à **Sarah Braga-Cohen**, tu as animé ce labo comme personne, merci pour ta bonne humeur et ton investissement malgré ta thèse à l'ADIN ce qui a permis de faire bouger les choses dans de nombreux domaines à l'IRSN. Merci pour les moments passés à la SFBR en ta compagnie 😊

Merci à **Sarmini Bavananthan**, tu es arrivée à la fin de ma thèse, mais j'ai découvert une personne exceptionnelle, merci pour tous ces fous rires et ces pauses, je n'ai aucun doute que le reste de ta thèse se passera sans encombre, Merci à **Claire Lago**, tu as partagé le bureau avec moi au début de ton stage et qu'est-ce qu'on n'a pas rigolé ! Tu as toujours le mot qu'il faut pour rassurer. Bon courage pour la fin de ta thèse ! J'aimerais remercier également **Nathalie Roger**, tu es une perle, merci de m'avoir aidé dans mes manip single cell, tu as été vraiment d'une aide précieuse ! j'ai aimé passer du temps avec toi et tu fais partie des gens qui vont énormément me manquer. Merci à **Anne-Laure Pouliet** ou devrais-je dire professeur Pouliet hahaha, j'ai adoré passer du temps avec toi que ce soit en labo ou en pause, comme les filles tu n'es pas seulement une collègue tu es devenue une amie, merci pour tous les fous rires qu'on a eus ensemble, de m'avoir accompagné dans cette fin de thèse, tu es une fille brillante je ne doute pas que ta thèse se passera bien. Bref merci **les Filles** j'aurais aimé vous rencontrer plus tôt 😊 (je vous aime plus que mon ordi ne vous inquiétez pas haha)

Merci à **Florian, Théo, Rémi** pour les rigolades pendant les pauses. Bon courage pour la fin de vos thèses ! Spéciale dédicace à florian pour les crêpes mille trous

Un merci particulier à **Lucie Ancel**, j'ai adoré passer du temps avec toi à Catane cela restera gravé dans ma tête ! Je sais que je suis à jamais fiché avec toi concernant le shopping hahaha merci pour ta gentillesse, ton écoute et tes conseils, je suis persuadée que la fin de ta thèse sera à la hauteur de ton investissement 😊 Merci également à **Goran Riazi**, pour ces conversations avec toi à refaire le monde que ce soit à l'IRSN ou à St Raphael ! Bon courage pour la fin de ta thèse monsieur le pharmacien.



Merci à **Diego Amarante**, merci pour tes encouragements concernant mon oral, dommage tu es arrivé au moment où je pars ! bon courage pour ton post-doc 😊

Merci à **Clément Brossard**, tu es un ancien mais tu as été là pendant ma thèse, effectivement on aurait pu aller au Bahamas si ce n'était pas le COVID ! tu es mon collègue en thérapie cellulaire, merci d'avoir été là !

Merci à **Yoann Ristic**, d'avoir pris le relais pour les irradiations quand miray n'était pas dispo, merci d'avoir également pris en charge mes irradiations pendant mon stage. Merci pour les pauses passées avec toi.

Merci à **Quentin Tallon**, de venir régulièrement animer notre bureau, tu es investi dans ce que tu fais, tu feras un très bon président de l'ADIN. Merci aussi à **Manon Guillou** pour ta bonne humeur et pour les moments passés en ta compagnie. Bon courage pour la fin de thèse à vous deux !

Et enfin un grand grand merci à **Maamar Soudi** pour ta bonne humeur et ton soutien sans faille à distance haha, Merci pour l'intérêt que tu as porté à mon projet et tes encouragements et **Stéphane Flamant** pour ces fous rires à midi en salle de convivialité, merci à toi pour ta bienveillance et tes conseils. Plus globalement merci au LRAcc. 😊

Merci à **Louis Ermeneux & Mahinour**, merci pour les moments qu'on a passé ensemble à la colle sur loup, bon courage pour la fin de votre thèse !

Merci à **Marie, Aurélie, Calixte et Thomas**, les petits nouveaux, merci pour ces moments de convivialités ! Vous êtes géniaux ! (Bonne chance Calixte et Thomas pour votre poursuite en thèse 😊)

Merci à toute l'équipe du GSEA, **Delphine, Amandine**, et **Ahmad** pour votre disponibilité et l'aide que vous m'avez apporté à l'expérimentation animale.

Un grand Merci à **Véronique Joffres**, pour ton aide dans les démarches administratives et les longues conversations partagées avec toi. Je te souhaite un très bon rétablissement 😊 Merci à **Chloé** pour les 1 million de stérilisation de mes pinces et ciseaux, sans toi on n'y arriverait pas. Merci pour l'animation que tu mets au labo et pour toutes les sucreries que tu nous as apportés

Merci à **Stéphane Iliano & Christine Bartizel** qui sont arrivés à la fin de ma thèse, merci pour nos échanges autour du projet.

Merci à **Floriane Laumond & Victorine Dufour** de l'association François Aupetit, merci de m'avoir soutenue pendant l'écriture, être bénévole à vos côtés a été un pur plaisir, merci pour tous ces fous rires !!!!!!!!!

Merci à ma **Grand-mère**, tu m'as vu débiter mon cursus à l'université et tu as suivi de près mon parcours, merci pour ton soutien et ton aide précieuse tout au long de mes études, même loin de mes parents, tu étais mon repère à Grenoble. Un grand merci à **ma tante et mon oncle** pour toutes ces années passées en votre compagnie à Grenoble qui m'ont permises d'arriver où je suis aujourd'hui.

Merci à **mes beaux-parents**, qui ont apporté leur pierre à l'édifice même de loin, je regrette que vous n'ayez pas pu venir à ma soutenance. Vous avez été une source de motivation.

Un milliard de merci à **toutes mes sœurs et mon frère** qui m'ont toujours soutenu toutes ces années, merci de m'avoir écouté parler de ma thèse durant 4 ans. Vous êtes ma force. Je suis heureuse de vous avoir.

Merci à **mon Mari** (avec un m majuscule parce c'est bien plus qu'un état c'est un travail à temps plein non rémunéré haha), de m'avoir supporté pendant ces 4 années de thèse, à la fin je pense que tu peux toi aussi passer ton doctorat, on l'a vécu à deux cette thèse, merci pour ta confiance et de ton soutien sans faille. Tu m'as permis de ne rien lâcher.

Merci à **ma Maman** d'avoir toujours eu confiance en moi et de m'avoir poussé à me dépasser, à aller le plus loin possible. Merci à **mon Papa** pour m'avoir toujours soutenu aussi loin que je me souviens, tu as toi aussi toujours été là et tu étais le complément de maman, c'est aussi grâce à toi que j'en suis là aujourd'hui. Vous êtes ma force où que je sois. Cette thèse je vous la dois, Les mots ne sauraient décrire ma reconnaissance envers vous. Vous êtes la prunelle de mes yeux.



# Liste des abréviations

<b>Alpi</b>	<i>Intestinal Alkaline Phosphatase</i>
<b>AMP</b>	<i>Anti-Microbial Peptides</i>
<b>ASC</b>	<i>Adipose Derived Stem Cell</i>
<b>Ascl2</b>	<i>Achaete-Scute Complex homolog 2</i>
<b>AP-HM</b>	<i>Hôpitaux Universitaire de Marseille</i>
<b>ATM</b>	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
<b>ATOH1</b>	<i>Atonal BHLH Transcription Factor 1</i>
<b>Arg</b>	<i>Arginase</i>
<b>ARS</b>	<i>Acute Radiation Syndrome</i>
<b>BARDA</b>	<i>Advanced Research and Development Authority</i>
<b>Bmi1</b>	<i>B lymphoma Mo-MLV Insertion region 1 homolog</i>
<b>Bmp</b>	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
<b>BM-MSC</b>	<i>Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell</i>
<b>CBC</b>	<i>Columnar Based Cell</i>
<b>CCL2</b>	<i>Chemokine Ligand 2</i>
<b>CCR2</b>	<i>C-C Chemokine Receptor type 2</i>
<b>cDC</b>	<i>Conventional Dendritic Cell</i>
<b>CEA</b>	<i>Commissariat à l'Énergie Atomique</i>
<b>CIPR</b>	<i>Commission Internationale de Protection Radiologique</i>
<b>Clu</b>	<i>Clusterin</i>
<b>cMET</b>	<i>Tyrosine Protein Kinase MET</i>
<b>CMH</b>	<i>Complexe Majeur d'Histocompatibilité</i>
<b>COVID-19</b>	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
<b>COX</b>	<i>Cyclooxygénase</i>
<b>CSF-1</b>	<i>Colony Stimulating Factor 1</i>
<b>CSF-1R</b>	<i>Colony Stimulating Factor 1 Receptor</i>
<b>CSI</b>	<i>Cellule Souche Intestinale</i>
<b>CSM</b>	<i>Cellules souches mésenchymateuses</i>
<b>Cspg4</b>	<i>Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4</i>
<b>Cx3CL1</b>	<i>Chemokine C-X3-C motif Chemokine Ligand 1</i>
<b>Cx3Cr1</b>	<i>Chemokine C-X3-C motif Chemokine Receptor 1</i>
<b>DC</b>	<i>Dendritic Cell</i>
<b>DCLK</b>	<i>Double Cortin Like Kinase</i>
<b>DL</b>	<i>Dose Létale</i>
<b>DLL</b>	<i>Delta Like Canonical Notch Ligand</i>
<b>DNA-PK</b>	<i>DNA-dependent Protein Kinase</i>
<b>DSS</b>	<i>Dextran Sodium Sulfate</i>
<b>EPC</b>	<i>Endothelial Progenitor Cell</i>
<b>EpCAM</b>	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
<b>EGF</b>	<i>Epidermal Growth Factor</i>
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FGF</b>	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
<b>FLT3</b>	<i>Fms Like Tyrosine Kinase</i>

<b>FSCS</b>	<i>Fondation Suisse pour les Cellules Souches</i>
<b>Fz</b>	<i>Frizzled</i>
<b>GALT</b>	<i>Gut Associated Lymphoid Tissue</i>
<b>G-CSF</b>	<i>Granulocyte Stimulating Factor</i>
<b>GFP</b>	<i>Green Fluorescent Protein</i>
<b>GLP-2</b>	<i>Glucagon-Like Peptide 2</i>
<b>GMP</b>	<i>Granulocyte Macrophage Progenitor</i>
<b>GSK-3</b>	<i>Glycogene Synthase Kinase</i>
<b>GVHD</b>	<i>Graft Versus Host Disease</i>
<b>Gy</b>	<i>Gray</i>
<b>Hes1</b>	<i>Hairy and Enhancer of Split-1</i>
<b>HGF</b>	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
<b>HLA</b>	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
<b>Hopx</b>	<i>Homeodomain-Only Protein</i>
<b>HR</b>	<i>Homologous Recombination</i>
<b>IDO</b>	<i>Indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
<b>IFAT</b>	<i>International Federation for Adipose Therapeutics and Science</i>
<b>IEC</b>	<i>Intestinal Epithelial Cell</i>
<b>IEL</b>	<i>Intraepithelial Lymphocyte</i>
<b>ICAM</b>	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
<b>IGF</b>	<i>Insulin Like Growth Factor</i>
<b>IL</b>	<i>Interleukine</i>
<b>ILC</b>	<i>Innate Lymphoid Cell</i>
<b>ISC</b>	<i>Intestinal Stem Cell</i>
<b>ISCT</b>	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
<b>IFN</b>	<i>Interféron</i>
<b>iNOS</b>	<i>Inducible Nitric Synthase</i>
<b>ILF</b>	<i>Isolated Lymphoid Follicles</i>
<b>KGF</b>	<i>Keratinocyte Growth Factor</i>
<b>KO</b>	<i>Knock Out</i>
<b>Lgr5</b>	<i>Leucine Rich Repeat Containing G-protein Coupled Receptor 5</i>
<b>LGF</b>	<i>Leukocyte Growth Factor</i>
<b>LTh</b>	<i>Lymphocyte T Helper</i>
<b>LPS</b>	<i>Lipopolysaccharide</i>
<b>Lrc</b>	<i>Label Retaining Cell</i>
<b>Lrig1</b>	<i>Leucine Rich Repeats and Immunoglobulin Like Domains</i>
<b>M1</b>	<i>Macrophage de type 1</i>
<b>MCP-1</b>	<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>
<b>M-CSF</b>	<i>Monocyte Colony Stimulating Factor</i>
<b>MEROPOL</b>	<i>Medical Treatment Protocols for Radiation Accident Victims</i>
<b>MMP-9</b>	<i>Metalloproteinase Matricielle 9</i>
<b>MICI</b>	<i>Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinale</i>
<b>MIF</b>	<i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i>
<b>MLN</b>	<i>Mesenteric Lymph Node</i>
<b>MOF</b>	<i>Multiple Organ Failure</i>
<b>MTI</b>	<i>Médicament de Thérapie Innovante</i>
<b>MUC</b>	<i>Mucine</i>
<b>mTert</b>	<i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>
<b>NASA</b>	<i>National Aeronautics and Space Administration</i>
<b>NETosis</b>	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
<b>NHEJ</b>	<i>Non Homologous End Joining</i>
<b>NIAID</b>	<i>National Institute of Allergy and Infectious Disease</i>

<b>NICD</b>	<i>Notch Intracellular Domain</i>
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>NOD</b>	<i>Non Obese Diabetic</i>
<b>NOTCH1</b>	<i>Neurogenic locus Notch Homolog Protein 1</i>
<b>Olfm4</b>	<i>Olfactomedin</i>
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
<b>PGE2</b>	<i>Prostaglandine E2</i>
<b>PRR</b>	<i>Pathogen Recognition Receptor</i>
<b>RC</b>	<i>Response Categories</i>
<b>ROR-<math>\gamma</math></b>	<i>RAR-Related Orphan Receptor Gamma</i>
<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Species</i>
<b>Rspo</b>	<i>R-spondine</i>
<b>SCID</b>	<i>Severe Combined ImmunoDeficiency</i>
<b>SDF1</b>	<i>Stromal Derived Factor 1</i>
<b>SFRO</b>	<i>Société Française de Radiothérapie Oncologique</i>
<b>SGI</b>	<i>Syndrome Gastro-Intestinal</i>
<b>Sv</b>	<i>Sievert</i>
<b>SVF</b>	<i>Stromale Vascular Fraction</i>
<b>STAT 3</b>	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
<b>TED</b>	<i>Trans Epithelial Dendrites</i>
<b>TLR</b>	<i>Toll Like Receptor</i>
<b>TA</b>	<i>Transit Amplifying Cell</i>
<b>TCF</b>	<i>Transcription Factor T Cell</i>
<b>TPO</b>	<i>Thrombopoietine</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
<b>TNF</b>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
<b>Treg</b>	<i>Lymphocyte T Régulateur</i>
<b>VEGF</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<b>VCAM</b>	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
<b>VLA-4</b>	<i>Very Late Antigen-4</i>
<b>Yap</b>	<i>Yes-Associated Protein</i>
<b>Wnt</b>	<i>Wingless</i>
<b>WJ-MSC</b>	<i>Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cell</i>
<b>ZO-1</b>	<i>Zonula Occludens-1</i>

# Table des matières

Publications, Communications & Distinction .....	17
Introduction.....	19
Partie 1 : Les rayonnements ionisants .....	20
1.1. La diversité des rayonnements ionisants .....	20
1.2. Effets biologiques des rayonnements ionisants.....	22
1.3. La Radiosensibilité des tissus.....	24
Partie 2 : Physiologie intestinale .....	26
2.1. La structure anatomique intestinale et le processus de digestion .....	26
2.2. La lignée épithéliale de l'intestin grêle.....	27
2.3. Les voies majeures de signalisation de prolifération et de différenciation des cellules épithéliales intestinales.....	32
2.4. Les autres types cellulaires impliqués dans la niche de la crypte .....	37
Partie 3 : Le syndrome gastro intestinal.....	38
3.1. L'exposition accidentelle.....	38
3.2. Le Syndrome Gastro-intestinal.....	39
3.3. Physiopathologie du tractus gastro-intestinal .....	44
3.4. Evaluation initiale et diagnostic d'exposition aux rayonnements ionisants sur un large volume.....	49
3.5. Solutions thérapeutiques proposées .....	54
3.6. Modèle animal pour l'étude des irradiations fortes doses .....	60
Partie 4 : Le système immunitaire Intestinal.....	64
4.1. Le maintien de la barrière intestinale .....	64
4.1.1. L'homéostasie intestinale passe par Les IECs.....	65
4.1.2. Détection des signaux exogènes .....	66
4.1.3. Les lymphocytes de la lamina propria.....	66
4.1.4. Induction de l'immunotolérance par les cellules dendritiques.....	69
4.2. Les macrophages dans l'homéostasie intestinale .....	70
4.2.1. Les monocytes .....	70
4.2.2. Origines et marqueurs des macrophages.....	75
4.2.3. Polarisation des Macrophages .....	75
4.2.4. Macrophages et régénération tissulaire .....	77
4.2.5. Les neutrophiles .....	78

4.3. Inflammation radio-induite .....	80
Partie 5 : Thérapie cellulaire innovante .....	82
5.1. Définition des cellules souches mésenchymateuses .....	82
5.2. Source et obtention des CSMs .....	83
5.3. Propriétés biologiques des CSMs.....	87
5.3.1 La capacité d'immunomodulation.....	87
5.3.2. La capacité de « homing » .....	89
5.3.3. La capacité de différenciation .....	90
5.4. La « stromale Vascular Fraction » .....	91
5.5. Les effets thérapeutiques de la SVF .....	94
Problématique & Objectifs .....	97
Résultats .....	99
Axe 1 : La SVF atténue le syndrome gastro-intestinal radio-induit.....	100
Axe 2 : L'immunité dans la réponse d'immunomodulation du SGI radio-induit.....	133
Axe 3 : Stimulation du compartiment cellule souche intestinal et initiation de la régénération du compartiment épithéliale.....	165
Discussion .....	176
Conclusion Générale.....	198
Bibliographie.....	200
Annexes .....	234



## Liste des Figures

FIGURE 1 : REPRESENTATION DES DIFFERENTS TYPES DE RAYONNEMENTS TIRES DU LIVRET CEA « DE LA RADIOBIOLOGIE A LA RADIOPROTECTION » .....	20
FIGURE 2 : REPRESENTATION DES NIVEAUX D'ENERGIES EN FONCTION DE LA NATURE DU RAYONNEMENT.....	21
FIGURE 3 : SCHEMA DE L'EVOLUTION DE LA CELLULE TIRE DE L'ARTICLE « LES EFFETS DES RAYONNEMENTS IONISANTS SUR LE VIVANT » DU CEA DE 2015 .....	24
FIGURE 4 : SCHEMA DE L'ORGANISATION STRUCTURALE DE L'INTESTIN GRELE.....	27
FIGURE 5 : SCHEMA REPRESENTANT L'ORGANISATION DE L'AXE CRYPTÉ/VILLOSITÉ, COMPRENANT LES CELLULES SOUCHES LEUR PROGENITEURS, AINSI QUE LES CELLULES DIFFERENCIEES.....	28
FIGURE 6 : SCHEMA REPRESENTANT LES DIFFERENTES LIGNEES CELLULAIRES DE L'EPITHELIUM INTESTINAL. LES CELLULES SOUCHES DONNENT DES PROGENITEURS QUI VONT SE DIFFERENCIER EN CELLULES DE LA LIGNEE « SECRETRICE » OU EN CELLULES DE LA LIGNEE « ABSORBANTE ». LES CELLULES EN POSITION +4 PEUVENT REPEUPLER LA CRYPTÉ EN CELLULES SOUCHES EN CAS DE BESOIN.....	31
FIGURE 7 : SCHEMA ILLUSTRANT LES DESTINS CELLULAIRES EN FONCTION DE L'ACTIVATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH.....	34
FIGURE 8 : SCHEMA ILLUSTRANT LE MECANISME DE L'INHIBITION LATERALE VIA LA VOIE NOTCH.....	35
FIGURE 9 : SCHEMA ILLUSTRANT LES RELATIONS ENTRE LES CELLULES IMMUNITAIRES ILC « INNATE LYMPHOID CELLS » ET LES CELLULES DE LA BASE DE LA CRYPTÉ.....	37
FIGURE 10 : SCHEMA REPRESENTANT LES EFFETS DE L'IRRADIATION SUR LE COMPARTIMENT DE LA CRYPTÉ.....	39
FIGURE 11 : PHOTOS REPRESENTATIVES DE COUPES HISTOLOGIQUES D'INTESTIN MURIN EN FONCTION DE LA DOSE D'IRRADIATION DELIVREE AU NIVEAU ABDOMINAL. A : LES VILLOSITES, B : LES CRYPTES, C : LA MUSCULEUSE, D : LA LUMIERE INTESTINALE.....	40
FIGURE 12 : TABLEAU RECAPITULATIF DES SYMPTOMES EN FONCTION DE LA DOSE (Gy) APRES UNE EXPOSITION CORPS ENTIER DURANT LA PHASE PRODROMALE.....	42
FIGURE 13 : SCHEMA REPRESENTANT LA CIRCULATION ENTERO-HEPATIQUE DES ACIDES BILIAIRES.....	46
FIGURE 14 : SCHEMA REPRESENTANT L'ORGANISATION DES SOINS MEDICAUX EN FRANCE.....	50
FIGURE 15 : TABLEAU RECAPITULATIF DES PROCEDURES MEDICALES A REALISER DANS LE CADRE D'UN SYNDROME AIGU D'IRRADIATION.....	51
FIGURE 16 : TABLEAU RECAPITULATIF CLASSANT LES PATIENTS EN DIFFERENTES CATEGORIES DE REPOSE (RC).....	52
FIGURE 17 : CARTE FRANCE IDENTIFIANT LES HOPITAUX DE REFERENCE EN CAS D'ACCIDENT IMPLIQUANT L'EXPOSITION DE PERSONNES AUX RAYONNEMENTS IONISANTS.....	52
FIGURE 18 : ORGANIGRAMME REPRESENTANT LES DIFFERENTS TYPES DE LYMPHOCYTES.....	67
FIGURE 19 : SCHEMA REPRESENTANT LES INTERACTIONS ENTRE LES DIFFERENTS LYMPHOCYTES ET LES CELLULES INTESTINALE.....	69
FIGURE 20 : SCHEMA ILLUSTRANT LE RESEAU MONOCYTES/MACROPHAGES.....	72
FIGURE 21 : SCHEMA REPRESENTANT LA MATURATION DES MONOCYTES AU NIVEAU DE LA LAMINA PROPRIA.....	73
FIGURE 22 : SCHEMA REPRESENTANT LES RELATIONS EXISTANTES ENTRE LES MONOCYTES/MACROPHAGES/NEUTROPHILES DURANT L'INFLAMMATION.....	79
FIGURE 23 : SCHEMA ILLUSTRANT LA MULTIPOTENCE DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES.....	82
FIGURE 24 : SCHEMA ILLUSTRANT LES CAPACITES D'IMMUNOMODULATION DES CSMs.....	89
FIGURE 25 : SCHEMA ILLUSTRANT LES CAPACITES DE DIFFERENTIATION DES CSMs SUR DIFFERENTS ORGANES ET TISSUS .....	91
FIGURE 26 : SCHEMA ILLUSTRANT LA COMPOSITION CELLULAIRE DE LA SVF.....	92
FIGURE 27 : SCHEMA ILLUSTRANT DES EXEMPLES D'APPLICATIONS DE LA SVF EN CLINIQUE.....	95
FIGURE 28 : SCHEMA ILLUSTRANT LE ROLE DE YAP DANS LA CRYPTÉ.....	181
FIGURE 29 : SCHEMA ILLUSTRANT LES EFFETS DE LA SVF SUR LE COMPARTIMENT IMMUNITAIRE.....	199

## Liste des Tableaux

TABLEAU 1 : ACCIDENTS D'IRRADIATION DECLARES AYANT ENTRAINES UN SGI: TIRE DE « LES ACCIDENTS D'IRRADIATION, 1950-2000 LEÇONS DU PASSE » J.-C. NÉNOT RADIOPROTECTION 2001 VOL. 36 PAGES 431-450. ....	53
TABLEAU 2 : TABLEAU RECAPITULATIF DES MESURES THERAPEUTIQUES POUR LES SYNDROMES AIGUS D'IRRADIATION EN FONCTION DE LA DOSE. TIRÉ DU MANUEL: DIAGNOSIS AND TREATMENT OF RADIATION INJURIES: SAFETY REPORTS SERIES N°2,1998. ....	59

# Publications, Communications & Distinction

## Publications

- ✓ **Bensemmane L.**, Squiban, C., Demarquay, C., Mathieu, N., Benderitter, M., Le Guen, B., ... & Linard, C. (2021). The stromal vascular fraction mitigates radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(1), 1-14.
- ✓ **Bensemmane L.**, Milliat F., Treton X., Linard C. (2023). Systemically delivered adipose stromal vascular fraction mitigates radiation-induced intestinal syndrome by immunomodulating the inflammatory response through CD11b+ cell dependent mechanism. *Stem Cell Research & Therapy* (Article en soumission)
- ✓ Dushime H., Moreno S., Linard C., Adrait A., Yohann C., Peltzer J., Messiaen S., Torres C., **Bensemmane L.**, Lewandowski D., Romeo PL., Petit V., Gault N. (2022). Fetal Muse-based therapy prevents lethal radio-induced gastro-intestinal syndrome by intestinal regeneration. *Stem cell research & therapy*. (Article en soumission)

## Communications Orales

- ✓ **Bensemmane L.**, Squiban C., Demarquay C., Milliat F., Linard C. *Impact de la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux pour la régénération de l'intestin dans le syndrome gastro-intestinal radio-induit*. Société Française de Biologie des Radiations (SFBR), St Raphael, France, 2022
- ✓ **Bensemmane L.**, Squiban C., Demarquay C., Milliat F., Linard C. *Impact de la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux pour la régénération de l'intestin dans le syndrome gastro-intestinal radio-induit*. Journée des Thèses de l'Ecole Doctorale (JTED), 2022, Paris, France
- ✓ **Bensemmane L.**, Squiban C., Demarquay C., Milliat F., Linard C. *Impact de la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux pour la régénération de l'intestin dans le syndrome gastro-intestinal radio-induit*. Journée des Thèses de l'IRSN (JT), 2022, La Colle-sur-loup, France
- ✓ **Bensemmane L.**, Squiban C., Demarquay C., Milliat F., Linard C. *Stromal vascular fraction mitigates radiation-induced gastro-intestinal syndrome*. International Federation for Adipose Therapeutics and Science, (IFATS), 2021, Miami, Etats-Unis

## Communications Affichées

- ✓ **Bensemmane L.**, Squiban C., Demarquay C., Milliat F., Linard C. *Stromal vascular fraction mitigates radiation-induced gastro-intestinal syndrome*. The European Radiation Research Society (ERRS), 2022, Catane, Italie
- ✓ **Bensemmane L.**, Squiban C., Demarquay C., Milliat F., Linard C. *Impact de la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux pour la régénération de l'intestin dans le syndrome gastro-intestinal radio-induit*. Journée des Thèses de l'Ecole Doctorale (JTED), 2021, Paris, France
- ✓ **Bensemmane L.**, Squiban C., Demarquay C., Milliat F., Linard C. *Stromal vascular fraction mitigates radiation-induced gastro-intestinal syndrome*. International Society for Cell and Gene Therapy (ISCT), 2020, Paris, France

## Distinctions

- ✓ Prix du meilleur Poster lors des journées des thèses de l'école doctorale Physiologie Physiopathologie et Thérapeutique de Sorbonne Université, 2021, Paris, France
- ✓ Sélection parmi les 5 meilleurs finalistes du « Best Paper » au congrès international IFATS (International Federation for Adipose Therapeutics and Science), 2021, Miami, Etats-unis

# Introduction

---

## Partie 1 : Les rayonnements ionisants

### 1.1. La diversité des rayonnements ionisants

Les découvertes scientifiques de la fin du 19<sup>ème</sup> siècle ont pu mettre en lumière des nouvelles « sortes de rayons » selon l'article de Röntgen en 1895, il s'agirait des rayons X. L'homme est continuellement soumis aux rayonnements naturels comme les rayonnements solaires par exemple qui sont des ondes lumineuses. Le point commun entre les rayons X et les ondes lumineuses est qu'il s'agit d'ondes électromagnétiques capables de se propager dans le vide et dans l'air. Ces ondes transportent de l'énergie, mais pas de matière. Ces deux types de rayons font partie d'un spectre électromagnétique qui répertorie d'une part les rayons infrarouges, les ondes radio, les micro-ondes qui font partie de la famille des rayonnements non-ionisants. Et d'autre part les rayons X et gamma qui font partie de la famille des rayonnements ionisants. Dans cette thèse, nous nous intéresserons uniquement aux rayonnements ionisants (*Figure 1*).

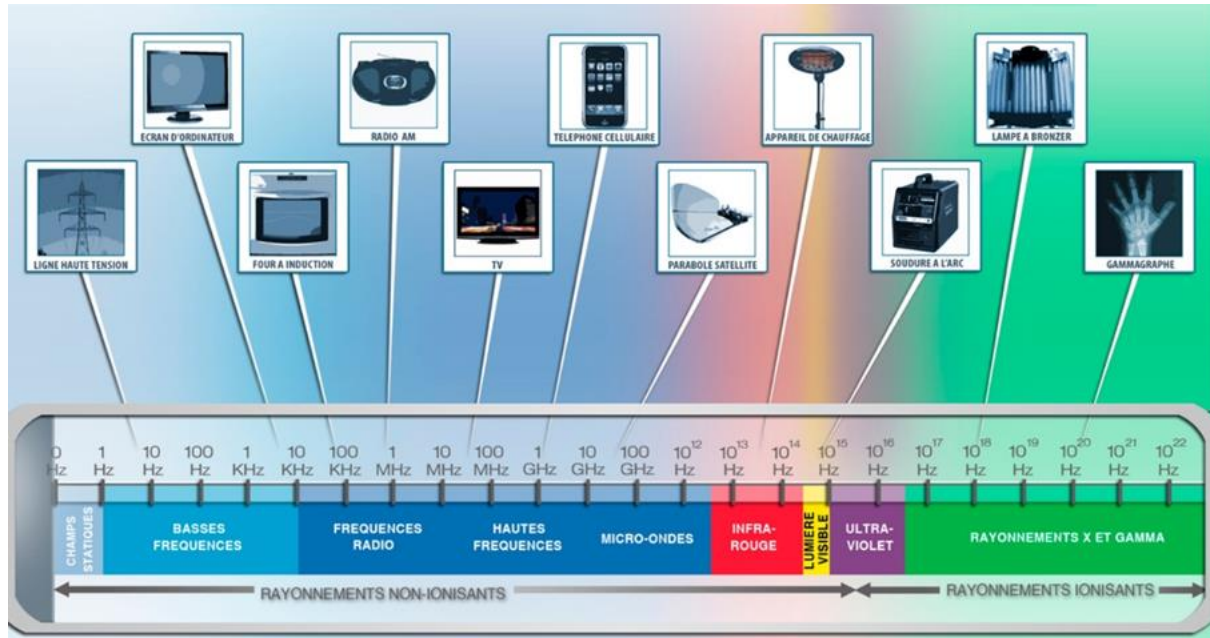
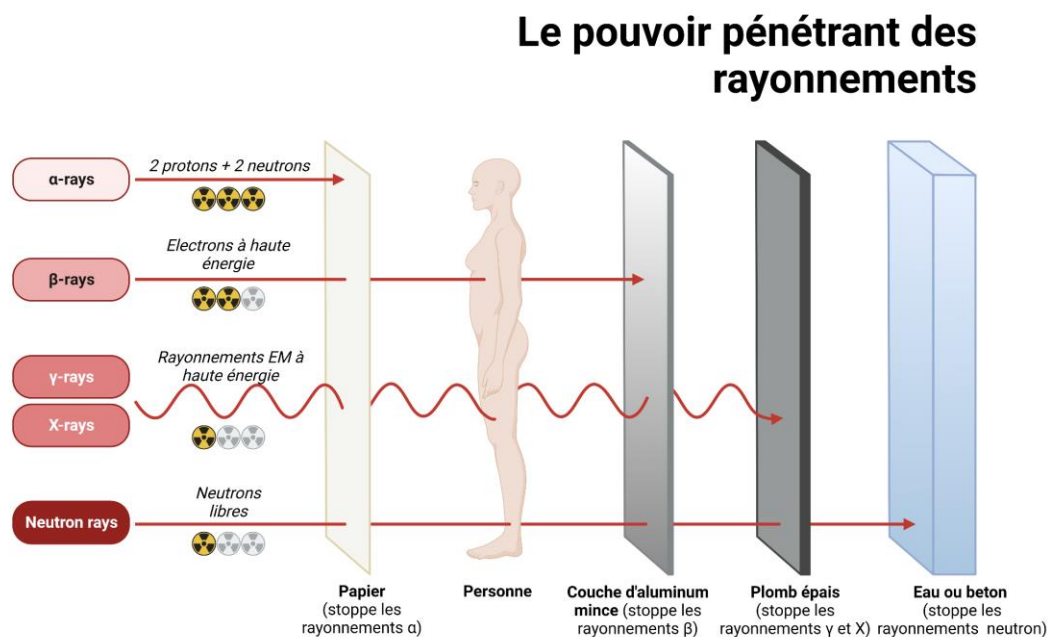


Figure 1 : Spectre des rayonnements électromagnétiques en fonction de leurs longueurs d'onde (IRSN)

Un rayonnement est dit ionisant lorsqu'il est susceptible d'arracher un ou plusieurs électrons du cortège électronique des atomes qui composent la matière avec laquelle il interagit. Parmi les rayonnements ionisants, il existe des rayonnements indirectement ionisants (rayons X et

gamma), et les rayonnements directement ionisants (alpha, beta et protons). Ce dernier groupe comprend des rayonnements composés de particules volumineuses, le transfert d'énergie à la matière est important mais leur taille provoque leur ralentissement dans la matière. Ce groupe s'oppose à ceux des rayonnements composés de charge neutre, qui ionisent la matière par l'intermédiaire des particules chargées émises lors de leurs mouvements.



**Figure 2 :** Représentation des niveaux d'énergies en fonction de la nature du rayonnement.  
Crée avec Biorender.com

Ainsi, l'énergie émise n'est pas la même pour tous les rayonnements et les moyens pour s'en protéger diffèrent. Ces rayonnements provoquent des effets différents sur l'organisme en fonction du type de rayonnement et de la dose reçue. Lorsqu'un rayonnement pénètre la matière, il lui transfère de l'énergie, la dose absorbée par la matière caractérise ce transfert d'énergie. L'unité de dose absorbée par la matière est le Gray (Gy) qui est équivalent à un Joule absorbé par Kilogramme de matière. Il existe également le Sievert (Sv) qui permet de tenir compte des effets biologiques induits par l'irradiation en fonction des organes exposés. La limite annuelle de dose moyenne reçue suite à l'exposition de rayonnements ionisants artificiels est de 1 mSv par an/personne pour la population civile (hors des travailleurs du

nucléaire) (norme CIPR 2007). Quant au débit de dose, celui-ci se caractérise par la dose délivrée par unité de temps (Gy/min).

Les rayonnements X et gamma sont les plus énergétiques, il faudra une forte épaisseur de béton ou de plomb pour s'en protéger (*Figure 2*).

## 1.2. Effets biologiques des rayonnements ionisants

Les rayonnements ionisants induisent une série d'altérations cellulaires et moléculaires, selon la dose reçue, le débit de dose, la nature du rayonnement, l'étendue des zones irradiées, les effets seront plus ou moins néfastes. De nombreuses études ont permis de mieux connaître les effets des rayonnements ionisants sur l'organisme (*Figure 3*). On distingue les effets directs et les effets indirects qui peuvent être d'ordre cellulaire, structural ou fonctionnel. Au niveau des cellules, les photons qui sont émis par une source de rayonnement vont arracher des électrons aux macromolécules (ADN, lipides, protéines) induisant des lésions : il s'agit de **l'effet direct** des rayonnements ionisants, l'énergie des rayonnements va directement être absorbée par les biomolécules (Fahr, 1970). Lorsque les électrons sont arrachés à des molécules d'eau (radiolyse de l'eau) : il s'agit de **l'effet indirect** des rayonnements ionisants, l'énergie va être absorbée par l'environnement aqueux (Chapman and Gillespie, 1981). L'eau occupant une part cellulaire importante, les molécules d'eau vont être ionisées, des électrons vont être émis et décomposés en électrons libres ainsi qu'en espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS) (Herskind and Westergaard, 1988). Ces ROS sont plus précisément des radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\bullet$ ) et des peroxydes d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ces molécules sont produites et réagissent avec les macromolécules, les modifient chimiquement. Il existe des systèmes de détoxification des radicaux libres tels que les enzymes anti-oxydants (catalase, glutathion peroxydase, superoxyde dismutase). Tous les compartiments cellulaires et toutes les molécules peuvent être impactés par les effets directs ou indirects des rayonnements ionisants, par exemple au niveau de l'ADN, les lésions radio-induites peuvent être :

- ✓ Des ruptures de chaînes : cassure simple brin et double brin (SSB & DSB)
- ✓ Des modifications chimiques des bases et des sucres, l'information génétique est alors altérée
- ✓ Des pontages intra-ou inter-chaînes



Ces dommages peuvent impacter deux principaux mécanismes : la réplication et la transcription, Il y aurait environ 3000 bases endommagées dans une cellule après avoir été soumis aux rayons X à une dose de 1 Gy (Griffin, 2006), et plus particulièrement au sein des cellules proliférantes, en effet, 1 Gy est suffisant afin d'induire un nombre important de dommages à l'ADN et perturber le fonctionnement normal de la cellule. A faible dose (< 1Gy) la synthèse de l'ADN est restaurée au bout de quelques heures; cependant , à plus forte dose des changements dans la synthèse de l'ADN sont observés plus tôt et ces effets persistent plus longtemps dans le temps (Altman and Okada, 1970) et peuvent mener à la mort cellulaire. Les dommages à l'ADN liés à l'exposition à des rayonnements ionisants provoquent des arrêts dans le cycle cellulaire, ces arrêts entraînent l'activation des mécanismes de réparations telles que : Non-Homologous End Joining (NHEJ) and Homologous Recombination (HR) (Chapman *et al.*, 2012). De plus, les cassures de l'ADN sont détectées par différentes protéines comme par exemple ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) qui est la première à détecter la cassure avec la protéine ATR (Ataxia telangiectasia and RAD3 related). ATM est le principal senseur des cassures de l'ADN induites par les rayonnements ionisants (Kanu and Behrens, 2007), d'autres protéine Ku et DNA-PK interviennent dans les systèmes de réparations en étant recrutées au site de l'ADN endommagé (Maier *et al.*, 2016). Ce qui déterminera l'avenir de la cellule c'est le degré de dommages causés à l'ADN et les modifications que le gène p53 a subi (phosphorylation, acétylation, méthylation). En effet, p53 est un gène suppresseur de tumeur, il agira comme un facteur de transcription (Mirzayans *et al.*, 2012) et activera une des deux voies : la mort ou la survie cellulaire, au vu de sa fonction importante p53 avait été décrit comme étant le « gardien du génome » (Lane, 1992).

Une réparation fidèle des brins d'ADN permettra à la cellule de continuer son cycle cellulaire à l'inverse, une mauvaise réparation de l'ADN conduira à la mort cellulaire par apoptose, à la catastrophe mitotique ou bien la sénescence, ce qui déterminera la voie cellulaire qu'empruntera la cellule pour mourir. Le devenir cellulaire est déterminé en fonction de plusieurs paramètres comme le type cellulaire, à quel moment dans le cycle cellulaire est survenu l'irradiation ainsi que la dose reçue. Les évolutions possibles de l'avenir de la cellule sont reprises dans la figure 3.

## Arbre des évolutions possibles de la cellule

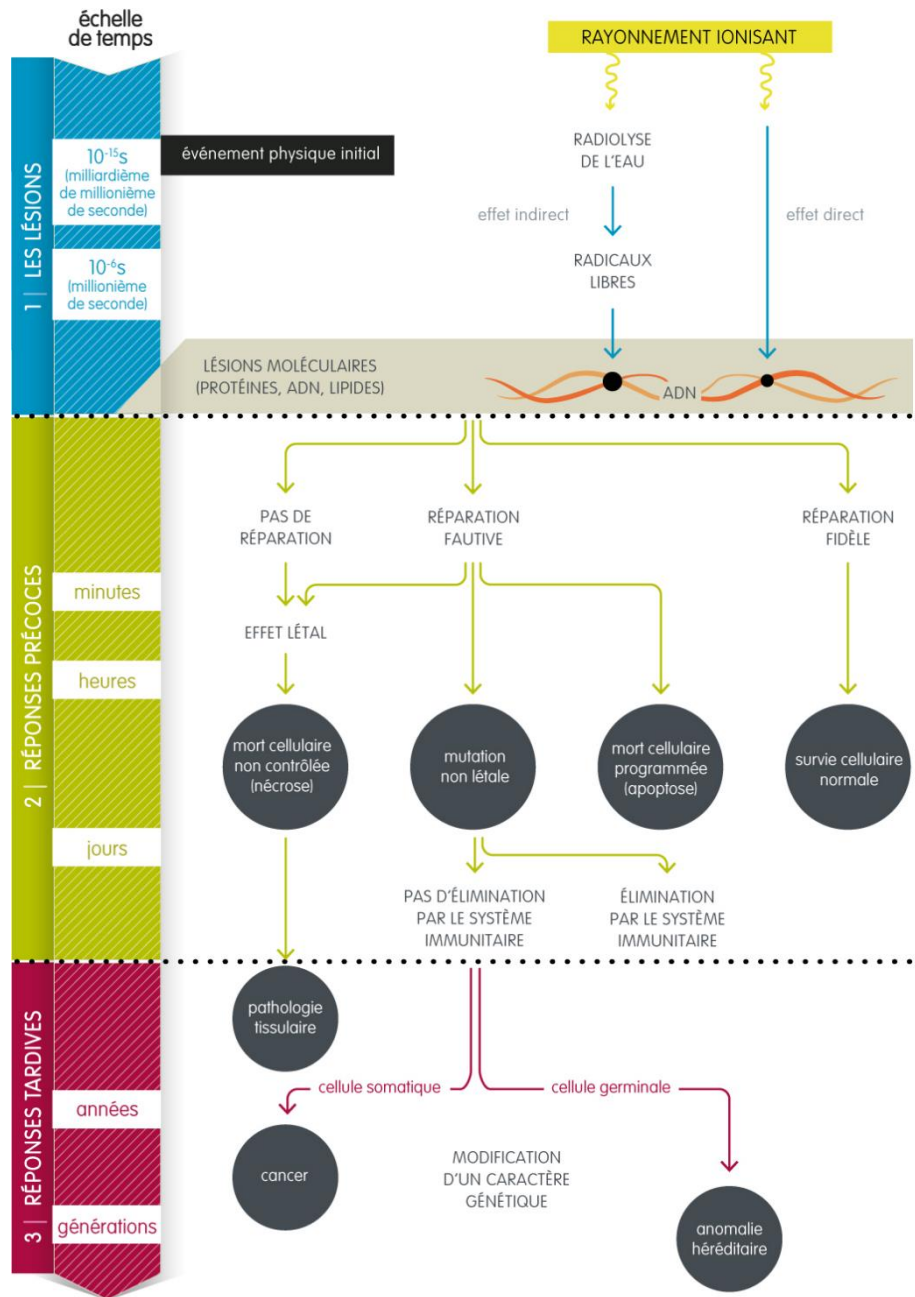


Figure 3 : Schéma de l'évolution de la cellule tiré de l'article « Les effets des rayonnements ionisants sur le vivant » du CEA de 2015

### 1.3. La Radiosensibilité des tissus

La radiosensibilité est maximale pour les cellules lorsqu'elles sont en phase G2 et M. Elle dépend du renouvellement cellulaire d'un tissu ; plus un tissu va se renouveler rapidement plus il sera radiosensible, cela s'explique par le fait que la cellule va rentrer plus souvent en

phases G2 et M du cycle cellulaire. Les tissus les plus radiosensibles sont l'intestin, le système hématopoïétique et les épithéliums cutanés. Les tissus les moins radiosensibles sont les os, le système nerveux et le poumon.

Les réactions tissulaires dépendent de la mort cellulaire. On distingue les réactions précoces qui impliquent la destruction des cellules souches progénitrices, un réservoir de cellules matures pour le tissu notamment au niveau de l'intestin qui est associée à des cascades de réactions inflammatoires. Les réactions tardives impliquent des stress oxydatifs chroniques et l'infiltration de cellules immunitaires associée à la production de cytokines. La réponse biologique à l'irradiation varie avec la radiosensibilité des tissus, la dose reçue, le débit de dose, la durée de l'exposition, le volume d'exposition, le degré de la réponse inflammatoire et l'âge de la personne et ses comorbidités.

La gravité des lésions dépend de la dose et de la durée pendant laquelle elle est délivrée ; une dose élevée, unique et rapide est plus nuisible que la même dose administrée sur des semaines. La surface d'exposition corporelle entre aussi en compte, par exemple pour une dose > 10 Gy corps entier la mort peut survenir tandis que pour la même dose délivrée en fractionnée et sur une zone ciblée sera mieux tolérée par l'organisme. Ce dernier cas s'apparente à la radiothérapie.

La radiothérapie est un traitement locorégional des cancers à visée curative, palliative ou symptomatique (SFRO, 2007). Il existe la radiothérapie dite « palliative » d'une part qui permet de ralentir la progression du cancer et de prolonger l'espérance de vie du patient et la radiothérapie dite « symptomatique » d'autre part qui permet d'améliorer le confort du patient dans un but antalgique pour une tumeur locorégionale avancée voire métastatique (SFRO,2007). La radiothérapie utilise la différence de radiosensibilité entre les cellules saines et tumorales, l'enjeu est d'administrer la dose suffisante afin de stériliser la tumeur tout en épargnant les tissus sains. Les doses sont délivrées en fractionnement conventionnel et varient de 45 à 80 Gy environ (SFRO, 2007).

## Partie 2 : Physiologie intestinale

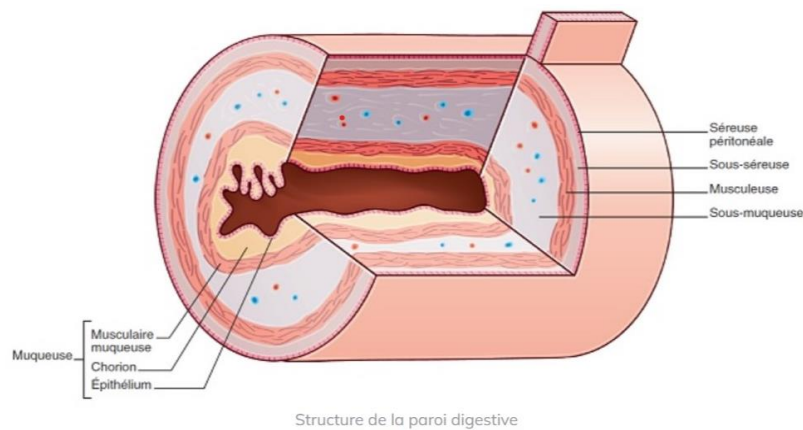
### 2.1. La structure anatomique intestinale et le processus de digestion

Les principales fonctions du tractus gastrointestinal sont la digestion, l'absorption, l'excrétion et la protection. Ces fonctions sont assurées grâce à une série d'organes ayant des rôles différents allant de la bouche jusqu'à l'anus. L'estomac et l'intestin grêle sont principalement responsables de la digestion et l'absorption tandis que le colon est impliqué dans l'absorption finale et la compaction des déchets avant l'élimination (Chen *et al.*,2010). L'intestin mesure environ 6 mètres de longueur chez l'homme et est divisé en trois parties : le Duodénum, qui est adjacent à l'estomac et permet de continuer la digestion en mélangeant les sels biliaires et pancréatiques essentiels pour la digestion et en assimilant les glucides, les lipides et les acides aminés. De plus, il permettra également d'agir sur le pH du contenu digestif en sortie d'estomac (Sjöblom *et al.*,2011). La deuxième partie est le Jéjunum, il est impliqué dans l'absorption de l'eau et des électrolytes ainsi que des glucides, des acides aminés et des lipides. La troisième partie est l'Illéon qui assure l'absorption des nutriments restants. Les parois du tractus gastrointestinal sont constituées de quatre mêmes couches à quelques différences près, il s'agit de la **muqueuse**, la **sous-muqueuse**, la **musculeuse** et la **séreuse** (Figure 4) (Marieb and Hoen,2012).

La muqueuse est la couche en contact avec le bol alimentaire, ses fonctions sont : la sécrétion du mucus, d'enzymes digestifs et d'hormones et l'absorption des nutriments dans le sang. **La muqueuse** est elle-même composée de trois parties : l'épithélium, en contact avec la lumière intestinale, la *lamina propria* formée de tissu conjonctif comprenant des réseaux de capillaires et de follicules lymphoïdes, et enfin la *lamina muscularis mucosae* constituée d'une fine couche de cellules musculaires lisses qui permet à l'intestin d'avoir cet aspect de repliements de la muqueuse augmentant la surface d'échange (Marieb and Hoen,2012).

**La sous-muqueuse** est formée d'un tissu conjonctif innervé et vascularisé, sa structure élastique permet à l'intestin de reprendre sa taille après les repas. Et enfin, **la musculeuse** constituée principalement de cellules musculaires lisses responsables du péristaltisme qui permet l'acheminement du bol alimentaire. **La séreuse** quant à elle, a pour fonction le

maintien structurel et la séparation des organes afin de limiter les frottements, elle va permettre la fixation de l'intestin au péritoine (Marieb and Hoen,2012).

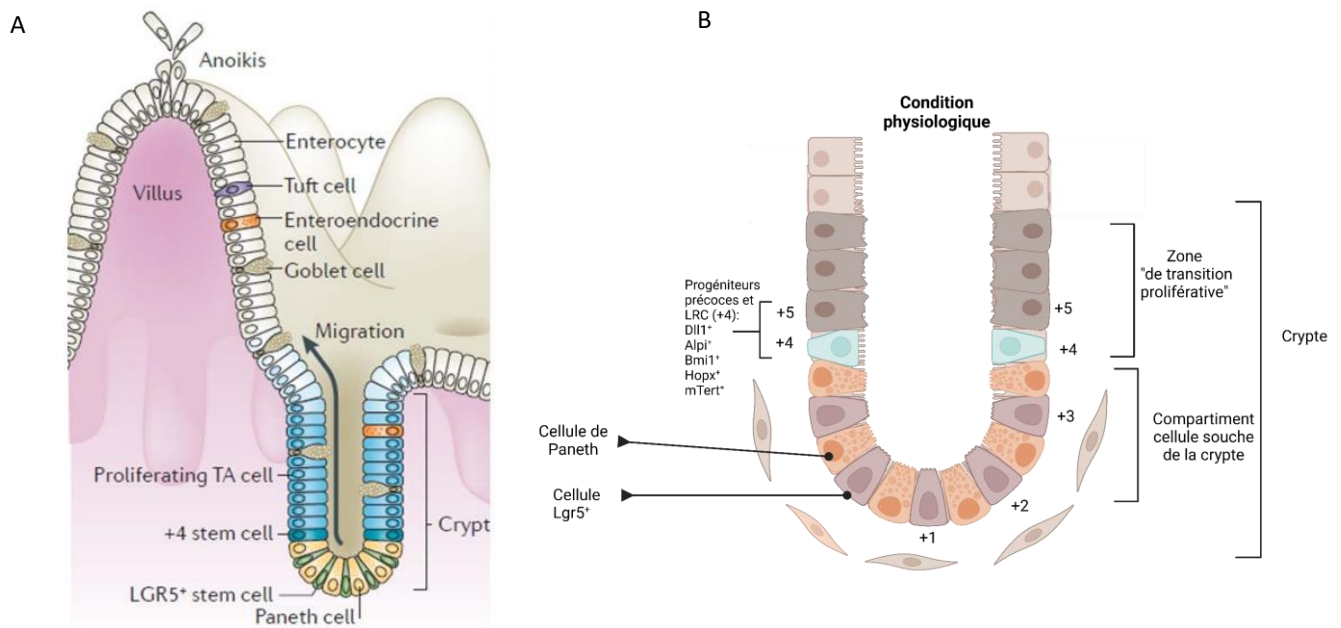


**Figure 4** : Schéma de l'organisation structurale de l'intestin grêle. Réalisé par Nicolas Brulport « Le système digestif | Le ghost de Nicolas (le-ghost-de-nicolas.fr) »

## 2.2. La lignée épithéliale de l'intestin grêle

L'épithélium intestinal n'est pas le même en fonction de sa position dans le tractus gastro-intestinal. L'épithélium de l'intestin grêle est monostratifié, il s'organise selon un axe crypte-villosité (*Figure 5A*), les cryptes de Lieberkühn sont un compartiment prolifératif et les villosités un compartiment différencié (Potten,1990) (Van der Flier and Clevers,2009). Le compartiment des villosités est constitué de cellules différenciées de la lignée épithéliale et la crypte se divise en deux compartiments celui des cellules souches qui se trouve au fond de la crypte et un compartiment de transition prolifératif situé dessus du compartiment cellule souche de la crypte. Le compartiment cellule souche de la crypte est constitué de cellules souches exprimant le Lgr5 dite cellules Lgr5<sup>+</sup> et espacées par des cellules de Paneth. Les cellules Lgr5<sup>+</sup> sont des cellules souches pluripotente capables d'auto-renouvellement afin de maintenir un stock en cellules souches (Cheng and Leblond,1974). Les cellules Lgr5<sup>+</sup> et cellules de Paneth vont proliférer et donner naissance aux progéniteurs cellulaires du compartiment de transition prolifératif (Barker *et al.*,2014) (*Figure 5A*). Les cellules progénitrices de ce dernier compartiment vont maturer et se spécialiser en migrant le long de l'axe crypte-villosité pour donner tous les types cellulaires de l'intestin grêle. Trois jours après s'être différenciées en cellules spécialisées, les cellules épithéliales intestinales vont atteindre l'apex de la villosité, et y mourir par anoïkis, puis relarguées dans la lumière intestinale (Hall *et al.*,1994).

Le renouvellement de l'épithélium intestinal s'effectue tous les 4 à 5 jours.



**Figure 5 :** Schéma représentant l'organisation des villosités et cryptes. A) Schéma récapitulatif l'axe crypte/villosité. Tiré de l'article : Barker, N. (2014). *Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. Nature reviews Molecular cell biology, 15(1), 19-33.* B) Schéma de la crypte portant la numérotation des cellules de la crypte. Modifié et basé sur l'article : Li, V. S. (2019). *Yap in regeneration and symmetry breaking. Nature cell biology, 21(6), 665-667.*

Les villosités sont constituées de différents types cellulaires, une partie appartient à la lignée absorbante (les entérocytes) et l'autre partie à la lignée sécrétrice.

Les entérocytes représentent la majorité des cellules de la villosité, environ 80 % des cellules de l'épithélium intestinal (Barker *et al.*, 2007), (Van der Flier and Clevers, 2009). Les entérocytes permettent l'absorption des nutriments (Engevik and Goldenring, 2018), ce processus est possible grâce :

- ✓ A la présence de microvillosités dites « bordure en brosse » au niveau de leur membrane apicale en contact avec la lumière intestinale qui permettent d'augmenter la surface d'échange avec les nutriments
- ✓ A la sécrétion d'enzymes protéolytiques comme la lactase ou la sucrase-isomaltase par exemple, qui agissent sur la digestion des aliments
- ✓ A la présence de transporteurs protéiques au niveau de la bordure en brosse afin de terminer le processus d'absorption des nutriments

La lignée sécrétrice contient les **cellules entéro-endocrines**, les **cellules caliciformes** dites cellules à mucus (en anglais Goblet cell), les **cellules Tuft** (Figure 5A). Les **cellules caliciformes** sont majoritaires au sein de la lignée sécrétrice, environ 4% de l'épithélium total (Barker *et al.*,2007), leur nombre augmente en fonction de leur localisation dans l'intestin (Specian and Oliver,1991). Elles produisent des mucines, des glycoprotéines constituées en partie d'O-Glycanes (Johansson and Hansson,2016) constituant le mucus qui va permettre de protéger l'intestin grêle des agressions. Cependant, les bactéries peuvent travers cette « barrière » mais de manière limitée dû à la présence de molécules antimicrobiennes (Johansson and Hansson,2016). De plus, la barrière intestinale doit être sélective afin de laisser passer les nutriments et faire barrière aux pathogènes, d'où l'existence de jonctions serrées qui permettent de lier les cellules épithéliales entre elles et refermer les espaces intercellulaires (Schneeberger *et al.*,1992), ces jonctions serrées se nomme « Zonulae Occludentes » (Förster,2008). Les cellules **entéro-endocrines** vont sécréter des peptides ou des hormones essentiels à la physiologie de l'intestin comme la digestion et la protection (Marieb and Hoen,2012). Les **cellules Tuft** sont impliquées dans la réponse immunitaire intestinale. En effet, elles ont la capacité de sécréter de l'interleukine 25 (IL-25) ainsi que de l'acétylcholine (Schneider *et al.*,2019). L'expression de l'IL-25 est nécessaire afin d'assurer l'homéostasie des cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2) localisées au niveau de la *lamina propria*, ces ILC2 vont sécréter de l'interleukine 13 (IL-13), une molécule responsable de la régulation positive de la différenciation des cellules Tuft et des cellules de Paneth (Von Moltke *et al.*,2016). Une étude a montré que le nombre de cellules Tuft augmentait significativement en réponse à une infection parasitaire et induisait l'hyperplasie des cellules à mucus (Gerbe *et al.*,2016). Un dernier type cellulaire particulier et appartenant à la lignée sécrétrice est les **cellules de Paneth**. Elles ne sont pas situées dans le compartiment des villosités mais à la base de la crypte et sécrètent du lysozyme, une molécule anti-microbienne contenue dans leurs granules. Ces cellules sont uniquement retrouvées dans l'intestin grêle. Elles permettent également le maintien de l'homéostasie de la crypte, une fonction importante de ces cellules (Sato *et al.*,2011). En effet, les cellules de Paneth sécrètent des facteurs essentiels à la survie et la prolifération des cellules souches comme « l'epidermal Growth Factor » (EGF), un ligand impliqué dans la signalisation des MAP-kinases, le « Wingless-integration » (Wnt-3) qui est un ligand de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine et le DLL4 « Delta Like canonical Nocth ligand 4 » un ligand de la signalisation NOTCH (Sato *et al.*,2011) (Pitulescu *et al.*,2017).

Les cellules progénitrices qui vont donner naissance aux cellules de Paneth vont migrer vers le bas de la crypte et y rester au moins 3 semaines par opposition aux cellules progénitrices qui vont donner naissance aux autres types cellulaires de l'intestin qui migrent vers le haut de la villosité. Ces phénomènes sont régulés par plusieurs voies de signalisations (Ireland *et al.*,2005). Lors du processus de différenciation, les cellules expriment EphB2 et EphB3, deux récepteurs à tyrosine kinase, qui une fois activés par des ligands sécrétés par les cellules des villosités vont générer une force répulsive, forçant les cellules de Paneth à migrer au fond de la crypte (Van der Flier and Clevers,2009). Ainsi, il existe des cellules de Paneth ayant la caractéristique de cellule souche et des cellules de Paneth matures qui n'expriment pas de marqueurs de prolifération et qui quittent le cycle cellulaire (Basak *et al.*,2014) (Jones *et al.*,2019). Une étude a montré que mises en culture les cellules de Paneth matures perdent la capacité à stimuler la formation d'organoïdes intestinaux (Takeda *et al.*,2011). Après irradiation, les cellules de Paneth ont la capacité d'entrer à nouveau dans le cycle cellulaire et de se différencier en différents types cellulaires de l'intestin (Mei *et al.*,2020).

L'hypothèse que toutes les cellules épithéliales provenaient d'un seul précurseur a été pour la première fois démontrée en 1966 (Corpron *et al.*,1966) et en 1968 (Rubin *et al.*,1968). En 1974, une étude a montré que lorsque des souris recevaient de la thymidine radioactive, les cellules à la base de la crypte phagocytèrent une partie des cellules mortes, une vacuole était ainsi créée correspondant à un phagosome radiomarqué dans les cellules Lgr5<sup>+</sup>. Grâce à ce marquage, les auteurs ont pu suivre l'évolution du devenir de ces cellules dans le tissu. Dès 12 heures après l'injection de thymidine radioactive, le marquage a été repéré au niveau du compartiment des progéniteurs cellulaires puis 24 heures post-injection le marquage est présent le long de la villosité intestinale au sein de toutes les cellules différenciées de l'épithélium de l'intestin grêle. Ainsi, cette étude a montré pour la première fois que les cellules à la base de la crypte donnaient naissance à toutes les cellules de l'épithélium de l'intestin grêle et ont été considérées comme les cellules souches de l'intestin (Cheng and Leblond,1974). C'est en 1978 que Potten *et al.* (Potten *et al.*,1978) montrent l'existence d'une cellule en position +4 située au-dessus des cellules de Paneth faisant partie du compartiment de la crypte. Les cellules de la crypte sont numérotées en fonction de leur position (*Figure 5*), toutes les cellules de la position 1 à 5 sont responsables du renouvellement de toutes les



cellules de l'épithélium intestinal avec une longue durée de vie (Bjerknes and Cheng,1999) (Figure 6).

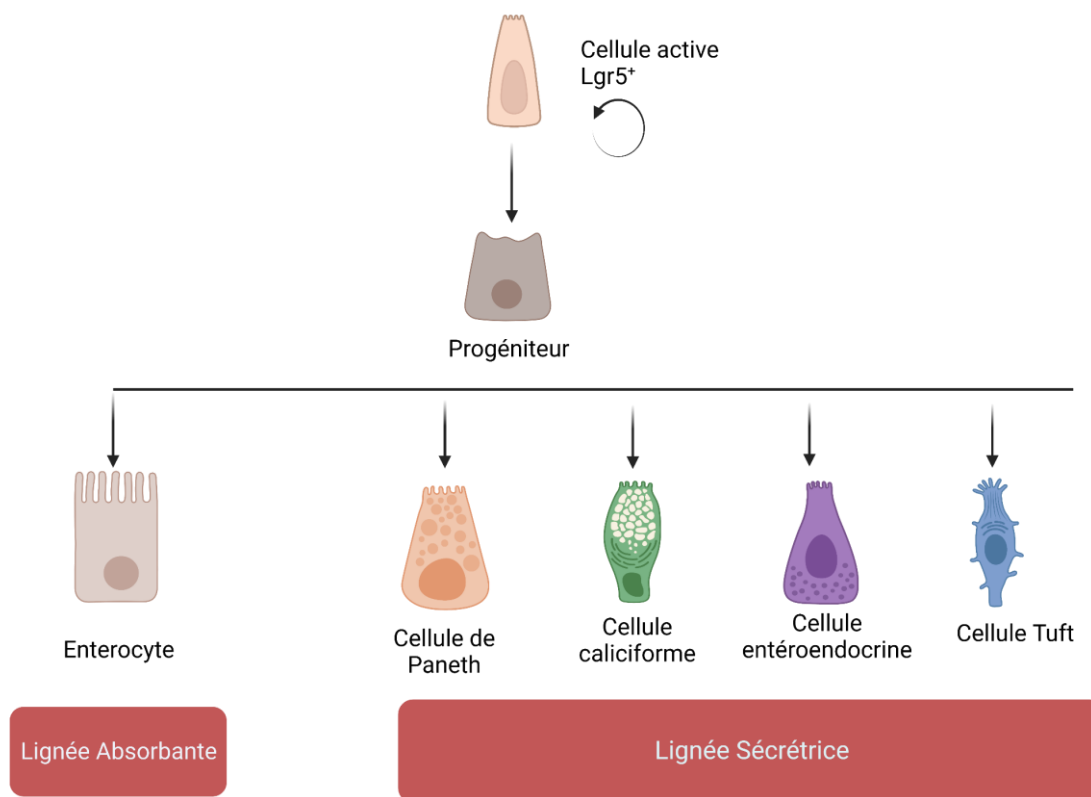


Figure 6 : Schéma représentant les différentes lignées cellulaires de l'épithélium intestinal. Les cellules Lgr5<sup>+</sup> donnent des progéniteurs qui vont se différencier en cellules de la lignée « sécrétrice » ou en cellules de la lignée « absorbante ». Les cellules en position +4 peuvent repeupler la crypte en cellules souches en cas de besoin. Créé avec Biorender.com

L'identification du marqueur « Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 » (Lgr5) porté par les cellules souches intestinales, a permis de caractériser de manière plus précise les cellules souches de la crypte intestinale (Barker *et al.*,2007). Grâce à des techniques de traçage des lignées cellulaires, il a été montré par l'équipe d'Hans Clevers que les cellules Lgr5<sup>+</sup> étaient bien à l'origine des cellules différenciées de l'intestin grêle (Barker *et al.*,2007). Les cellules souches Lgr5<sup>+</sup> de la base de la crypte vont entrer en division dite asymétrique donnant une cellule souche en prolifération, cette cellule souche va subir au moins 4 à 5 divisions avant de migrer le long de l'axe crypte-villosité (Van der Flier and Clevers,2009). IL a été également montré qu'en présence de cellules Lgr5<sup>+</sup>, de mini intestin appelés « organoïdes » étaient formés *in vitro* (Sato *et al.*,2009).

Les cellules positionnées en position +4 et définies comme faisant partie du compartiment de la crypte portent le marqueur Bmi1. La déplétion de ces cellules exprimant Bmi1 entraîne une perte des cryptes ; ce qui a suggéré que les cellules Bmi1<sup>+</sup> sont essentielles dans le maintien de l'homéostasie de la crypte (Sangiorgi *et al.*,2008). Ce premier marqueur a permis de différencier les cellules Lgr5<sup>+</sup> des cellules en position +4. mTert a été identifié comme un autre marqueur des cellules en position +4. Il a été montré que les cellules exprimant mTert donnaient naissance à tous les types de cellules intestinales différenciées (Montgomery *et al.*,2011). Hopx est également un marqueur des cellules en position +4 (Takeda *et al.*,2011), et enfin Lrig1 (Powell *et al.*,2012) (*Figure 6*). Grâce à l'identification de tous ces marqueurs, les cellules en position +4 ont pu être décrites de manière plus précise. Différentes des autres cellules de la base de la crypte, elles sont quiescentes et sont « label-retaining » (Buczacki *et al.*,2013) (Takeda *et al.*,2011). Après irradiation, il a été montré que des cellules portant les marqueurs des cellules en position +4 avaient la capacité d'entrer à nouveau dans le cycle cellulaire et de revenir à l'état de cellules souches, ainsi les cellules en position +4 ont été définies comme un « réservoir » de cellules pour le compartiment de la crypte en cas de lésion (Buczacki *et al.*,2013) et de se différencier en cellules Lgr5<sup>+</sup> et ainsi repeupler la crypte (Jones and Dempsey, 2016) (Tetteh *et al.*,2016).

### 2.3. Les voies majeures de signalisation de prolifération et de différenciation des cellules épithéliales intestinales

Les cryptes permettent le renouvellement de l'épithélium intestinal, et leur environnement agit sur l'homéostasie du compartiment souche de la crypte. Cet environnement appelé « niche » fournit des signaux extracellulaires et des facteurs afin de maintenir l'auto-renouvellement des cellules souches (Morisson and Spradling,2008).

Cette niche s'apparente à un microenvironnement contenant des cellules stromales mésenchymateuses et des cellules immunitaires qui par leurs molécules sécrétées agissent sur le compartiment cellule souche. Les cellules de Paneth participent également à l'homéostasie du compartiment souche. Il a été montré que lorsque les cellules de Paneth étaient déplétées *in vivo*, une perte des cellules Lgr5<sup>+</sup> était observée et que *in vitro* les cellules de Paneth pouvaient être remplacées par un ajout de Wnt dans le milieu, indiquant ainsi

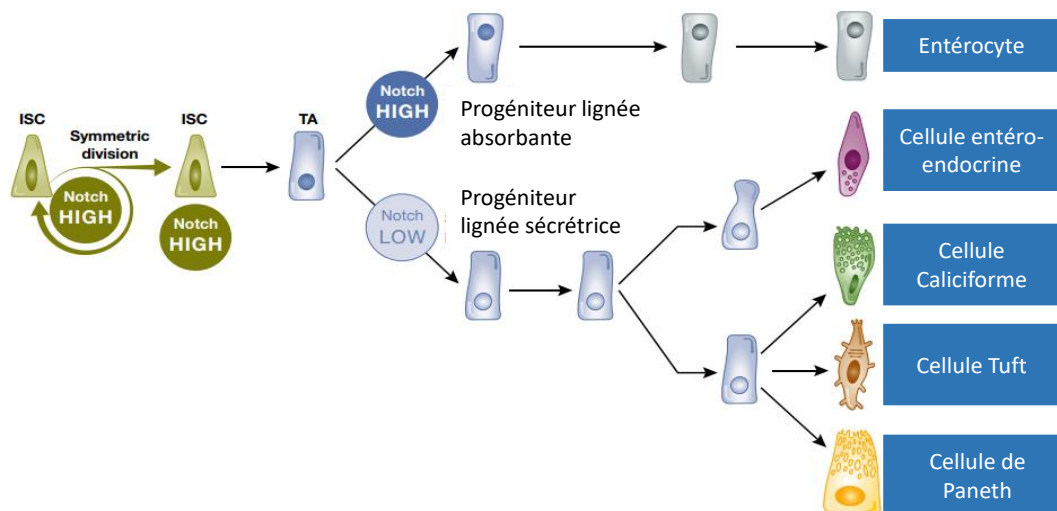
l'influence du microenvironnement dans l'homéostasie des cellules souches de la crypte (Sato *et al.*,2011).

Dans chaque crypte, il existe environ 14 cellules Lgr5<sup>+</sup> et 10 cellules de Paneth (Snippert and Clevers,2010). Les cellules de Paneth vont sécréter des facteurs de croissance tels que « l'epidermal growth factor » (EGF), le « Transforming Growth Factor » TGF- $\beta$  ainsi que les ligands de la voie Notch DLL1, DLL4, Wnt-3 ayant une influence sur l'homéostasie des cellules Lgr5<sup>+</sup> (Clevers and Bevins, 2013).

Les cellules Lgr5<sup>+</sup> de la crypte s'auto-renouvellent et se divisent en cellules progénitrices. Il existe deux processus de division, le premier est la division dite symétrique où 1 cellule souche va donner 2 cellules souches, et le second est la division asymétrique où 1 cellule souche donne 1 cellule souche et 1 cellule progénitrice (Barker *et al.*,2014). L'équilibre entre la prolifération et le devenir d'une cellule (sécrétrice ou absorbante) est assuré par des voies de signalisation telles que les voies Wnt et Notch, leur inhibition entraîne une perte des cellules souches de la crypte (Van Es *et al.*,2005,2012). Notch est une protéine membranaire dont la transduction de son signal est initiée par la liaison d'un ligand de type Delta like (DLL 1, 3 et 4) ou de type ligand Jagged 1 et 2 (JAG 1 et 2), la voie est activée par des clivages protéolytiques qui génèrent un domaine intra-cellulaire appelé le « Notch Intracellular Domain » (NICD), NICD se transloque au noyau et interagit avec le facteur de transcription RBP-J ce qui active les gènes cibles (Kopan and Ilagan,2009). Le facteur de transcription *Olfm4* est considéré comme un facteur de transcription cible de Notch pour les cellules Lgr5<sup>+</sup> (Van dussen *et al.*,2012). Cette voie de signalisation Notch activée (*via* les récepteurs Notch 1 et Notch 2) par les ligands DLL1 et DLL4 est essentielle pour la prolifération des cellules Lgr5<sup>+</sup> (Pellegrinet *et al.*,2011). Les cellules de Paneth expriment DLL4 et de manière transitoire DLL1 (Sato *et al.*,2011) (Stamataki *et al.*,2011).

Dans l'intestin, la voie de signalisation Notch est basée sur la transmission de signaux entre cellules juxtaposées. Une régulation négative empêche la différenciation des cellules Lgr5<sup>+</sup>, maintenant ainsi une réserve. Cette régulation est possible grâce à l'inhibition latérale. Cette inhibition permet l'activation différentielle de Notch dans les cellules voisines afin de générer différents types cellulaires (Sancho *et al.*,2015). Le principe de cette inhibition est que l'activation de Notch réprime la production de ligand de Notch (DELTA), ainsi la cellule ayant une activité Notch plus faible produit plus de ligand. Plus de ligand à la surface de la cellule

active la signalisation Notch dans la cellule voisine, ce qui entraîne une diminution de la production de ligand dans cette cellule. Cela permet à la cellule où l'activité de Notch est plus faible d'augmenter encore sa production de ligand, car elle reçoit en retour un signal inhibiteur affaibli de la part de ses voisines. Ce mécanisme permet de maintenir un équilibre entre les lignées absorbantes (Notch High) et sécrétrices (Notch Low) (Sancho *et al.*, 2015) (Figure 7).

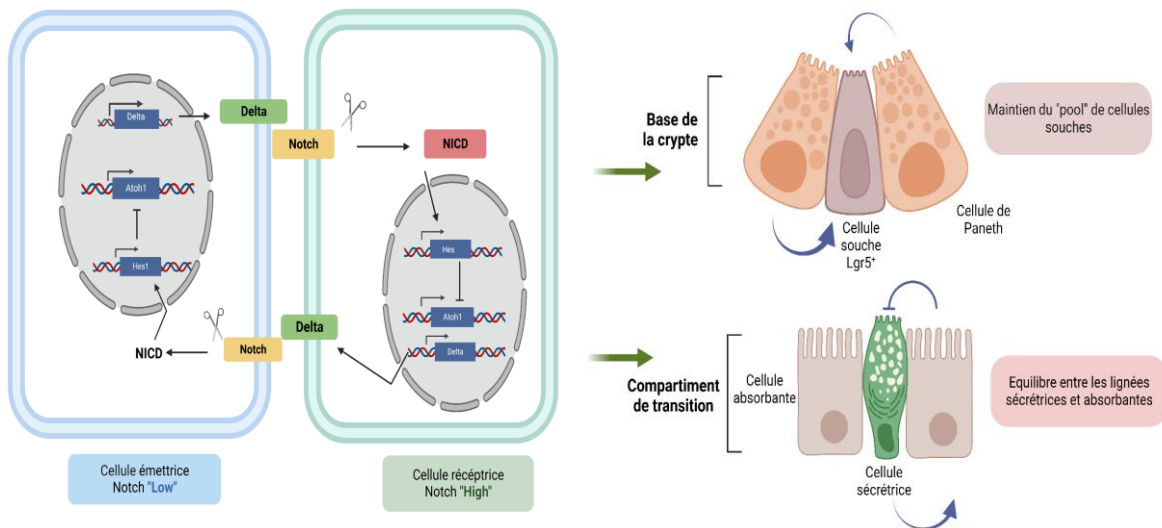


**Figure 7 :** Schéma illustrant les destins cellulaires en fonction de l'activation de la voie de signalisation Notch. Schéma modifié et basé sur l'article : Sancho, R., Cremona, C. A., & Behrens, A. (2015). Stem cell and progenitor fate in the mammalian intestine: Notch and lateral inhibition in homeostasis and disease. *EMBO reports*, 16(5), 571-581.

Au niveau de la crypte, l'interaction cellule-cellule se fait entre les cellules de Paneth qui sont « Notch Low » et les cellules Lgr5<sup>+</sup> qui sont « Notch High » (Sasaki *et al.*, 2016). L'activation de la voie Notch bloque la différenciation des cellules Lgr5<sup>+</sup> ce qui permet l'homéostasie de la crypte. Une étude a montré que l'inhibition de la signalisation Notch chez la souris entraînait une perte des cellules Lgr5<sup>+</sup> et qu'une hyperplasie des cellules de la lignée sécrétrice était observé en comparaison des cellules de la lignée absorbante (VanDussen *et al.*, 2012). L'activation de la voie Notch permet d'augmenter la population de cellules progénitrices prolifératives (Fre *et al.*, 2005). Le destin de la cellule dépend de la puissance du signal Notch que la cellule reçoit (Sancho *et al.*, 2015) (Figure 7).

Cette signalisation se met en place *via* le contrôle de la proportion entre les facteurs de transcription HES1 (stimulant le lignage absorbant) et MATH1 ou ATOH1 (stimulant la lignée sécrétrice). Il a été montré que lorsque MATH1 est inactivé, une perte des cellules de la lignée sécrétrice était observée, les entérocytes n'étant pas impactés (Yang *et al.*, 2001), (Shroyer *et al.*, 2007). En revanche, lorsque HES1 est inactivé, peu d'effets sur les cellules épithéliales

intestinales sont observés pouvant s'expliquer par la compensation par d'autres facteurs de transcription appartenant à la même famille. De plus, une surexpression de la signalisation Notch entraînerait une expansion des progéniteurs cellulaires (Fre *et al.*,2005) (Carulli *et al.*,2015). Une activation forte de Notch au sein de la cellule réceptrice réduit sa capacité à activer sa cellule voisine, ainsi une cellule dont la voie Notch est active exprimera peu de ligands Notch (Figure 8).



**Figure 8 :** Schéma illustrant le mécanisme de l'inhibition latérale via la voie NOTCH. La signalisation Notch est initiée lorsqu'un ligand Delta exprimé à la surface de la cellule se lie au récepteur Notch exprimé à la surface d'une cellule opposée. Le Notch fixé à la membrane est alors clivé par l'ADAM10 puis par le complexe  $\gamma$ -sécrétase pour libérer le fragment intracellulaire de Notch (NICD). Ce fragment est transloqué dans le noyau et s'assemble en un complexe d'activation transcriptionnelle qui diminue la répression des gènes cibles de Notch tels que la famille Hes. La famille Hes de répresseurs transcriptionnels contrôle le Delta et une variété de gènes de différenciation/prolifération. *Modifié et Créé avec Biorender.com à partir de l'article : Sancho, R., Cremona, C. A., & Behrens, A. (2015). Stem cell and progenitor fate in the mammalian intestine: Notch and lateral inhibition in homeostasis and disease. EMBO reports, 16(5), 571-581.*

Lors de mutations ou de dérégulations de la voie de signalisation Notch après des dommages radio-induits ou lors d'inflammations de l'intestin, la présence de cellules sécrétrices immatures ou un nombre insuffisant de celles-ci peuvent être observés. Ce qui réduirait l'efficacité de la fonction intestinale et potentialiserait l'inflammation (Sancho *et al.*, 2015). De manière intéressante, il existerait un lien entre les jonctions serrées de la barrière intestinale et la voie Notch, en effet, une surexpression de Claudin-1, une molécule intervenant dans la composition des jonctions serrées, activerait la voie Notch (Pope *et al.*,2014). IL a été également montré que la délétion d'un marqueur des cellules Tuft réduisait à la fois l'expression de Claudin-1 et Notch1 ce qui altérerait la réparation épithéliale après une irradiation (May *et al.*,2014).

La voie Wnt/ $\beta$ -catenin est une voie également importante pour le maintien de l'auto-renouvellement des cellules souches (Clevers *et al.*,2014). Dans l'intestin, l'expression des facteurs Wnt-3 (produits par les cellules de Paneth), Wnt-6, Wnt-9b (issus des cellules de Paneth et des cellules progénitrices), Wnt-2b, Wnt-4, Wnt-5a et Wnt-5b (issus des cellules sous-jacentes à l'épithélium) sont indispensables pour l'auto-renouvellement des cellules Lgr5<sup>+</sup>. (Gregorieff *et al.*,2005). De plus, d'autres sources de Wnts provenant du compartiment sub-épithélial agissent sur les cellules souches de la crypte. Deux voies peuvent être initiées lorsque les facteurs se fixent aux récepteurs : la voie Wnt/ $\beta$ -catenin ou canonique, activée dans l'homéostasie des cellules Lgr5<sup>+</sup> (Clevers *et al.*,2014) et la voie non canonique Wnt/calcium qui peut être activée dans le côlon afin d'initier la régénération de l'épithélium (Miyoshi *et al.*,2012). La voie canonique Wnt est activée lorsqu'un ligand Wnt se fixe à un récepteur de la famille « Frizzled » (Fz) et à un corécepteur (LRP5/6) ce qui entraîne l'inhibition de l'ubiquitination de la  $\beta$ -catenin. Sa translocation au noyau et son interaction avec le facteur de transcription TCF and d'autres cofacteurs permet la transcription des gènes cibles de Wnt (Kuhnert *et al.*,2004). R-spondin (Rsp), un ligand des récepteurs Lgr4/5/6 considéré comme un agoniste de Wnt est un potentialisateur de la signalisation Wnt. Il a été montré que lorsque des souris KO pour TCF4 et  $\beta$ -catenin étaient utilisées, la prolifération des cryptes était alors observée, soulignant le caractère essentiel de la voie Wnt/  $\beta$ -catenin (Ireland *et al.*,2004) (Kuhnert *et al.*,2004) (Van Es *et al.*,2012a) Cependant, lorsque Rspo est injecté, une hyperprolifération des cryptes est observée (Kim *et al.*,2005). La voie Hippo-YAP1 a montré être la plus active après des dommages à l'intestin en inhibant la voie Wnt et Notch, elle entraîne la différenciation précoce des cellules de l'épithélium intestinal (Gregorieff *et al.*,2015) (Imajo *et al.*,2015).

L'activation des voies Notch et Wnt est forte dans la crypte, ce qui permet la différenciation des cellules dans les compartiments supérieurs. Cependant, une autre voie est essentielle afin d'initier la différenciation terminale des cellules au niveau des villosités, il s'agit de la voie BMP. La fonction du « Bone Morphogenic Protein » (BMP) est d'inhiber la prolifération des cellules souches et de promouvoir leur différenciation. BMP peut être exprimé par les cellules sous-jacentes à l'épithélium et les cellules épithéliales des villosités (Haramis *et al.*,2004) (Hardwick *et al.*,2004). Les activités de BMP et de Wnt forment un gradient inversé, c'est-à-dire qu'il y a plus de Wnt au niveau de la crypte que de BMP et progressivement le long de la

villosité le niveau de Wnt diminue et celui de BMP augmente afin de garder les cellules souches de la crypte dans un état d'auto-renouvellement et les progéniteurs de se différencier en cellules fonctionnelles de l'intestin (Zhu *et al.*,2021). BMP régule négativement les cellules souches par la présence d'antagoniste de BMP (Qi *et al.*,2017) tels que Gremlin 1/2 ou encore Noggin (Sneddon *et al.*,2006) (Kosinski *et al.*,2007). Lorsque cette voie est dérégulée, une perte de l'expression des marqueurs *Lgr5*, *olfm4* et *Ascl2* est observée (Qi *et al.*,2017).

#### 2.4. Les autres types cellulaires impliqués dans la niche de la crypte

Au niveau du tissu du mésenchyme il existe d'autres cellules agissant sur le compartiment de la crypte (Zhu *et al.*,2021). Les cellules immunitaires résidentes, comme les « innate lymphoid cells » (ILCs) sont impliquées dans la régulation de la régénération intestinale comme les ILC2, sécrétant de l'interleukine 13 (IL-13) capable d'activer la signalisation *via* le IL-13R au niveau des cellules *Lgr5*<sup>+</sup> afin d'assurer l'homéostasie de la crypte (Zhu *et al.*,2019). Après des dommages à l'intestin, les ILCs sécrètent de l'interleukine IL-22 qui va aller stimuler la prolifération des cellules souches de la crypte et initier la régénération tissulaire (Lindermans *et al.*,2015 (Figure 9).

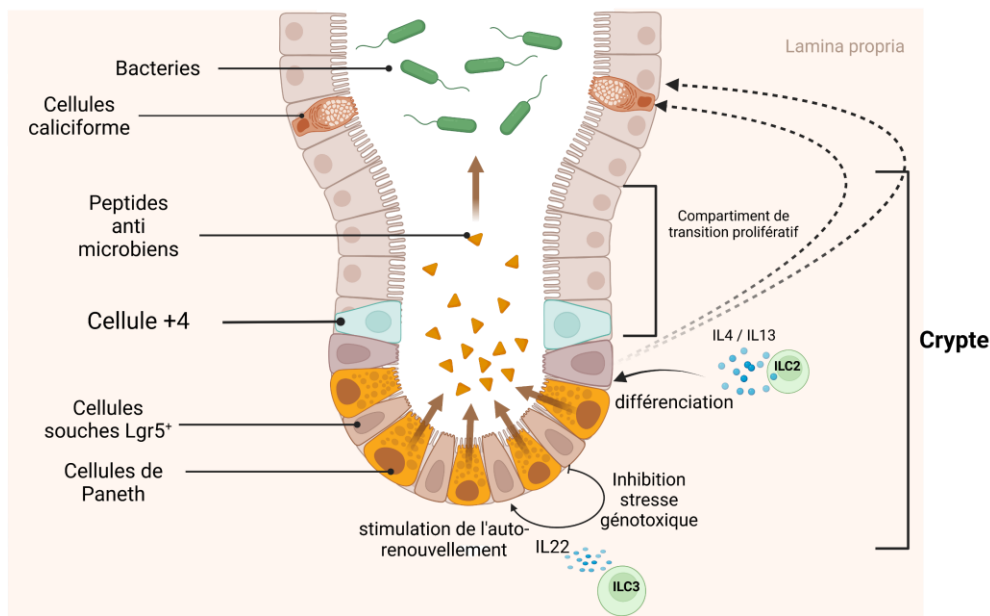


Figure 9 : Schéma illustrant les relations entre les cellules immunitaires ILC « Innate lymphoid cells » et les cellules de la base de la crypte. Les ILC2 et 3 vont produire des cytokines qui vont interagir avec les cellules de la base de la crypte. Créé avec Biorender.com

Il a été montré qu'après irradiation les cryptes pouvaient être protégées lorsque l'apoptose des cellules endothéliales était inhibée, mettant en avant le fait que les cellules apoptotiques endothéliales pouvaient envoyer des signaux de stress aux cellules souches (Paris *et al.*,2001). Ces signaux restent actuellement méconnus cependant, les métabolites relargués par les cellules apoptotiques pourraient agir comme messenger (Medina *et al.*,2020).

Une étude a montré qu'il existait des cellules capables de sécréter du Wnt-2b et Wnt-4 au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle, il s'agit des péricytes (Kim *et al.*,2020). Ces cellules peuvent être identifiées avec notamment deux marqueurs Cspg4<sup>+</sup>, Ng2<sup>+</sup>. Lorsque la sécrétion de Wnt est bloquée au niveau des péricytes, une réduction du nombre de cellules souches de l'intestin a été observée cependant, la prolifération est restée normale (Kim *et al.*,2020).

En résumé, de nombreuses cellules stromales, épithéliales et immunitaires agissent ensemble afin de produire divers signaux formant une niche afin de réguler l'homéostasie des cellules souches de la crypte comme l'auto-renouvellement et la différenciation cellulaire. Les cellules de Paneth ne sont pas essentielles pour l'homéostasie des cellules Lgr5<sup>+</sup> en situation physiologique, cependant dans un contexte lésionnel, les cellules de Paneth jouent un rôle crucial, car elles contribuent aux signaux de la niche et permettent de stimuler les CBC (Zhu *et al.*,2021). Des populations appartenant aux cellules stromales au niveau du compartiment sub-épithélial sont essentielles afin de produire des facteurs trophiques agissant sur l'homéostasie de la crypte et ont montré après l'apparition de dommages à l'intestin leur capacité à se développer et à promouvoir l'activité des cellules Lgr5<sup>+</sup> et la réparation de l'intestin (Zhu *et al.*,2021).

## Partie 3 : Le syndrome gastro intestinal

### 3.1. L'exposition accidentelle

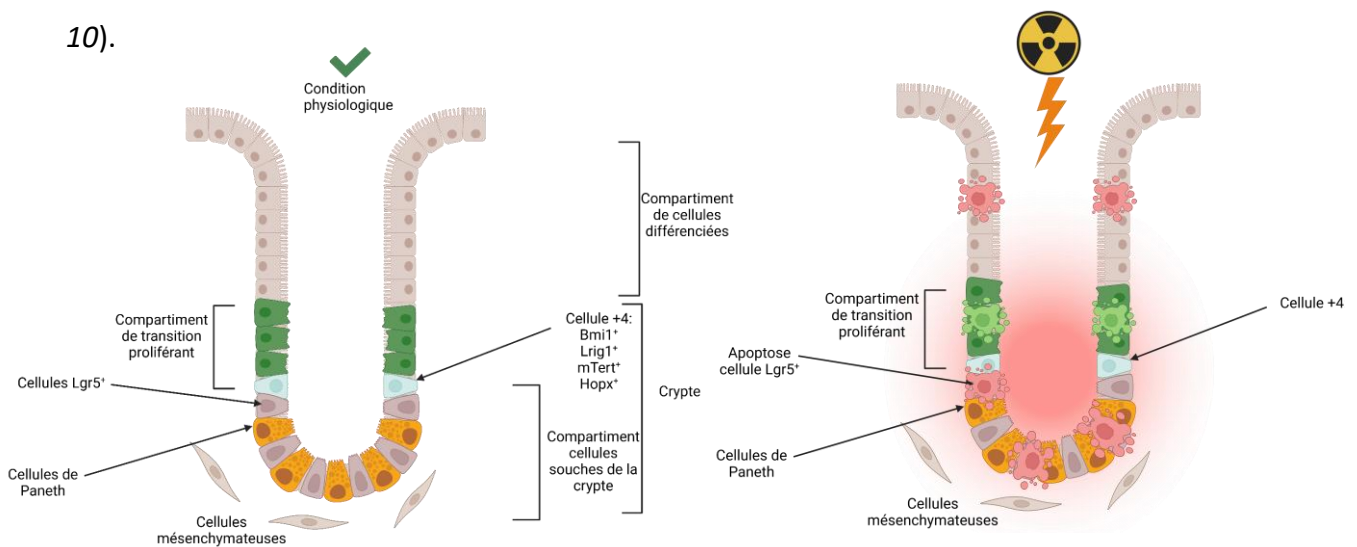
L'exposition accidentelle à des doses d'irradiation moyennes à fortes peut conduire à l'apparition des syndromes regroupés sous le nom de « Syndrome Aigu d'Irradiation » et qui selon la dose, la nature du rayonnement, la durée d'exposition et la surface corporelle exposée peuvent conduire à la mort de la personne irradiée. Ces syndromes sont : le syndrome hématopoïétique qui survient pour des doses <6 Gy (Gray) en corps entier et en dose unique. Ce syndrome est le premier syndrome radio-induit mis en jeu chez l'homme dans



le cas d'une exposition externe partielle ou « corps entier ». Il se traduit par une aplasie médullaire plus ou moins sévère résultant essentiellement en des risques hémorragiques (thrombopénie) et infectieux (neutropénie). La moelle osseuse est la plus radiosensible. Il peut engager rapidement le pronostic vital du patient. Le syndrome gastro-intestinal lui, survient pour des doses >6 Gy corps entier et en dose unique et se caractérise par la destruction de la barrière intestinale. La phase initiale survient de quelques minutes à 24 heures après l'irradiation où les symptômes des organes irradiés commencent à apparaître.

### 3.2. Le Syndrome Gastro-intestinal

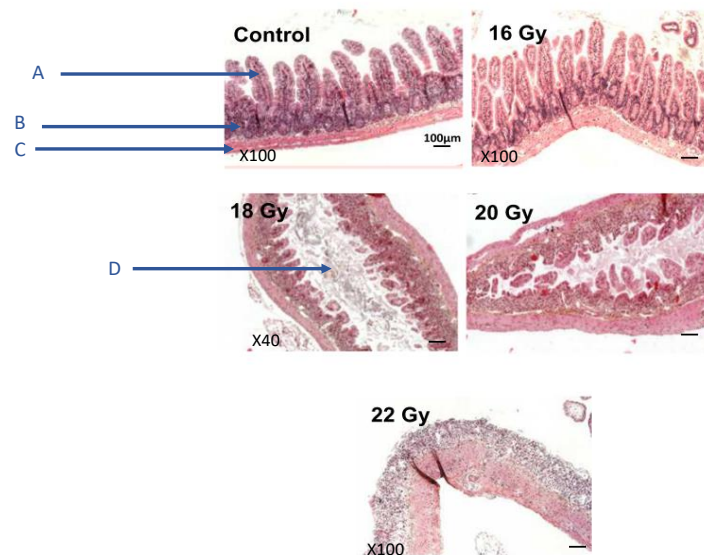
Le tractus gastro-intestinal est constitué de différentes parties, telles que l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le colon et le rectum. Le tractus gastro-intestinal étant en renouvellement permanent possède un turn-over très rapide ce qui en fait une cible sensible aux rayonnements ionisants (Quastler *et al.*,1956) (Potten *et al.*,1990); le turn-over complet de l'épithélium intestinal est situé entre 4 et 5 jours (Van der Flier and Clevers,2009) (Figure 10).



**Figure 10 :** Schéma représentant les effets de l'irradiation sur le compartiment de la crypte. Créé avec Biorender.com

Le syndrome gastro-intestinal survient pour des doses supérieures à 6 Gy en corps entier entraînant des lésions digestives importantes conduisant à la mort de l'individu (Dainiak and Albanese,2022). Au-delà de 6 Gray les cellules souches de la crypte intestinale ne peuvent plus produire suffisamment de cellules afin de repeupler les villosités, ce qui résulte en un raccourcissement des villosités associé à une diminution de l'absorption intestinale des

nutriments. Les cellules constituant les villosités prennent un aspect « dysplasique » avec des noyaux volumineux et gonflés (Hendry and Potten, 1995). Le compartiment cellule souche est perdu (stérilisation) et la production cellulaire est drastiquement limitée, l'épithélium intestinal ne peut pas être renouvelé. La perte des cellules par apoptose induit une « dénudation » de l'épithélium et des ulcérations apparaissent (*Figure 11*).



**Figure 11** : Photos représentatives de coupes histologiques d'intestin murin en fonction de la dose d'irradiation délivrée au niveau abdominal. A : les villosités, B : les cryptes, C : la musculature, D : la lumière intestinale. Tiré de l'article Bensemmane, L., Squiban, C., Demarquay, C., Mathieu, N., Benderitter, M., Le Guen, B., ... & Linard, C. (2021). *The stromal vascular fraction mitigates radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice*. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(1), 1-14.

Le syndrome gastro-intestinal est associé à une perte de 80% de la muqueuse intestinale (Quastler,1956). La barrière intestinale est altérée permettant ainsi aux bactéries et à d'autres agents pathogènes de s'infiltrer dans la circulation sanguine (Potten,1990), des pertes massives en électrolytes ainsi que l'apparition parfois de muqueuses intestinales dans les fèces sont observés. Cependant, il est intéressant de remarquer qu'aux doses d'apparition du syndrome gastro-intestinal, le syndrome hématopoïétique s'est déjà mis en place associé à une granulocytopénie et une thrombocytopénie entraînant une diminution drastique de la capacité du système immunitaire à contrer les infections et les saignements aggravent le syndrome gastro-intestinal. Plus les doses sont fortes plus les atteintes d'autres organes peuvent avoir un effet sur le tractus gastro-intestinal comme d'importantes brûlures pouvant provoquer une ischémie intestinale associée à une perte de la barrière intestinale (Maejima *et al.*,1984) (Deitch *et al.*, 1989).

Les symptômes associés à l'apparition du syndrome gastro-intestinal sont classés en fonction de leur temps d'apparition après l'exposition aux rayonnements ionisants et en fonction du type de symptômes (Conklin and Walker,1987). Les symptômes majoritaires sont des crampes abdominales et des diarrhées ainsi que des nausées et des vomissements, des céphalées peuvent également apparaître. L'apparition des symptômes se divise en une **phase « prodromale »** qui est la phase initiale (de 1 à 3 jours après l'exposition). Cette phase correspond à l'apparition des symptômes suivants : des nausées, de la fatigue, des crampes abdominales, un déséquilibre électrolytique, des vomissements (Anno *et al.*,1989); de fortes diarrhées peuvent se manifester. Cette phase prodromale dépend du débit de dose, de la nature du rayonnement, ainsi que de la taille du volume irradié. L'apparition des diarrhées est un signe de mauvais pronostic, car elle indique des dommages sévères et est associée à des doses fatales (Conklin and Walker,1987). Ensuite, une **phase de latence** qui est asymptomatique est observée, la longueur de cette phase dépendra de la dose reçue, plus la dose est élevée plus cette phase de latence sera courte. La troisième phase est la **phase de « maladie manifeste »** (de 1 à 6 semaines après l'exposition), qui se caractérise par l'apparition d'abondantes diarrhées sanglantes et associées à la « dénudation » de la muqueuse intestinale et à la déficience du système hématopoïétique, ainsi que l'apparition de la fièvre (Anno *et al.*,1989). Lorsqu'il y a une suspicion d'irradiation, une numération-formule sanguine et un électroencéphalogramme sont prescrits d'une part et d'autre part, une dosimétrie biologique est réalisée pour déterminer et dénombrer les aberrations chromosomiques radio-induites afin d'évaluer la dose reçue. De plus, un dosage de procalcitonine plasmatique pourrait être un paramètre à prendre en considération afin de trier les personnes qui seront susceptibles de développer un choc septique (Biju *et al.*,2012).

Afin d'exprimer la sévérité des symptômes, des termes cliniques sont utilisés pour caractériser la sévérité des symptômes (Berger *et al.*,2006) : faible (1-2 Gy) correspondant au grade 1, modéré (2-4 Gy) pour le grade 2, sévère (4-6 Gy) pour le grade 3, très sévère (6-8 Gy) et léthal (> 8Gy) ces deux dernières classifications correspondent au grade 4. Le tableau récapitulatif

de l'interprétation de l'apparition des symptômes en fonction de la dose est présenté ci-dessous durant la phase prodromale (Figure 12) :



Figure 12 : Tableau récapitulatif des symptômes en fonction de la dose (Gy) après une exposition corps entier durant la phase prodromale. Schéma réalisé à partir de l'article : Berger, M. E., Christensen, D. M., Lowry, P. C., Jones, O. W., & Wiley, A. L., (2006). *Medical management of radiation injuries: current approaches*.

Le classement clinique permet de résumer les dommages causés par l'irradiation chez un individu et le diagnostic associé. **Le grade 1** est associé à l'apparition de nausées, de vomissements ainsi que de crampes abdominales, les symptômes apparaissent généralement dans les heures ou les jours après l'exposition (Berger *et al.*, 2006). Le traitement des patients est en ambulatoire, les observations cliniques sont suffisantes, la récupération du patient est certaine. **Le grade 2** est associé à des crampes abdominales liées à la libération de médiateurs stimulant la motilité intestinale, des vomissements, une élévation de la température ainsi que de léger maux de tête (Berger *et al.*, 2006). Les dommages causés à l'épithélium intestinal sont mineurs avec une faible mortalité des cellules souches intestinales. Ces symptômes apparaissent entre 1 à 2 heures après l'exposition. La récupération est certaine cependant, l'efficacité de la réparation tissulaire est inconnue, ainsi des effets tardifs dû à l'irradiation peuvent survenir dans le temps. Le traitement des patients se fait globalement en ambulatoire basé sur les observations cliniques, les traitements prescrits sont des anti-inflammatoires, des analgésiques pour lutter contre les douleurs.

**Le grade 3** contient les symptômes plus prononcés du **grade 1 et 2**, les diarrhées sont sanglantes associées à des douleurs abdominales, une fièvre peut survenir (Berger *et al.*, 2006). Ces symptômes surviennent moins d'une heure après l'exposition. La guérison peut être possible ou non, cependant pour les patients qui survivent, le rétablissement se fera avec des épisodes récurrents de problèmes gastriques comme des épisodes de diarrhées. Les diarrhées survenant 20-30 jours après l'exposition peuvent être causées par des agents infectieux résultant d'une diminution de l'efficacité du système immunitaire liée à une activité immunitaire intestinale réduite et à un syndrome hématopoïétique. Les patients sont hospitalisés, une observation clinique de base ne suffit plus, des imageries comme l'IRM pourront servir à déceler un épaississement de la paroi intestinale et la formation de fistules, ainsi que des analyses en laboratoire doivent être pratiqués. Un apport de fluide et d'électrolytes doit être pratiqué et associé à un traitement antibactérien et antifongique. Des anti-inflammatoires et analgésiques peuvent être prescrits.

**Le grade 4** regroupe tous les symptômes des autres grades de manière très sévères, voir létaux (Berger *et al.*, 2006). Des vomissements répétitifs sont observés ce qui entraîne une déshydratation du patient, une perte de la muqueuse intestinale associée à des diarrhées sanglantes avec une altération de la barrière intestinale qui cause une perte drastique des fluides et électrolytes. Cette déstructuration de l'épithélium intestinal peut causer un choc hypovolémique, une septicémie conduisant à la mort. De plus, de violents maux de tête sont observés avec chez certains patients une perte de conscience. La guérison de ces symptômes est improbable. Les traitements disponibles sont des analgésiques, des anti-bactériens et anti-fongiques, les patients doivent être maintenus dans des conditions les plus stériles possibles. Les patients sont hospitalisés comme dans le grade 3 une observation clinique de base ne suffit plus, des imageries doivent être réalisées ainsi que des analyses biologiques en laboratoire.

### 3.3. Physiopathologie du tractus gastro-intestinal

Le système gastro-intestinal est un système complexe qui permet de réaliser plusieurs fonctions telles que l'absorption des fluides, des nutriments, des électrolytes ainsi que l'absorption du bol alimentaire. L'intestin est un organe mobile qui se contracte pour faciliter le transit du bol alimentaire. 99 % des fluides sont absorbés par l'intestin grêle et le côlon, ainsi une réduction d'absorption de l'eau ou une augmentation des sécrétions peuvent créer une diarrhée. Les rayonnements ionisants ont un effet sur l'architecture en altérant les structures des jonctions serrées et entraînent un déséquilibre de la balance hydrominérale provoquant des pertes massives en électrolytes et eau. Gunter-Smith *et al.* en 1986 ont montré que les rayonnements ionisants impactaient le transport en électrolytes avec une augmentation de la sécrétion en chlore après irradiation (Gunter-Smith *et al.*,1986). Auparavant, une corrélation avait été établie chez le rat entre la dose d'irradiation et le nombre de mastocytes présents au niveau du mésentère (Conte *et al.*,1956). Une libération de neurotransmetteurs par les fibres nerveuses entériques, ainsi qu'une altération des complexes des jonctions serrées conduisent à une perte en fluide et électrolytes (Conte *et al.*,1956), (Porvaznik,1979),(Gunter-Smith *et al.*,1986). La dénudation de l'épithélium intestinal favorise l'apparition de **diarrhées sécrétrices** (Marteau *et al.*,2012). Ces diarrhées résultent de l'action de molécules inflammatoires, des toxines bactériennes ou d'une action sur les pompes à électrolytes des entérocytes (Marteau *et al.*,2012). Le côlon quant à lui a la capacité de réabsorber l'eau et les électrolytes et de les stocker avant l'évacuation, ainsi les diarrhées ne sont pas systématiques, sauf lorsque le côlon est endommagé. Une étude a montré qu'après irradiation chez le rat, une diminution de l'absorption en eau et électrolytes pendant la phase prodromale était observée (Dublineau *et al.*,1998).

Des troubles de la motricité de l'intestin après irradiation ont été également observés. La mesure de l'activité électrique de l'intestin chez le rat a montré que la motricité intestinale et colique était altérée, avec une diminution des contractions dès 24 heures post-irradiation (Picard *et al.*,2001). Ces altérations de motricité intestinale perdurent dans le temps jusqu'à 7 jours post-irradiation. De plus, l'apparition de contractions violentes et désordonnées peut être observée, rendant l'acheminement du bol alimentaire difficile et amplifiant ainsi les diarrhées (Griffiths *et al.*,2002).

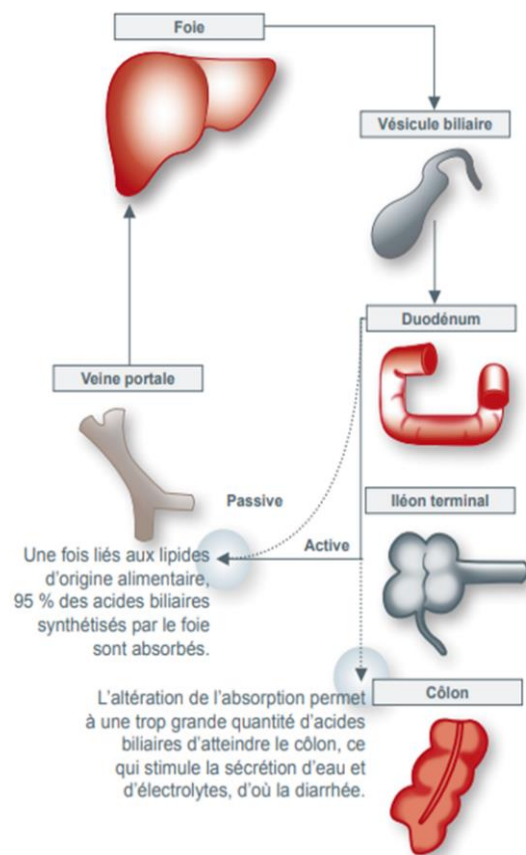
Les fonctions digestives sont régulées par le système nerveux entérique qui établit ses connexions nerveuses avec les cellules immunitaires résidentes. Il a été montré que les fonctions digestives reposaient sur les interactions nerf entériques/mastocytes (Bienenstock *et al.*,1991) où les mastocytes jouent un rôle important de communication avec le nerf vague (William *et al.*,1997) qui régule le péristaltisme et les sécrétions de l'intestin. Chez le rat, les mastocytes permettaient de protéger la muqueuse intestinale des premières manifestations des effets toxiques de l'irradiation (Wang *et al.*,2006).

A des doses n'entraînant pas le syndrome gastro-intestinal (entre 5 et 10 Gy, corps entier), une perte des connexions neuro-immunes associée à une diminution des mastocytes résidents dans le tissu intestinal a été observée à 24 et 48 heures chez le rat (MacNaughton *et al.*,1994) (François *et al.*,1998). Ces études montrent qu'une atteinte fonctionnelle de l'intestin est observée et ce même si les doses ne sont pas suffisantes afin de provoquer un syndrome gastro-intestinal, **c'est l'association des atteintes fonctionnelles et structurelles de l'intestin qui conduisent au syndrome gastro-intestinal.**

Les désordres fonctionnels radio-induits sont la conséquence de plusieurs facteurs : une diminution du nombre de cellules, une diminution du nombre de transporteurs ioniques à la surface des cellules ou un changement de leurs propriétés et une modification des régulations et de l'environnement des cellules. Des facteurs luminaux sont relargués, tels que des acides biliaires et peuvent agir sur la réponse de l'épithélium intestinal comme par exemple la motilité (Bajor *et al.*,2010). Une malabsorption des acides biliaires associée à une augmentation du transit dans l'intestin grêle a été montré chez des patients après une exposition aux rayonnements ionisants en zone abdominale (Yeoh *et al.*,1993) (*Figure 13*).

La bile est constituée de composés organiques et inorganiques, dont les acides biliaires, le cholestérol, et les phospholipides. Son écoulement se fait au niveau du duodénum pour que les acides biliaires puissent y absorber les graisses alimentaires et les vitamines liposolubles (Heubi *et al.*,2018). Les acides biliaires sont des sous-produits de la synthèse du cholestérol dans le foie, ayant une activité anti-microbienne (Bajor *et al.*,2010), ils stimulent par pression osmotique les hépatocytes afin qu'ils sécrètent du cholestérol (Monte *et al.*,2009). Les acides biliaires agissent également sur la motilité intestinale, sur l'absorption de l'eau et des électrolytes dans l'intestin (Bijvelds *et al.*,2005). Les pools d'acides biliaires primaires sont

formés dans le foie puis transformés en acides biliaires secondaires par la flore bactérienne du tube digestif.



**Figure 13** : Schéma représentant la circulation entéro-hépatique des acides biliaires. Tiré de l'article : « Les chélateurs des acides biliaires: Pour enclencher un mécanisme unique », Pierre Paré, Hôpital Saint Sacrement, Québec, 2012.

Les acides biliaires **primaires** sont issus du catabolisme du cholestérol dans le foie (acide cholique, acide chénodesoxycholique), ils sont conjugués dans le foie avec la glycine (en majorité) et la taurine. Dans l'iléon, les sels biliaires sont déconjugués grâce aux bactéries présentes en acide désoxycholique et en acide lithocholique, ce sont les acides biliaires **secondaires**. Plus de 90 % des acides biliaires sont réabsorbés dans l'iléon et transportés vers le foie où ils sont reconjugués puis resécrétés, il s'agit du cycle entérohépatique des acides biliaires (Gonzales *et al.*, 2006), (Valla *et al.*, 2013) (Figure 13). Les acides biliaires agissent sur la motilité intestinale tout en inhibant l'adhésion des bactéries à la muqueuse intestinale (Pumbwe *et al.*, 2007). Les acides biliaires dihydroxylés sont transportés passivement tandis que les acides biliaires trihydroxylés sont transportés grâce à une pompe K-ATPase. Après irradiation corps entier à 6 Gy chez le cochon, une diminution de ces pompes K-ATPases a été observée dans le jejunum (Griffiths *et al.*, 1996). La proportion des acides biliaires dihydroxylés est augmentée en comparaison aux acides biliaires trihydroxylés (Scanff *et al.*, 1999). L'augmentation du transport passif des acides biliaires dihydroxylés pourrait s'expliquer par



le fait qu'après irradiation dès 3 Gy le complexe de jonctions serrées est désorganisé (Porvaznik *et al.*,1979). Les acides biliaires dihydroxylés sont plus hydrophobes et sont connus pour être les plus agressifs et délétères pour l'intestin (Scanff *et al.*,1999). Ces résultats ont été confirmés par une autre étude chez le rat qui a montré une augmentation de la conversion des acides primaires vers des acides biliaires secondaires induisant des effets délétères sur l'intestin (Souidi *et al.*,2007). Une modification dans la composition en acides biliaires impacte également les fonctions intestinales comme le transport d'eau et d'électrolytes induisant des diarrhées, cette modification était observée dès 24 heures post-irradiation (Scanff *et al.*, 1997). De plus, les acides biliaires dihydroxylés peuvent stimuler la synthèse des leucotriènes B4 (Dias *et al.*,1994) et le relargage de l'histamine (Quist *et al.*,1991) deux molécules impliquées notamment dans l'inflammation post-irradiation.

Le tube digestif est un organe très innervé, ainsi outre la présence de neurotransmetteurs agissant sur la physiologie intestinale tels que l'acétylcholine, la dopamine, l'adrénaline ; la neurotensine a un effet sur les cellules souches intestinales (Rock *et al.*,2022). En effet, il a été montré qu'une déficience en neurotensine entraînait une diminution de la prolifération des cryptes intestinales (Rock *et al.*,2022). La neurotensine est un tridecapeptide localisé dans le cerveau et dans les cellules endocrines intestinales (les cellules N) (Reinecke *et al.*,1985). Elle agit sur la sécrétion d'acides biliaires et sur la motilité intestinale (Andersson *et al.*,1977). Il a été montré que 3 jours après irradiation en corps entier à 6 Gy chez le rat une augmentation du nombre de cellules N ainsi que des taux plasmatiques et tissulaires de neurotensine élevés ont été observés, induisant une modification de la contraction du côlon (Linard *et al.*,1997). La neurotensine agirait également sur l'intestin après irradiation dans le transport d'électrolytes en inhibant l'absorption du chlore. Ces modifications physiologiques de l'intestin surviennent pour des doses en corps entier n'induisant pas un syndrome gastro-intestinal.

L'irradiation induit la destruction de la barrière intestinale et crée des atteintes fonctionnelles de l'intestin. Ces atteintes de la muqueuse intestinale entraînent l'activation des cellules endothéliales favorisant l'infiltration de cellules immunitaires telles que les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes (Buell and Harding,1989). Très tôt après l'irradiation, une apoptose endothéliale est observée (Paris *et al.*,2001) et une infiltration de leucocytes au site lésionnel est visible dès 24 heures après irradiation chez la souris avec un niveau élevé

maintenu jusqu'à 14 jours post-irradiation (Mollà *et al.*,2003). Le recrutement des cellules immunitaires est associé à la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ). L'infiltration de leucocytes au niveau du site lésionnel est facilitée par les molécules d'adhésions (ICAM-1, VCAM-1) et des molécules chemo-attractantes (IL-8, MCP-1, RANTES) (Mollà *et al.*,2003). L'augmentation radio-induite de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) a été associée à une activation de la voie NF-kB (Linard *et al.*,2004).

Les monocytes et les macrophages jouent un rôle important à la fois dans le maintien de la barrière intestinale et dans l'homéostasie de la muqueuse. Récemment, une étude a montré qu'après des irradiations localisées à 8 Gy chez la souris, un nombre important de macrophages reste présent dans le tissu plusieurs semaines après l'irradiation et pouvait persister 30 semaines après l'irradiation (Malipatlolla *et al.*,2019). Une augmentation du pourcentage de monocytes pro-inflammatoires a été également observée 7 jours après irradiation à 18 Gy en zone abdominale chez la souris (Bensemmane *et al.*,2021). Ces infiltrations de cellules immunitaires participent à l'inflammation et à la réparation tissulaire après irradiation, cependant leur persistance dans le tissu peut être délétère.

La synthèse de prostaglandines dans l'intestin grêle a aussi montré jouer un rôle important dans la restauration de l'épithélium après irradiation (Cohn *et al.*,1997). En effet, ils sont d'importants médiateurs de l'intégrité de l'épithélium du tractus gastro-intestinal. Inhiber les cyclo-oxygénases (COX-1 et 2) synthétisant les prostaglandines pouvait impacter la survie des cellules souches intestinales. Le nombre de cryptes régénérantes avait été directement corrélé à la survie des animaux après irradiation (Withers *et al.*,1971).

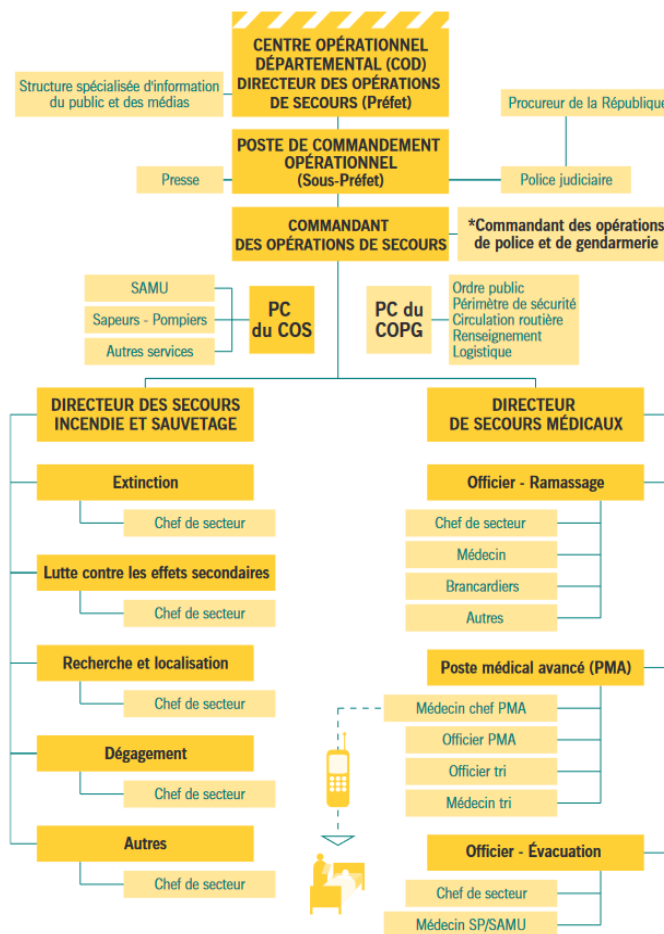
Outre la perte des cryptes intestinales après irradiation le processus d'ulcération de la muqueuse se définit comme un dommage profond de la paroi intestinale impliquant la totalité du compartiment muqueux allant jusqu'à la musculaire. Ce processus est amplifié par plusieurs acteurs : la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'activation de cellules endothéliales, l'apoptose des myofibroblastes subépithéliaux (Sonis *et al.*,2000), l'agrégation plaquettaire (Wang *et al.*,2002), la production de cytokines et l'activation des facteurs de transcription tels que NF-kB. Les réactions inflammatoires génèrent des débris cellulaires et tissulaires et induisent le contact entre les compartiments sous-muqueux et la lumière intestinale favorisant les ulcérations de la muqueuse (Sonis *et al.*,2004).

### 3.4. Evaluation initiale et diagnostic d'exposition aux rayonnements ionisants sur un large volume

La gestion médicale en urgence des victimes après une exposition accidentelle aux rayonnements ionisants repose sur quatre critères déterminants (Berger *et al.*,2006) :

- ✓ Le nombre de victimes impliquées, en effet, lorsqu'il y a un grand nombre de victimes, la capacité à tous les diagnostiquer et à fournir un traitement adapté peut-être compromis. Un triage de ces victimes est essentiel.
- ✓ Connaître si les victimes ont été exposées corps entier ou large volume, la dose reçue par chaque individu et si les blessures sont de type thermique ou dites « conventionnelles ». En effet, le triage initial ainsi que le diagnostic va se concentrer sur les blessures conventionnelles qui peuvent compromettre le pronostic vital des victimes. Le triage initial se fait en général sur le site de l'accident par les équipes soignantes arrivées sur place. Le diagnostic du syndrome d'irradiation aigue et l'estimation de la sévérité va se faire après avoir pris en charge les potentielles lésions mettant en jeu la vie des victimes. Il existe également le cas où les victimes ont été exposées accidentellement aux rayonnements ionisants et dont la sévérité est inconnue. Celles -ci doivent d'être prises en charge rapidement pour une orientation vers des services spécialisés des effets de l'irradiation (*Figure 14*).
- ✓ Le délai qui s'est écoulé depuis l'exposition aux rayonnements ionisants ; en effet, les victimes se présentant rapidement après avoir été irradiées (de quelques minutes à 48h) auront des symptômes différents de ceux retrouvés chez des victimes irradiées depuis plusieurs semaines.
- ✓ La présence de contamination à la radioactivité retrouvée sur les victimes. La décontamination externe des victimes doit se faire rapidement, et idéalement avant la venue à l'hôpital. L'identification des radionucléides impliqués doit être également connu afin de procéder à la décontamination interne.

La nature et la sévérité des symptômes ainsi que les analyses biologiques confirment l'exposition des victimes aux rayonnements ionisants et permettent de donner un indice sur l'amplitude de l'accident (Berger *et al.*, 2006).



**Figure 14** : Schéma représentant l'organisation des soins médicaux en France. Tiré du rapport annuel de l'autorité de sûreté nucléaire 2008. Provenant du circulaire n° 800/SGDN/PSE/PPS du 23 avril 2003 relative à la doctrine nationale d'emploi des moyens de secours et de soins face à une action terroriste mettant en œuvre des matières radioactives.

A la suite de la phase de triage, la phase de diagnostic se met en place afin de déterminer l'étendue des dommages causés par l'exposition aux rayonnements ionisants (Figure 15). Un consortium européen d'experts a élaboré en 1981 la publication d'un « Manual on the Acute Radiation Syndrome » largement utilisé aujourd'hui. Ce manuel décrit le système METREPOL (MEDical TREAtment ProtocOLs for Radiation Accident Victims). Il se concentre sur l'établissement d'une "catégorie de réponse" (RC pour « Response Categories ») pour chaque patient, basé sur les paramètres hématologiques, les symptômes neurologiques, gastro-intestinaux et cutanés et leur gravité, ainsi que sur la classification spécifique des organes,

dans le but de guider la gestion clinique et le pronostic (Fliedner *et al.*,2001), (Meineke and Fliedner,2005) (Figure 16).

Cette phase de diagnostic est composée de :

- ✓ L'observation afin d'avoir une vue d'ensemble de l'état de santé de la victime (brûlures, si la victime est consciente ou pas)
- ✓ L'interrogation sur la description de l'accident, sur le passé médical de la victime, quels symptômes sont apparus (vomissements, diarrhée, douleurs abdominales)
- ✓ L'inspection de la peau pour analyser les éventuelles réactions cutanées liées à l'irradiation
- ✓ L'examen afin de procéder à des examens de routine type électrocardiogramme, de l'imagerie médicale ainsi que de la dosimétrie biologique
- ✓ Les examens en laboratoire, la collecte des échantillons sanguins des victimes doit se faire le plus tôt possible après irradiation afin de réaliser une numération formulation sanguine.

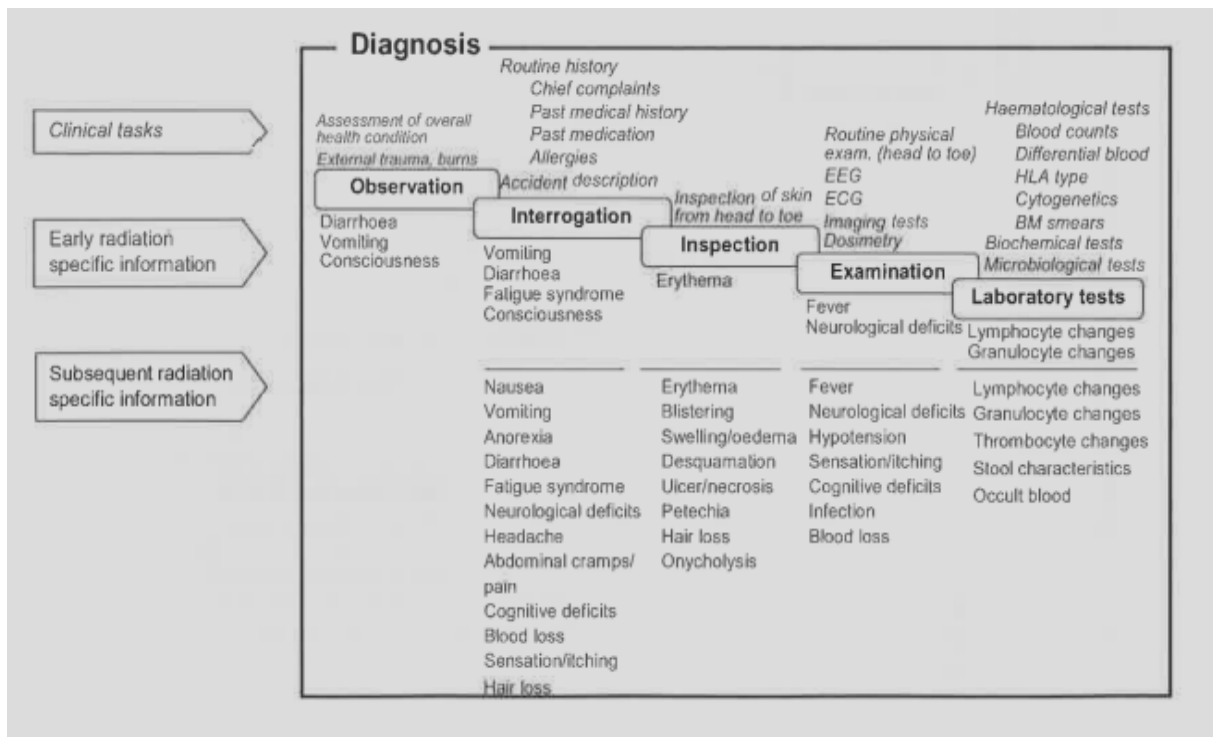


Figure 15 : Tableau récapitulatif des procédures médicales à réaliser dans le cadre d'un syndrome aigu d'irradiation. Tiré du manuel: Compendium, manual on the acute radiation syndrome, Fliedner, T. M., Friesecke, I., & Beyrer, K. (Eds.). (2001). *Medical management of radiation accidents: manual on the acute radiation syndrome*. British Inst of Radiology.

L'expérience clinique des professionnels de santé à la prise en charge de victime exposée à de fortes doses d'irradiation est limitée et la prise en charge médicale doit être coordonnée (Meineke and Fliedner,2005).

Complexity of clinical care	Response Category	Therapeutic interventions	Institutional requirements
	<b>RC 4</b> Autologous recovery most unlikely	+ Stem cell transplantation	Specialised hospital with experience in all areas of intensive care medicine, particularly allogeneic SCT
	<b>RC 3</b> Autologous recovery possible	+ Stimulation (growth factor therapy)	Internal haematological–oncological institutes with reverse isolation; Intensive care unit; Consultations of all medical specialties
	<b>RC 2</b> Autologous recovery likely	+ Supportive care; Substitution (blood component therapy)	Medical wards with haemato-oncological, neurological and dermatological consultation services
	<b>RC 1</b> Autologous recovery certain	General support of recovery processes; usually no specific therapy	Outpatient care or general medical wards

Figure 16 : Tableau récapitulatif classant les patients en différentes catégories de réponse (RC). Tiré de l'article: Meineke, V., & Fliedner, T. M. (2005). Radiation-induced multi-organ involvement and failure: challenges for radiation accident medical management and future research. *The British Journal of Radiology*, (1), 196-200.

En France, des hôpitaux de références dans la gestion de crise après un accident d'irradiation sont listés et organisés par zone (Rapport ASN,2008) (Figure 17)

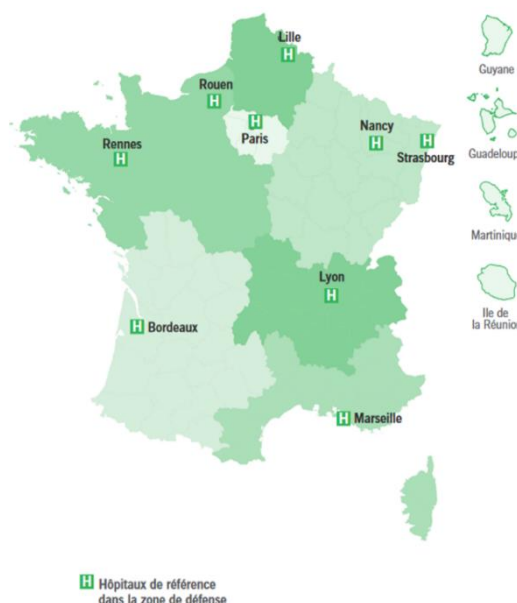


Figure 17 : Carte France identifiant les hôpitaux de référence en cas d'accident impliquant l'exposition de personnes aux rayonnements ionisants. Tiré du rapport de l'autorité de sûreté nucléaire de 2008.

Les accidents causés par les rayonnements ionisants sont rares et possèdent leur propre spécificité. Ils ont des effets indirects, particulièrement importants dans les accidents de grande ampleur. La gamme des accidents est large et variée : il existe des accidents qui ne posent pas de problèmes particuliers, des accidents dont la gestion médicale est délicate et des accidents qui mobilisent des moyens très importants. Dans chacune de ces classes on peut distinguer les accidents qui sont diagnostiqués d'emblée et ceux qui sont découverts tardivement et qui auraient pu être ignorés. Certains accidents sont gardés secrets pour des raisons militaires ou politiques (*Tableau 1*).

Lieu	Type accident	Dose (Gy)	Nombre Victime	Signes cliniques	Début des signes	Mortalité
Vinca (Yougoslavie) 1958	Installation militaire, accident de criticité	4,4 (75% $\gamma$ , 25% neutron)	6	Diarrhée Modérée	32 jours	6
Mexico (Mexique) 1962	Source Co <sup>60</sup> trouvée par une famille		4	Syndrome aigue d'irradiation		4
Los Alamos (USA) 1958	Accident de criticité	27 ( $\gamma$ ) 9 (neutron)		Vomissement	Heures	1 (35 heures)
Brescia (Italie) 1975	Installation agricole d'irradiation de céréales	12	1			1 (13 jours)
Chernobyl 1986	Centrale	6,6-10,2	7	Diarrhée Modérée	9-10 jours	6
Chernobyl 1986	Centrale	8,1-16	11	Diarrhée Sévère	4-8 jours	11
Soreq (Israël) 1990	Source industrielle	11	1	Sévère dommage intestinal, Défaillance respiratoire, GVHD (du à la greffe de Moelle osseuse) , infection virale		1 (36 jours)
Nesvizh (Biélorussie) 1991	Source industrielle	9-16	1	Dommage intestinal profond Détrésses respiratoire, Infection		1 (113 jours)
Indiana (USA) 1992	Brachythérapie (Source <sup>192</sup> Iridium, 4,2mCi)		1	Source détachée et gardée <i>in situ</i> Perforation et nécrose rectale		1 (6 jours)
Sarov (Russie) 1997	Centre militaire	15	1	Insuffisance cardiaque		1 (3 jours)
Tokai Mura (Japon) 1999	Centrale nucléaire Accident de criticité	9; 5; 1,2	3	Dommage multi-organe		2 (83 jours) 1 (211 jours)

**Tableau 1** : Accidents d'irradiation déclarés ayant entraînés un SGI: Tiré de « *Les accidents d'irradiation, 1950-2000 leçons du passé* » J.-C. NÉNOT Radioprotection 2001 Vol. 36pages 431-450.

### 3.5. Solutions thérapeutiques proposées

Le traitement après une exposition accidentelle à des rayonnements ionisants n'est pas systématique si la victime a reçu des doses < 1Gy (Berger *et al.*, 2006). Après une exposition à de plus fortes doses, les traitements préconisés sont des antibiotiques, des anti-émétiques et de la réhydratation. La prise en charge thérapeutique doit être adaptée en fonction de l'état général de la victime et en fonction des organes touchés (Fliedner *et al.*,2001). La prédiction de l'évolution clinique des victimes est complexe face à l'incertitude concernant la dose reçue et les volumes exposés. L'atteinte du système hématopoïétique est le premier symptôme à apparaître et est très répandue après un accident d'irradiation. L'aplasie médullaire expose l'individu à de sérieuses infections, des saignements ou des défauts de cicatrisation. Les accidents d'irradiation sont rares et il y a peu d'expérience de greffe de cellules souches chez les victimes atteintes de syndrome hématopoïétique après un accident d'irradiation (Berger *et al.*,2006). La transplantation de moelle osseuse doit être proposée pour les personnes exposées de manière uniforme pour des doses comprises entre 7 et 10 Gy (Berger *et al.*,2006). Cependant, la transplantation de moelle osseuse nécessite un donneur compatible, or, la recherche d'un potentiel donneur est chronophage et les tentatives de stimulation de la production de cellules après la greffe de moelle osseuse avec des facteurs de croissance hématopoïétiques (G-CSF, Granulocyte Colony Stimulating Factor) augmente le risque d'apparition de maladie du greffon contre l'hôte (Ringdén *et al.*,2004). Les cellules souches du sang périphérique peuvent être mobilisées chez un donneur compatible en le traitant avec des facteurs de croissance (G-CSF) avant de récupérer ces cellules hématopoïétiques. Le procédé prend au total 4 jours seulement une fois que la greffe hématopoïétique a été réalisée et la récupération du patient est plus rapide qu'à la suite d'une greffe de moelle osseuse (Storek *et al.*,2001). Pour des irradiations à très fortes doses, le traitement dépendra de la sévérité des lésions aux autres organes (Resnick and Slavin,2005). Une transfusion est également requise chez les victimes de syndrome aigu d'irradiation, en effet, les professionnels de santé qui ont traité les victimes de Tchernobyl ont mis en avant l'importance de la thrombocytopénie qui est un critère déterminant afin d'éviter les hémorragies (Guskova *et al.*,1996). La seule classe actuelle de « médicament » autorisée par la FDA sont des dérivés de G-CSF (Neupogen et Neulasta) généralement utilisé en oncologie afin d'accélérer la



restauration de l'hématopoïèse après une chimiothérapie myélo-suppressive (Singh *et al.*,2016).

Concernant le tractus gastro-intestinal l'arsenal thérapeutique existant en prévention (radioprotectant) des lésions du système gastro-intestinal suite à une exposition médicale (radiothérapie) est plus large et plus efficace que la prise en charge thérapeutique après un accident exposant les victimes à de fortes doses d'irradiation en large volume ou les outils thérapeutiques sont pratiquement inexistantes.

Les thérapies en prévention des lésions dûes aux rayonnements ionisants ou après une exposition au niveau intestinal proposées sont de 2 types :

✓ **Les Facteurs de croissances :**

Les facteurs de croissance ont en général un effet pro-proliférant et anti-apoptotique et se sont montrés efficaces dans la prévention ou le traitement des lésions radio-induites de la muqueuse digestive.

Les cellules souches de la crypte sont les plus radiosensibles et sont à la base du renouvellement tissulaire, ainsi la première cible sera le compartiment de la crypte. Le KGF (Keratinocyte Growth Factor) est produit par les fibroblastes, il stimule la prolifération de différents types cellulaires tels que les kératinocytes (Rubin *et al.*,1989), les hépatocytes et au niveau du tractus gastro-intestinal, KGF stimule la prolifération des cellules de la crypte (Khan *et al.*,1997), ainsi que leur différenciation en cellules caliciformes (Housley *et al.*,1994). La Repifermine et la Palifermine, deux facteurs de croissance kératinocytes recombinants d'origine humaine (KGF) ont montré des résultats prometteurs dans la réduction de la durée et de la sévérité de l'inflammation des muqueuses chez les patients en radiothérapie lorsque ces molécules sont données en prévention ou après la radiothérapie (Freytes *et al.*,2004), (Spielberger *et al.*,2004), (Kouri *et al.*,2012). Il a été montré également que le KGF permettait de stimuler la prolifération des cellules de la crypte de l'intestin (Potten *et al.*,2001). Un deuxième facteur de croissance le FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2), présent dans plusieurs tissus a montré pouvoir réguler *in vitro* la migration et la réplication de cellules intestinales en culture (Dignass *et al.*, 1994) et *in vivo* induit un effet sur la niche de la crypte permettant une protection contre l'irradiation (Houchen *et al.*,1999). Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) a montré aussi protéger des dommages intestinaux après des irradiations corps entier

de 7 à 18 Gy chez la souris (Okunieff *et al.*,1998). De même pour le FGF-4 (Sasaki *et al.*,2004) et l'IGF-1 (Insulin Growth Factor 1) (Mylonas *et al.*,2000) ont une action anti apoptotique. L'IGF-1 induit une stimulation de la prolifération et la recolonisation épithéliale chez le rat après une irradiation à 10 Gy (Howarth *et al.*,1997). L'effet anti-apoptotique du TGFβ<sub>3</sub> est sur l'arrêt des cellules souches intestinales dans le cycle en phase G1 (Potten *et al.*,1997). Ce facteur de croissance agit également de manière indirecte sur les cellules endothéliales afin de les protéger de l'hypoxie (Okunieff *et al.*,1998) (Maj *et al.*,2003). Une récente étude a montré qu'après une exposition corps entier chez le primate non humain afin d'induire une myelo-depression, l'injection de Sargramostim, un facteur recombinant de stimulation des colonies de macrophages/granulocytes (GM-CSF) de 48 heures à 120 heures post-irradiation pouvait améliorer la survie globale et améliorerait les paramètres hématologiques (Zhong *et al.*,2021) en agissant comme un immunostimulateur. Cette dernière molécule a reçu l'approbation de la Food and Drug Administration (FDA) pour l'utilisation en tant que contremesure médicale lors de l'apparition d'un syndrome aigu d'irradiation (Zhong *et al.*,2021).

#### ✓ Les cytokines

Il a été montré chez la souris après une irradiation à 16 Gy corps entier, que l'utilisation d'interleukine 11 (IL-11) recombinante humaine augmentait le nombre de cryptes survivantes améliorant ainsi la survie globale des souris (Potten *et al.*,1995). L'IL-11 agirait directement sur les entérocytes en stimulant la prolifération *via* les cellules Lg5<sup>+</sup> et en protégeant les entérocytes de l'apoptose (Liu *et al.*,1996). L'IL-11 agirait également sur le système hématopoïétique en stimulant le développement des mégacaryocytes, cellules responsables de la production des plaquettes et en améliorant la myélo-suppression après irradiation chez le singe (Hao *et al.*,2004). La thrombopoïétine est le principal régulateur de la production des thrombocytes, l'injection de thrombopoïétine 2 heures après irradiation à 9 Gy corps entier chez la souris améliorerait la survie globale des souris en favorisant la reprise hématopoïétique (Mouthon *et al.*,2002). L'IL-7, une autre cytokine impliquée dans le développement et l'homéostasie des cellules B, T et Natural Killers (Chen *et al.*,2021) a un effet de protection des cellules souches de la crypte, en effet, lorsque des souris déficientes en récepteurs d'IL-7 sont irradiées, une augmentation de la radiosensibilité des cryptes est observée (Welniak *et al.*,2001).

Enfin, une combinaison de quatre cytokines (Stem cell Factor, FLT3 Ligand, Thrombopoïétine, et IL-3) a été développée lors d'une étude du concept « Emergency Antiapoptotic Cytokine Therapy » afin de préserver, de stimuler la restauration de l'hématopoïèse après une irradiation à fortes doses (Hérodin *et al.*,2007).

Face à la difficulté de la prise en charge médicale des victimes atteintes de syndrome aigu d'irradiation, des nouvelles stratégies de thérapies innovantes ont émergé. Une étude a montré que l'utilisation d'entolimod, un agoniste du TLR5 pouvait protéger et atténuer les lésions radio-induites, en effet le TLR5 est exprimé par les neutrophiles, ils quittent la moelle osseuse et s'accumulent dans les tissus solides en relarguant du MMP-9 *via* la stimulation du TLR5. Le MMP-9 recombinant a montré avoir un effet radio atténuateur et une stimulation de la restauration du système hématopoïétique a été observé (Brackett *et al.*,2021).

Une dernière molécule, le Teduglutide un analogue du GLP-2 (Glucago Like Peptide 2) a montré avoir un effet radioprotectant sur le nombre de cryptes survivantes chez la souris pendant 14 jours suite à une irradiation de 11 à 16 Gy corps entier (Booth *et al.*,2004). En effet, le GLP-2 fait partie de la famille de peptides du glucagon et est sécrété par les cellules endocrines du tractus gastro-intestinal (Drucker *et al.*,1997), (Xiao *et al.*,1999). Le GLP-2 influe sur la prolifération des cryptes et villosités et d'une manière générale sur la masse intestinale (Bjerknes *et al.*,2001). Le GLP-2 permettrait d'augmenter le pool de cellules au niveau du compartiment cellules souches avant irradiation augmentant ainsi le nombre de cellules survivantes après irradiation, cependant dans l'étude de Booth *et al.* lorsque le GLP-2 est injecté durant 14 jours avant l'irradiation et 4 jours après l'irradiation, une perte de l'efficacité thérapeutique est observée. Ainsi, le GLP-2 dans le cas d'un syndrome gastro-intestinal n'a pas d'intérêt thérapeutique seulement dans le cadre d'une radiothérapie où l'intestin est irradié sur un petit volume.

L'administration de nutriments comme la choléstyramine par voie entérale peut être proposée et a montré avoir un effet bénéfique, et pourrait agir comme « piège » des acides biliaires ayant des effets délétères sur une muqueuse intestinale endommagée (Chary and Thomson,1984).

Les contre-mesures médicales qui ont été approuvées par la Food and Drug Administration (FDA) sont au nombre de 4 et sont destinées principalement pour traiter les syndromes aigus

d'irradiation *via* une atténuation de la neutropénie ou thrombocytopénie tel que Neupogen<sup>®</sup>, Neulasta<sup>®</sup>, le pegfilgrastim des recombinants du G-CSF qui a été le premier à recevoir l'approbation de la FDA en mars 2015 pour le traitement de la neutropénie après des doses d'irradiation myélo-suppressives (Hunter *et al.*,2021). Leukine<sup>®</sup>, le sargramostim, un facteur recombinant stimulant les granulocytes et les macrophages agit comme un immunostimulateur a reçu son approbation de la FDA en mars 2018 (Hunter *et al.*,2021). Lors d'un syndrome d'irradiation aigu, la neutropénie rend le risque d'infection accru, ainsi l'administration de leukocyte growth factors (LGFs) afin de repeupler en neutrophiles est impératif (Hunter *et al.*,2021). La dernière molécule autorisée est un agoniste du récepteur à la thrombopoïétine (TPO) qui permet de stimuler la production de plaquettes au sein de la moelle osseuse, Nplate a reçu récemment l'approbation de la FDA en 2021 (Hunter *et al.*,2021). Stimuler les plaquettes après un syndrome d'irradiation aigu évite le risque d'hémorragies. Par conséquent, il est nécessaire de développer d'autres contre-mesures médicales afin de traiter les lésions radio-induites sur d'autres organes notamment, le système gastro-intestinal.

#### ✓ **Le traitement par cellules souches mésenchymateuses**

L'injection de cellules souches mésenchymateuses (CSMs) pourrait avoir un effet prometteur. Elles sont présentes dans de nombreux organes comme le tissu adipeux, la moelle osseuse, le liquide synovial, le sang circulant (Wagner *et al.*,2005). Les CSMs sont des cellules souches progénitrices multipotentes capables de se différencier en différents tissus mésenchymateux (Deans *et al.*,2000). Elles ont montré avoir un effet bénéfique dans de nombreuses études sur des modèles d'animaux lorsqu'elles sont greffées, comme par exemple chez le cochon après un syndrome d'irradiation cutané, où la greffe de cellules souches mésenchymateuses a montré stimuler la cicatrisation des blessures (Linard *et al.*,2018). Une autre étude chez la souris a montré que l'injection de cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse permettait d'améliorer la survie des animaux, de diminuer le risque d'apparition de la maladie de l'hôte contre le greffon et de diminuer l'incidence du lymphome (Song *et al.*,2015).

La capacité de prolifération et la facilité d'obtention des cellules souches mésenchymateuses en font un bon candidat afin de stimuler le repeuplement du compartiment cellules souches intestinal après irradiation à fortes doses et pourrait en venir à bout du mur thérapeutique existant pour le syndrome gastro-intestinal radio-induit. Chez l'homme, une étude a montré lors d'un cas rapporté, des effets bénéfiques concernant les atteintes fonctionnelles de l'intestin après une greffe de cellules souches mésenchymateuses chez un patient leucémique atteint de GVHD (Graft versus Host Disease) à la suite d'une transplantation de cellules hématopoïétiques (Le blanc *et al.*,2004). La radiothérapie pour un cancer dans la région pelvienne induit des effets aigus et/ou chroniques du système gastro-intestinal impactant considérablement la qualité de vie des patients (Andreyev *et al.*,2010). Dans cette problématique, une étude a notamment montré qu'après irradiation à 27 Gy chez le rat dans la région colorectale, une injection de CSMs induit une augmentation du nombre de cryptes et une prolifération épithéliale limitant ainsi les dommages colorectale (Sémont *et al.*,2013).

**Ainsi, les approches thérapeutiques du syndrome gastro-intestinal semblent limitées.**

Whole body dose (Gy)	1–2	2–4	4–6	6–8	>8
Degree of severity of ARS	Mild	Moderate	Severe	Very severe	Lethal
Medical management and treatment	Outpatient observation for maximum of one month	Hospitalization			
		Isolation, as early as possible			
		G-CSF or GM-CSF as early as possible (or within the first week)		IL-3 and GM-CSF	
		Antibiotics of broad spectrum activity (from the end of the latent period) Antifungal and antiviral preparations (when necessary)			
		Blood components transfusion: platelets, erythrocytes (when necessary)			
		Complete parenteral nutrition (first week) Metabolism correction, detoxication (when necessary)			
		Plasmapheresis (second or third week) Prophylaxis of disseminated intravascular coagulation (second week)			
			HLA-identical allogene BMT (first week)	Symptomatic therapy only	

**Tableau 2** : Tableau récapitulatif des mesures thérapeutiques pour les syndromes aigus d'irradiation en fonction de la dose. Tiré du manuel: *Diagnosis and Treatment of radiation injuries: safety reports series n°2,1998.*

### 3.6. Modèle animal pour l'étude des irradiations fortes doses

Après une exposition aux rayonnements ionisants à fortes doses en corps entier, les atteintes à la moelle osseuse induisent un syndrome hématopoïétique, le tractus gastro-intestinal se classe juste après le système hématopoïétique, en étant l'organe le plus sensible aux rayonnements ionisants et pouvant induire un syndrome gastro-intestinal. En réalité, si une partie de la moelle osseuse a été préservée, les lésions intestinales radio-induites deviennent limitantes pour observer une survie (Mason *et al.*,1989).

En matière de sécurité sanitaire le développement et l'avancement des contre-mesures médicales radiologiques sont fondamentales afin de mettre en place une réponse efficace aux menaces radiologiques et nucléaires. Des agences américaines telles que la « Biomedical Advanced Research and Development authority » (BARDA), le « National Institute of Allergy and Infectious Diseases » (NIAID), et la « National Aeronautics and Space Administration » (NASA) ont permis la progression du développement des contre-mesures médicales afin de traiter les lésions radio-induites et de les introduire dans la sphère publique (Hunter *et al.*,2021). Cependant, en raison de la gravité des lésions après une exposition à de fortes doses d'irradiation, les cas cliniques ne peuvent être qu'après un accident d'irradiation, il n'existe pas d'essai clinique sur l'homme. Par conséquent, les modèles précliniques reproduisant les manifestations cliniques des lésions radio-induites retrouvées chez l'homme, sont essentiels à l'avancement des contre-mesures médicales. Les modèles précliniques les plus utilisés sont les rongeurs et les primates (Hunter *et al.*,2021). En effet, ces modèles ont joué un rôle central dans le développement et l'homologation de contre-mesures médicales cependant, aucun n'est parfait dans la reproduction de chaque aspect des lésions radio-induites humaines et chaque modèle a ses limites.

Les modèles canins sont avantageux pour leur longue durée de vie ainsi que leur similarité du système immunitaire avec l'homme et les manifestations du syndrome gastro-intestinal radio-induit (Singh *et al.*,2015) (Spatola *et al.*,2021). Cependant, les limites observées étaient l'anatomie et la fonction pulmonaire qui diffèrent de l'homme (Singh *et al.*,2015) et le fait que les canidés sont des animaux de compagnie ainsi, leur utilisation a été délaissée. Actuellement, les modèles animaux les plus utilisés sont les rongeurs, en effet, les souris partagent 95 % d'homologie génétique avec l'humain ainsi que de nombreuses similarités

notamment physiologiques (Singh *et al.*,2015), (Butterworth and Williams,2021). Cependant, la durée de vie courte des souris rend difficile le suivi au fil du temps des effets des rayonnements ionisants et l'établissement d'un lien avec l'apparition d'effets tardifs chez l'homme. De plus, la petite taille des souris induit une distribution de la dose qui sera différente et hétérogène par rapport à l'homme ayant un corps plus grand et une épaisseur plus importante.

Une étude a montré la pertinence de l'utilisation de modèle de mini-porcs afin de caractériser l'hémorragie après une irradiation corps entier à fortes doses (Doyle-Eisele *et al.*,2021).

Deux études ont utilisé des lapins pour l'étude du syndrome aigu d'irradiation. La première a utilisé des lapins de type « New Zealand White Rabbit » pour l'étude du syndrome hématopoïétique après irradiation corps entier de 6,5 à 9,5 Gy (Jackson *et al.*,2021). Ce modèle a montré des similarités dans les complications hématologiques avec l'humain. La deuxième étude a montré des similarités entre le modèle utilisant des lapins de type « New Zealand White Rabbit » et les autres modèles déjà établis dans l'étude des réponses immunitaires et de coagulation après une exposition à de fortes doses de rayonnement ionisant en corps entier (Paredes *et al.*,2021).

La NASA se prépare pour des futures missions d'explorations dans l'espace afin d'envoyer des astronautes sur la lune et mars, cependant, celle-ci a besoin du développement de contre-mesures médicales efficaces afin de protéger ou d'atténuer les effets sur la santé liés aux irradiations cosmiques (Carnell *et al.*,2016). Ainsi, le développement de plusieurs modèles préclinique robustes de syndrome d'irradiation aigu sera nécessaire pour la sécurité des missions spatiales futures (Carnell *et al.*,2021).

L'utilisation du modèle murin pour l'étude des contre-mesures médicales afin d'assurer la radioprotection ou la mitigation du syndrome gastro-intestinal, est le modèle de choix car (Williams *et al.*,2010) :

- ✓ Une grande quantité d'information sont disponibles concernant l'étude de l'atteinte à la muqueuse intestinale et d'autres lésions après irradiation
- ✓ La génétique du modèle murin limite les variations expérimentales
- ✓ La gestation est courte (3 semaines)
- ✓ Une large variété de mutants existe pour les études mécanistiques

Aucune souche murine n'est nécessairement supérieure à une autre, cependant, il existe des différences au niveau de leur système immunitaire (Th1 *versus* Th2) et de leur réponse aux cytokines (Williams *et al.*,2010). De plus, le point limite lors de l'étude du syndrome gastro-intestinal est la mortalité des animaux observée après une exposition aux rayonnements ionisants corps entier ou partiel. Ce point limite est bien référencé et évalué en moyenne de 7 à 10 jours dépendant de la dose d'irradiation, du volume exposé, de la souche et du fond génétique (Rotolo *et al.*,2009). La létalité observée au bout de 10 jours s'explique par la combinaison des lésions radio-induites au niveau de la moelle osseuse ainsi que des dommages radio-induits sur le système gastro-intestinal (Terry and Travis,1989). Les résultats obtenus lors des expérimentations de survie peuvent varier d'un laboratoire à un autre (DiCarlo *et al.*,2021), ainsi, il existe des variables qui peuvent avoir un impact significatif sur les recherches en radiobiologie. Les agences américaines ont demandé dans le souci d'une harmonisation des résultats et de leur reproductibilité entre les laboratoires, un établissement d'un classement de catégories de variables pouvant influencer les expérimentations ; ci-dessous cinq variables intéressantes sont à considérer :

✓ **Le modèle d'exposition :**

Une observation de 30 jours est nécessaire afin d'évaluer la mortalité due au syndrome hématopoïétique et gastro-intestinal dans le modèle murin après irradiation. Ce point limite est nécessaire afin d'évaluer la radiosensibilité d'une souche et l'efficacité d'une contre-mesure médicale dans l'amélioration de la survie globale. Pour les modèles étudiant le syndrome gastro-intestinal, l'irradiation d'une partie de l'animal est préférable à l'irradiation corps entier. Une partie de la moelle osseuse étant épargnée, l'observation des manifestations du syndrome gastro-intestinal sera plus précise dû à l'affranchissement de l'apparition du syndrome hématopoïétique (Dicarlo *et al.*,2021).

✓ **La prise en compte du cycle circadien :**

Outre les procédures d'irradiations des animaux, l'heure de la journée à laquelle les animaux sont irradiés peut-être un biais dans l'évaluation de la toxicité du système gastro-intestinal (Ijiri and Potten,1990). En effet, les réponses gastro-intestinales peuvent varier avec le temps, toutes les cohortes de souris devraient être irradiées à la même heure de la journée. D'autres variables peuvent intervenir et faire en sorte que la dose délivrée pour induire un syndrome



gastro-intestinal change au fil du temps, ainsi il est nécessaire d'utiliser des contrôles pour chaque expérimentation (Williams *et al.*,2010). Chez la souris, la mortalité est plus forte lorsque la procédure d'irradiation est réalisée la nuit (Nelson,1966) et durant les heures très tôt dans la journée (Pizzarello *et al.*,1964). Les souris C57BL/6 irradiées entre 11 heures et 13 heures sont plus radio-résistantes (Plett *et al.*,2012). Ainsi, il est nécessaire d'irradier les souris à un intervalle de temps donné et que cette fenêtre ne bouge pas pendant toute la durée de l'étude.

✓ **Les considérations environnementales :**

Les modèles d'irradiations fortes doses en corps entier ou partiel induisent des lésions sévères rendant les souris très vulnérables à la modification de facteurs environnementaux. Les températures froides peuvent amener à une phase d'hibernation qui pourraient être radioprotective (Cerri *et al.*,2016), (Tinganelli *et al.*,2019), à l'opposée lorsque les souris sont irradiées l'été une plus forte mortalité peut être observée par rapport aux autres mois (Roderick *et al.*,1963).

✓ **L'âge de l'animal :**

L'âge à lequel l'animal est irradié peut exercer une influence sur la réponse à l'irradiation, une différence de réponse peut être observée entre souris d'une même souche (Dicarlo *et al.*,2021). Des études ont montré que lorsque les souris étaient irradiées à un âge situé entre la naissance et jusqu'à 4 semaines, une radorésistance était observée (Abrams,1951) (Lindop and Rotblat,1959).

✓ **La souche de l'animal :**

Une différence entre les souches a été observée au niveau de la radiosensibilité aux rayonnements ionisants, en effet, la souche la plus radiosensible est la BALB/cJ, ensuite la C57BL/6J est radiosensible de manière modérée et la plus radorésistante est la 129/J (Storer,1966). Les souches les plus fréquemment utilisées pour établir des modèles d'irradiation corps entier ou partiel et évaluer la survie sont les BALB/c, C3H/HeN, B6D2F1 et C57BL/6 (Williams *et al.*,2010). Cependant, des dérives génétiques peuvent survenir, impactant le métabolisme, l'immunité, et à terme influencent la radiosensibilité. De nouvelles

techniques d'ingénierie ont permis le développement de nouveaux modèles de souris dites « génétiquement modifiées », comme les souris « knock out » ou d'autres souris génétiquement modifiées qui ont permis de fournir de précieuses informations concernant les mécanismes d'action d'une contre-mesure médicale après un accident d'irradiation (Dicarlo *et al.*,2021).

Les contre-mesures médicales ayant démontrées avoir une efficacité thérapeutique dans le modèle murin devront être testées par la suite sur un plus gros animal comme les mini-porcs afin d'avoir des études robustes quant à l'utilisation de la contre-mesure directement chez l'homme (Williams *et al.*,2010).

## Partie 4 : Le système immunitaire Intestinal

### 4.1. Le maintien de la barrière intestinale

L'épithélium de l'intestin est continuellement en contact avec les antigènes provenant de l'alimentation, les bactéries commensales et les potentiels pathogènes. Pour cela, le système immunitaire intestinal doit répondre de manière adaptée. La rupture de cette balance pourrait provoquer des pathologies intestinales comme les pathologies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) ou encore la colite ulcéreuse (Morbe *et al.*,2021). L'intestin possède une diversité de cellules immunitaires, ainsi que plusieurs compartiments dont les ganglions lymphatiques mésentériques (MLN), les « Gut associated lymphoid tissues » (GALT) comprenant les plaques de Peyer et les « isolated lymphoid follicles » (ILFs). Les cellules immunitaires de la réponse innée et adaptative sont également localisées au niveau de la *lamina propria* afin de maintenir et de promouvoir l'intégrité de la barrière intestinale (Mowat and Agace, 2014).

Une étude a montré qu'après irradiation, les cryptes localisées proches des plaques de Peyer étaient plus radiorésistantes que les cryptes non associées aux plaques de Peyer. L'index mitotique des cryptes associées aux plaques de Peyer est significativement plus haut avec un cycle cellulaire plus lent que celui des cryptes non associées aux plaques de Peyer (Maunda and Moore,1987). Les GALT pourraient former une niche pour les cryptes en apportant les éléments sécrétés par les cellules immunitaires, favorisant la survie des cryptes après une

irradiation à fortes doses. L'injection d'un dérivé de la sulfonyl-piperazine, molécule mitigatrice du système hématopoïétique et intestinal après irradiation, augmente à la fois le nombre de plaques de Peyer associées aux cryptes et le nombre de cellule de la crypte survivante et régénérante (Bhat *et al.*,2019) (Sehgal *et al.*,2018). Soulignant le rôle joué par les GALT lors d'un syndrome gastro-intestinal radio-induit.

#### 4.1.1. L'homéostasie intestinale passe par Les IECs

La première ligne de défense dans l'intestin est l'épithélium en contact avec la lumière intestinale, ainsi les cellules spécialisées de l'intestin (IEC) comme les cellules caliciformes établissent une barrière contre les pathogènes de la muqueuse en produisant respectivement des mucines et des protéines anti-microbiennes (AMPs) (Ahluwalia *et al.*,2017). En effet, les signaux microbiens sont reconnus par les IECs pour maintenir une homéostasie intestinale. Ces cellules limitent l'accès aux bactéries à l'épithélium (Goto and Ivanov,2013).Suivant la localisation dans l'intestin, les couches de mucus ne sont pas les mêmes, l'intestin grêle possède une couche fine et pénétrable afin de permettre l'absorption des nutriments tandis que le côlon en contact avec un plus grand nombre de bactéries, a deux couches de mucus dont la couche intérieure dense est dépourvue de bactéries (Hansson and Johansson,2010), (Ermund *et al.*,2013). Les cellules de Paneth renforcent cette barrière intestinale en sécrétant des AMPs comme la défensine, la cathelicidine, des phospholipases A2 ainsi que du lysozyme (Magalhaes *et al.*,2007), (Bevins and Salzman,2011). Les IECs peuvent internaliser par transcytose les antigènes bactériens (Peterson and Artis,2014) stimulant ainsi la production d'IL-1 $\beta$  par les cellules M des plaques de Peyer (Pappo and Mahlman,1993). D'autres cytokines sont sécrétées par les IECs comme l'interleukine 18 capable de stimuler les lymphocytes T et les Innate lymphoid cells (ILCs) dans l'iléon (Munoz *et al.*,2015).

Les cellules épithéliales sont capables de sécréter des cytokines, des molécules agissant comme messenger pour le système immunitaire. En effet, une étude a montré que les cellules de l'épithélium intestinal, après une augmentation de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, pouvaient sécréter de l'IL-8 en réponse à une infection bactérienne (Gewirtz *et al.*,2000). L'épithélium sert également de source à protéases comme la thrombine qui clive le biofilm formé par les bactéries limitant ainsi l'adhésion de ces bactéries (Motta *et al.*,2019).

#### 4.1.2. Détection des signaux exogènes

L'initiation de la réponse immunitaire se fait par les cellules reconnaissant les « Pathogen-associated molecular patterns » (PAMPs) grâce aux récepteurs dits « Pathogen-Recognition Receptors » (PRRs). Parmi ces PRRs, on retrouve les « Toll-like Receptors » (TLRs) présents sur les cellules épithéliales, les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes T et B et les cellules stromales ou encore les endosomes. Les TLRs *via* la voie d'activation de NF- $\kappa$ B (Elewaut *et al.*,1999) permettent la production des cytokines et des chimiokines facilitant le recrutement des cellules immunitaires (Santaolalla *et al.*,2012) pour l'élimination des bactéries infiltrées (Slack *et al.*,2009). L'activation du TLR2, 4 et 7 par les signatures bactériennes permet de limiter l'inflammation, en diminuant l'apoptose épithéliale via les cyclo-oxygénases 2 (COX-2) (Ciorba *et al.*,2012), (Meng *et al.*,2016), (Abt *et al.*,2016). Par ailleurs, une étude a montré que les TLRs étaient important dans le maintien des jonctions serrées (Cario *et al.*,2007). Après irradiation, le TLR2 participait à l'augmentation du nombre de cryptes survivantes (Ciorba *et al.*,2012). Cependant, une forte expression de TLR comme les TLR4 entraînerait une augmentation de la perméabilité intestinale, favorisant l'inflammation (Guo *et al.*,2013). Ainsi, l'expression de ces TLRs doit être régulée, il a été montré que les cytokines produites par les lymphocytes Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13) pouvaient réguler l'expression des TLRs exprimés par les cellules épithéliales (Mueller *et al.*,2006).

#### 4.1.3. Les lymphocytes de la lamina propria

La *lamina propria* est un tissu conjonctif lâche se trouvant sous l'épithélium où la majorité des cellules immunitaires de l'intestin se retrouve dans ce compartiment. Elle contient également les vaisseaux, le système de drainage lymphatique ainsi que les réseaux nerveux (Mowat and Agace,2014). Les lymphocytes de l'intestin se classent en deux catégories : les lymphocytes intraépithéliaux ou infiltrant (IEL) appartenant à l'immunité adaptative et les Innate Lymphoid Cells (ILC) appartenant à l'immunité innée (*Figure 18*).

Les IELs sont directement en contact avec les cellules épithéliales et sont de ce fait proches des antigènes intestinaux (Cheroutre *et al.*,2011). Les IELs ont montré avoir une fonction importante dans le maintien et la protection de la barrière intestinale (Chen *et al.*,2002) (Wershil and Furuta,2008), (Cheroutre *et al.*,2004, 2011). Les lymphocytes de la *lamina*

*propria* sont généralement T CD4<sup>+</sup> mais elle contient également des lymphocytes cytotoxiques T CD8<sup>+</sup> (Carol *et al.*,1998), (Coombes and Maloy,2007), (Wershil and furuta,2008), (Atreya and Neurath,2010), (Mowat and Agace,2014). Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> peuvent se différencier, orientés localement par les cytokines, en lymphocyte T helper 1 (Th1), 2 (Th2), 17 (Th17). Les lymphocytes Treg sont également présents au niveau de la lamina propria où ils participent à la régulation de l'inflammation (Goto and Ivanov,2013).

Les ILCs sont des lymphocytes qui ont des similarités avec les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, Th1, Th2 et Th17, mais ils n'ont pas de récepteurs spécifiques aux antigènes (Spits *et al.*,2013). Les ILCs de type 1 produisent des cytokines de la réponse Th1 (IFN- $\gamma$ ) ainsi que des médiateurs cytotoxiques, les ILCs de type 2 produisent des cytokines de la réponse Th2 (IL-4, IL-13) et les ILCs de type 3 des cytokines de la réponse Th17, IL-17 ainsi que l'IL-22 (Spits *et al.*,2013). Les ILCs sont capable de sécréter rapidement des cytokines immunomodulatrices (Ahluwalia *et al.*,2017). Les cytokines des ILCs sont complémentaires des autres lymphocytes. Une étude montre qu'une injection d'IL-22 chez la souris après une greffe de moelle osseuse permet la régénération épithéliale et le repeuplement des cellules souches intestinales et que lorsque les organoïdes étaient de façon inductible déplétés en cellules de Paneth, l'IL-22 parvenait à initier la régénération épithéliale (Lindermans *et al.*,2015). Cette régénération passerait par la voie STAT3 (Hou *et al.*,2021). De même l'IL-22 protégerait les cellules Lgr5<sup>+</sup> du stress génotoxique (Gronke *et al.*,2019). De manière plus spécifique au syndrome gastro-intestinal, il a été montré que l'IL-22 n'améliorait pas seulement la survie des cellules souches intestinales, mais améliorerait également leur prolifération après irradiation (Lindermans *et al.*,2015).

### Types of Lymphocytes

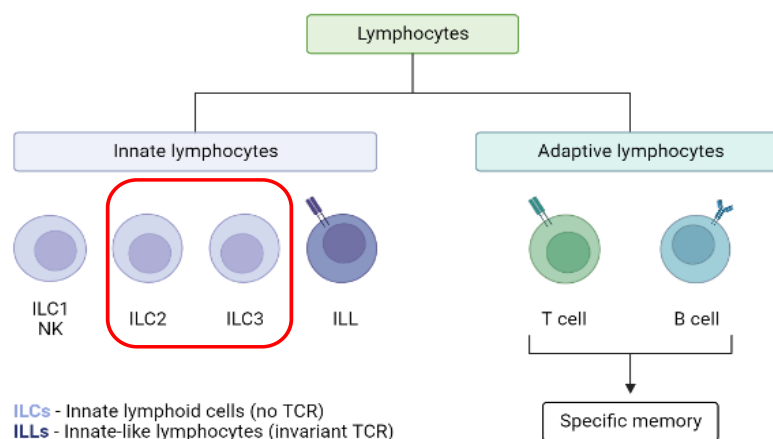
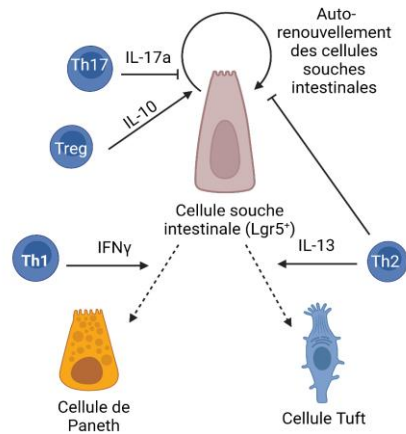


Figure 18 : Organigramme représentant les différents types de lymphocytes. Créé avec biorender.com.

Il a été montré que les ILC1 étaient augmentés chez les patients atteints de maladie de Crohn tandis que c'est les ILC2 qui étaient augmentés chez les patients atteints de colites ulcéraives (Forkel *et al.*,2019).

Les interactions entre les lymphocytes T helpers et les cellules souches intestinales contribuent au maintien des fonctions des cellules Lgr5<sup>+</sup> et au remodelage épithélial (Biton *et al.*,2018). De plus, il a été montré que les cellules Lgr5<sup>+</sup> étaient des cellules présentatrices d'antigènes non conventionnelles, exprimant fortement le CMHII (Complexe d'histocompatibilité) lorsqu'elles sont mises en co-culture avec les lymphocytes T helper CD4<sup>+</sup>. Et que ces cellules Lgr5<sup>+</sup> interagissaient via le CMHII, directement avec les lymphocytes T. Il a été montré que les lymphocytes T helpers pouvaient affecter la différenciation des cellules Lgr5<sup>+</sup> ainsi que leur prolifération (Hou *et al.*,2021) (*Figure 19*). Les lymphocytes T helper 2 produisent de l'IL-4, IL-5, IL-13, IL-6, IL-10 (Van Wijk and Cheroutre,2010) inhibent les fonctions des phagocytes à l'inverse des Lymphocytes T helper 1 qui produisent de l'IFN- $\gamma$ , de l'IL-2 et du TNF- $\beta$ . Les LTh1 induisent principalement des réponses cytotoxiques ainsi que la stimulation des phagocytes, il a été montré que chez des patients atteints de maladie de Crohn, une réponse dominante Th1 (Romagnani,2000). Cependant, une réponse également Th2 dominante est impliquée dans plusieurs pathologies comme la sclérose systémique par exemple (Romagnani,2000). Ainsi une balance entre les deux réponses est nécessaire et doit être régulée.

Une étude a montré que la cytokine IL-10 produite notamment par les lymphocytes Th2 maintenait la niche des cellules souches intestinales (Biton *et al.*,2018) et qu'une inhibition de ces lymphocytes entraînait une différenciation cellulaire aberrante, une perte des cellules Lgr5<sup>+</sup> ainsi qu'une accumulation des cellules différenciées (Biton *et al.*,2018), tandis que les lymphocytes Th17 réduisent le nombre de cellules Lgr5<sup>+</sup> (Tanoue *et al.*,2016), et que les cytokines IL-13, IL-17 et INF- $\gamma$  produites par les lymphocytes T helpers induisaient la perte du pool de CBC (Biton *et al.*,2018). Cependant, l'IL-17 peut être également responsable du recrutement de neutrophiles afin d'apporter une aide dans la protection de la barrière intestinale en exprimant des ROS et de l' $\alpha$ -defensine (Zeng *et al.*,2019).



**Figure 19** : Schéma représentant les interactions entre les différents lymphocytes et les cellules intestinales. Les lymphocytes Tregs et leur cytokine signature l'IL-10 permet de stimuler le renouvellement des cellules Lgr5<sup>+</sup> tandis que les lymphocytes Th17 et leur cytokine signature IL-17a induisent la diminution du renouvellement des cellules Lgr5<sup>+</sup> et stimulent la différenciation. Les lymphocytes Th1 et Th2 inhibe le renouvellement cellulaire des cellules Lgr5<sup>+</sup> et stimulent la différenciation en cellule de Paneth et cellules Tuft. Créé avec Biorender.com

#### 4.1.4. Induction de l'immunotolérance par les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont considérées centrales dans les décisions liées aux réponses immunitaires ou tolérogènes en permettant le maintien de l'homéostasie intestinale (Coombes and Maloy, 2007). Les cellules épithéliales spécialisées de l'intestin produisent des molécules immunomodulatrices qui permettent aux cellules dendritiques de maintenir une activité tolérogénique face aux bactéries commensales (Coombes and Maloy, 2007). Les cellules dendritiques sont divisées en deux catégories : les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) et les cellules dendritiques plasmacytoïde (pDC). Dans cette thèse, seules les cellules dendritiques conventionnelles seront abordées.

Les cellules dendritiques conventionnelles sont retrouvées dans les plaques de Peyer, dans les ganglions lymphatiques et au niveau de la *lamina propria* (Kelsall and Strober, 1996), parmi les cDC il y a deux groupes chez la souris : les cDC1 qui sont identifiés par CD11c<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> tandis que les cDC2 sont de phénotype CD11c<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> (Becker *et al.*, 2014), (Coombes and Maloy, 2007) (Bain *et al.*, 2017). Il y a plus de cDC2 dans l'intestin grêle que dans le côlon. Des populations équivalentes sont rencontrées dans l'intestin humain, leur identification se fait sur la base d'expression de la molécule CD103 et SIRPα plutôt que sur la molécule CD11b (Watchmaker *et al.*, 2014).

Les cDC CD103<sup>+</sup> sont impliquées dans les réponses d'immunotolérance tandis que les cDC CD11b<sup>+</sup> sont impliquées dans la régulation des réponses pro-inflammatoires en produisant de l'IL-12, IL-23, iNOS, TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  (Rivollier *et al.*,2012). Plus particulièrement, les cytokines IL-23 et IL-1 $\beta$  sont impliquées dans la régulation des ILCs (Kinnebrew *et al.*,2012), (Buela *et al.*,2015). Les DC communiquent avec les ILCs afin de maintenir l'immunotolérance intestinale, une perturbation de cette communication entraînerait une inflammation intestinale (Sonnenberg and Artis,2015), (Buela *et al.*,2015).

## 4.2. Les macrophages dans l'homéostasie intestinale

### 4.2.1. Les monocytes

Les monocytes sont continuellement produits en grand nombre dans la moelle osseuse lors de l'hématopoïèse, ils sont circulants contrairement aux macrophages. Les monocytes avec les neutrophiles sont caractérisés comme étant l'« équipe d'urgence » du système immunitaire qui peuvent être recrutés rapidement aux sites lésionnels dans la phase aiguë de l'inflammation mais également pendant la phase chronique (Guilliams *et al.*,2018), ils sont les précurseurs des macrophages et des cellules dendritiques (Trzebanski and Jung,2020). Chez la souris, deux principales populations de monocytes ont été définies : les monocytes inflammatoires dit « classiques » qui sont CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup>CCR2<sup>+</sup> et les monocytes patrouilleurs dit « non classiques » qui sont CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>CCR2<sup>-</sup> (Geissman and Littman,2003), (Serbina and Pamer,2006), (Guilliams *et al.*,2018). Il a été conjecturé que la transition des monocytes inflammatoires vers les monocytes non classiques se ferait dans la circulation (Sunderkötter *et al.*,2004). Chez l'homme, les monocytes sont également divisés en deux populations, mais ne sont pas identifiés par les mêmes molécules : CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> pour les monocytes classiques et CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> pour les monocytes non classiques (Trzebanski and Jung,2020) ; Cependant, dans l'intestin humain les monocytes présentent des similarités fonctionnelles avec ceux des intestins murins (Na *et al.*,2019). L'inflammation intestinale augmente le taux de monocytes relargués de la moelle osseuse et promeut un influx massif vers le tissu intestinal (Trottier *et al.*,2012). Une étude a montré que le taux de recrutement des monocytes vers les tissus non inflammés tels que la rate ou le foie n'était pas impacté lors d'une inflammation intestinale (Desalegn and Pabst ,2019).



Après maturation, les monocytes Ly6C<sup>high</sup> entrent dans la circulation sanguine grâce à leur récepteur CCR2 (Serbina and Palmer,2006). En effet, des souris déficientes en CCR2 sont plus susceptibles de développer des infections bactériennes (Kurihara *et al.*,1997) et chez ces mêmes souris déficientes en CCR2, une diminution des monocytes CCR2<sup>+</sup> dans la circulation sanguine a été observée et associée à une augmentation de la proportion des monocytes CCR2<sup>+</sup> dans la moelle osseuse (Serbina and Palmer,2006). Le ligand du CCR2 est le CCL2 aussi appelé « Monocyte chemoattractant protein 1 » (MCP-1), il joue un rôle dans l'attraction des monocytes et l'infiltration de ces monocytes (Huang *et al.*,2001) (Figure 20).

Une fois dans la circulation les monocytes Ly6C<sup>high</sup> pourront donner naissance aux monocytes Ly6C<sup>-</sup>, ces monocytes vont patrouiller le long de l'endothélium pour éliminer les débris (Chousterman *et al.*,2016), (Trzebanski and Jung,2020). La fonction de patrouilleur de ces monocytes est dû aux faibles taux d'expression des molécules d'adhésion (Yang *et al.*,2014). Lors d'un dommage, les monocytes Ly6C<sup>high</sup> sont recrutés aux sites lésionnels afin de promouvoir une aide à l'inflammation et à sa résolution. Ce rôle a été démontré chez la souris où les monocytes inflammatoires jouaient un rôle de protection des reins lors d'une septicémie (Chousterman *et al.*,2016), dans l'intestin, ces monocytes pouvaient protéger le tissu *via* la sécrétion de l'antagoniste du récepteur d'IL-1 $\beta$  (Arend *et al.*,1998), (Herold *et al.*,2011).

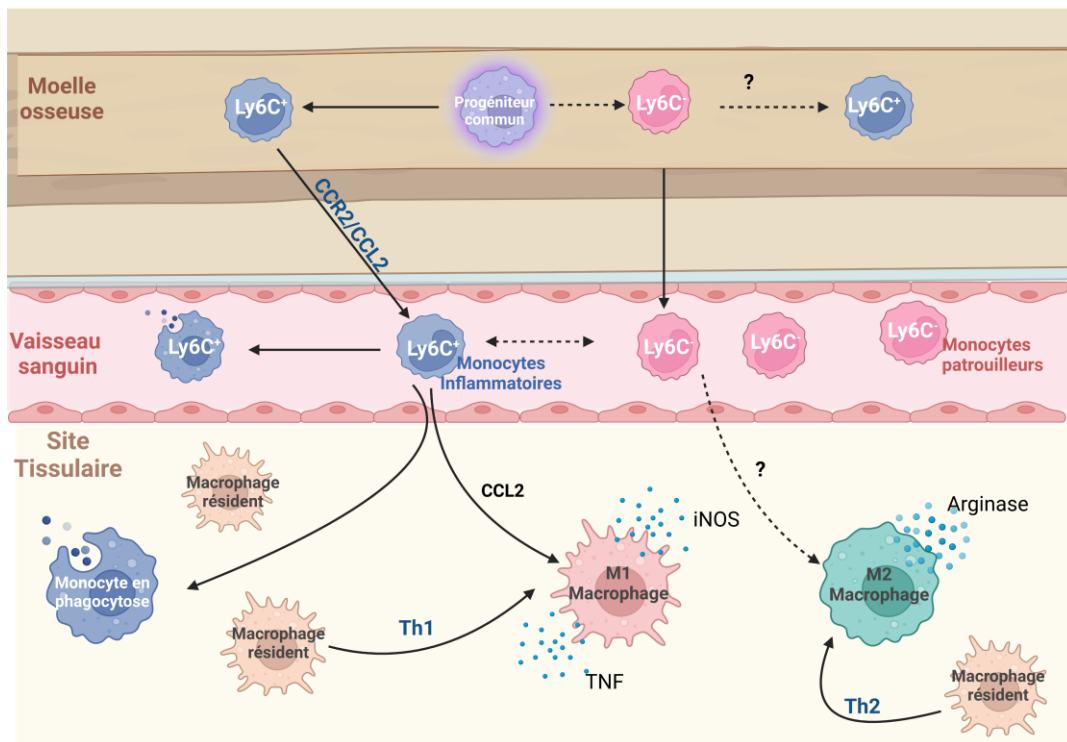
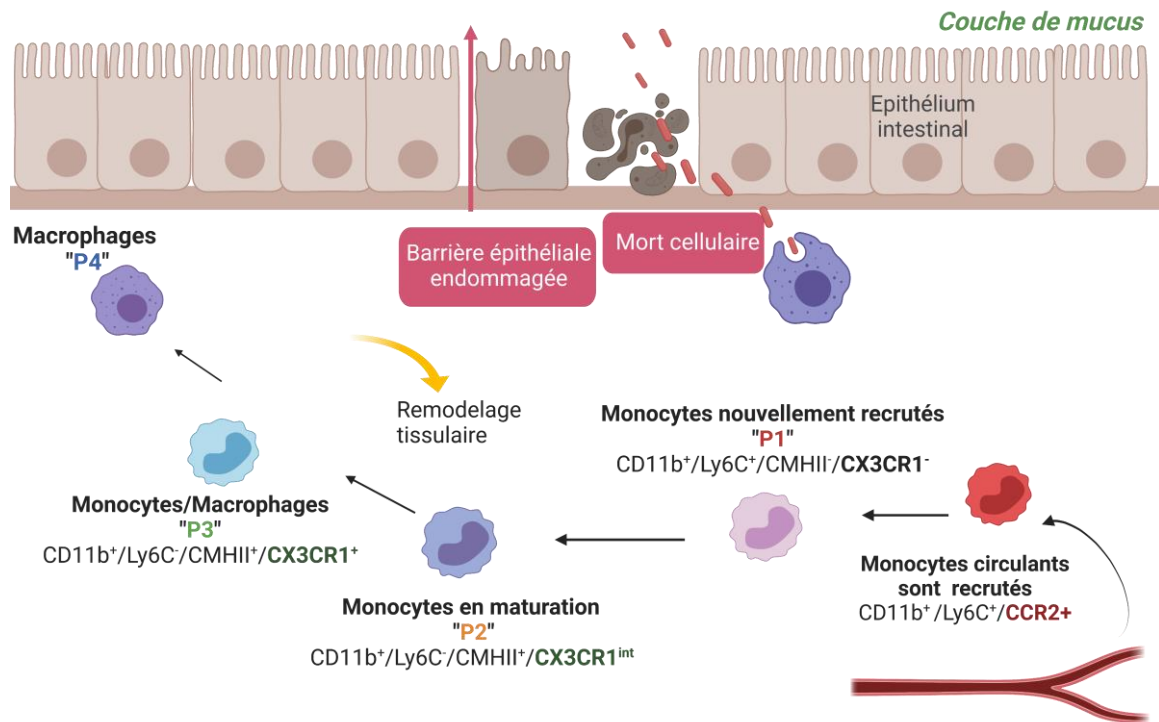


Figure 20 : Schéma illustrant le réseau monocytes/macrophage entre la circulation et le tissu. Créé avec Biorender.com

L'étude de Chousterman *et al.* a montré que les monocytes patrouilleurs  $CD11b^+Ly6C^-CCR2^-$  pouvaient exprimer un autre marqueur, le Cx3Cr1 (Chemokine C-X-3-C motif receptor 1), qui est un récepteur du Cx3CL1 (Chemokine C-X-3-C motif ligand 1). Cette étude a montré que lorsque les monocytes patrouilleurs  $CD11b^+Ly6C^-CCR2^-$  exprimaient le Cx3Cr1, le Cx3Cr1 permettrait d'augmenter le nombre de monocytes inflammatoires  $CD11b^+Ly6C^{high}CCR2^+$  adhérant à l'endothélium rénale et d'infiltrer le tissu (Chousterman *et al.*,2016). Ces monocytes adhèrent à l'endothélium grâce au Cx3Cr1 via LAF-1/ICAM1 (Yang *et al.*,2014). Il a été également montré que les interactions entre le Cx3CL1 et le Cx3Cr1 favorisaient la survie des lymphocytes Th1 et Th2 au site inflammatoire dans le poumon (Mionnet *et al.*,2010). En effet, les personnes souffrant d'asthme allergique possèdent une fraction de lymphocyte T  $CD4^+$  exprimant le Cx3Cr1 (Mionnet *et al.*,2010). Il a été observé que les macrophages exprimant le Cx3cr1 avaient un rôle dans l'immunorégulation de l'inflammation intestinale chez la souris en produisant de l'IL-10 (Marelli *et al.*,2017).

Lors d'une inflammation, les monocytes classiques  $CD11b^+Ly6C^{high}CCR2^+$  vont être extravasés vers le tissu (Guilliams *et al.*,2018) et vont subir une différenciation locale en passant par des phénotypes intermédiaires décrits chez la souris comme étant le « monocyte waterfall » (Tamoutounour *et al.*,2012), (Bain *et al.*,2013).



**Figure 21** : Schéma représentant la maturation des monocytes au niveau de la lamina propria.  
Crée avec biorender.com

Les monocytes qui s'infiltrent dans le tissu sont  $CD11b^+Ly6C^{high}CCR2^+$  au stade précoce de l'inflammation, puis vont être  $CD11b^+Ly6C^{high}CMHII^-Cx3Cr1^{int}$  il s'agira du stade P1 puis le monocyte va acquérir le CMHII c'est le stade P2 avant de perdre le Ly6C pour devenir  $Ly6C^-$  il s'agira du stade P3 et enfin, ce monocyte/macrophage « se transformera » en macrophage exprimant le Cx3Cr1, à ce moment il s'agira d'un macrophage mature, le phénotype entier sera  $CD11b^+Ly6C^-CMHII^+Cx3Cr1^+ F4/80^+$ , il s'agira du stade P4 (Figure 21). Ce processus est dépendant du CSF-1R (Joeris *et al.*,2017) et du TGF- $\beta$  pour la différenciation terminale du stade P3 au stade P4 (Na *et al.*,2019). Les monocytes inflammatoires  $CCR2^+Ly6C^+$  sont connus pour se différencier en macrophages M1 « pro inflammatoires » et les monocytes non classiques  $CCR2^-Ly6C^-$  intervenant plus tardivement dans la réponse inflammatoire se différencient en macrophages M2 « anti-inflammatoires ». Ces macrophages contribuent à l'angiogenèse dans les premiers stades de l'inflammation (Auffray *et al.*,2007), (Yang *et*

*al.*,2014). Il a été montré que les monocytes inflammatoires se différenciaient en macrophages de type M1 en surexprimant deux facteurs de transcription : RelB et PU.1 (Auffray *et al.*,2007) tandis que les monocytes non classiques se différencieraient en macrophages de type M2 en exprimant l'arginase et CD206. De manière intéressante, lors d'une inflammation intestinale les monocytes inflammatoires n'arrivent pas jusqu'au bout du processus de différenciation en macrophages au sein de la lamina propria. Les monocytes vont s'accumuler en stade P2 de maturation et acquérir un phénotype de cellules migratrices et présentatrices d'antigène. Ce phénotype correspondra aux cellules dendritiques dérivées des monocytes pouvant activer les lymphocytes T, maintenant ainsi un environnement pro-inflammatoire. De plus, en situation d'inflammation, les monocytes inflammatoires augmentent l'expression de leur TLR2, se rendant sensible aux produits bactériens, ce qui contribuera également au maintien d'un environnement pro-inflammatoire (Zigmond *et al.*,2012).

Cependant, des études ont révélé des cascades de différenciation de monocytes inhabituelles. En effet, il a été montré dans le tissu musculaire squelettique ou le tissu cérébrale, que des monocytes Ly6C<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup> s'infiltraient dans le tissu et qu'au lieu de donner des macrophages de type M1, ils acquéraient un phénotype ayant des caractéristiques anti-inflammatoires en sous exprimant le Ly6C, donc en passant de Ly6C<sup>+</sup> à Ly6C<sup>-</sup> pour se différencier en macrophage de type M2 afin d'initier une réparation tissulaire (Arnold *et al.*,2007), (Saederup *et al.*,2010). Une autre étude a montré que dans un état d'homéostasie intestinale les monocytes Ly6C<sup>+</sup> avaient la capacité d'être recrutés dans la *lamina propria* et se différencier en macrophages Cx3Cr1<sup>+</sup> (Rivollier *et al.*,2012).

L'ensemble de ces études soulignent la grande plasticité des monocytes à se différencier en macrophages régulateurs ou en macrophages inflammatoires. Ainsi pour résumer, les deux types de monocytes inflammatoires (Ly6C<sup>+</sup>) et non classiques (Ly6C<sup>-</sup>) peuvent en condition inflammatoire se différencier en macrophages de type M1 ou M2 selon les signaux libérés localement (Desalegn and Pabst,2019). Cependant, l'infiltration des monocytes non classiques reste rare et seulement observée dans des conditions d'inflammation spécifiques (Trzebanski and Jung,2020). Dans l'intestin, afin de rétablir l'homéostasie, les monocytes inflammatoires infiltrent le tissu et se différencient en macrophages Cx3Cr1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>, correspondant à un phénotype de macrophage produisant des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et

une réduction de la sécrétion d'IL-6 et de l'expression de la molécule iNOS (Na *et al.*,2019) et une augmentation de la capacité de phagocytose (Bain *et al.*,2013,2014) (Bain *et al.*,2014).

#### 4.2.2. Origines et marqueurs des macrophages

Les macrophages sont des phagocytes mononucléés qui se retrouvent dans tous les tissus. Dans l'intestin, les macrophages résidents sont présent dans toutes les couches comme la *lamina propria*, la musculuse et la séreuse (Desalegn and Pabst,2019). Les macrophages de la séreuse et de la musculuse interagissent avec les neurones entériques afin de contrôler la motilité intestinale et de fournir une protection tissulaire lors d'un dommage à l'intestin (De Schepper *et al.*,2018).

Les macrophages résidents dérivent de précurseurs incluant les cellules souches mésenchymateuses du sac embryonnaire, ainsi que du foie fœtal. Ces macrophages ont la capacité d'auto-renouvellement et persistent jusqu'à l'âge adulte indépendamment des monocytes circulants (Hashimoto *et al.*,2013), (Yona *et al.*,2013). En intégrant les tissus, les macrophages vont exprimer progressivement leurs récepteurs de reconnaissance aux pathogènes et aux cytokines et ainsi acquérir leur fonction (Mass *et al.*,2016). Cependant, dans l'intestin adulte les macrophages d'origine hématopoïétique ont besoin d'un constant renouvellement par les monocytes Ly6C<sup>+</sup> (Bain and Mowat,2014) (Tamoutounour *et al.*,2012) (Bain *et al.*,2013). Ce processus est possible grâce au récepteur CCR2 nécessaire pour le recrutement des monocytes Ly6C<sup>+</sup> de la moelle osseuse, contrairement aux monocytes les macrophages ne migrent pas (Serbina and Pamer,2006), (Bain *et al.*,2013), (Bain and Mowat,2014). Ainsi les macrophages sont soit résidents soit ils proviennent de monocytes circulants.

#### 4.2.3. Polarisation des Macrophages

Le microenvironnement tissulaire contenant une variété de signaux peuvent impacter la polarisation des macrophages vers un phénotype de type M1 appelé macrophage « activé classiquement » ou encore « pro-inflammatoire » ou vers un phénotype de type M2 appelé macrophage « activé alternativement » ou encore « anti-inflammatoire », ces phénotypes

peuvent être identifiés grâce à la production de facteurs spécifiques, l'expression de marqueurs particuliers et de l'activité biologique (Mosser *et al.*,2008), (Murray *et al.*,2014).

En réponse à l'activation du TLR par des motifs bactériens type LPS ou cytokines de type IFN- $\gamma$  ou du TNF- $\alpha$ , les macrophages naïfs vont acquérir un phénotype de type M1, initié par l'activation du TLR4 et l'augmentation de l'expression du facteur NF- $\kappa$ B (Mosser *et al.*,2008), (Martinez *et al.*,2008), (Shapouri-Moghaddam *et al.*,2018). Une fois le phénotype M1 exprimé, les macrophages vont produire des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23 et CCL2 (Mosser *et al.*,2008), (Shapouri-Moghaddam *et al.*,2018), IL-12 et IL-23 étant impliqués dans la polarisation des lymphocytes en un phénotype Th1 (Mantovani *et al.*,2002). En parallèle il a été montré que l'augmentation de la production d'iNOS induisait la conversion de la L-arginine en oxyde de nitrite et citrulline, qui, combinée à la production d'espèces ROS, entraînerait des dommages au tissu et une réparation défectueuse (Arora *et al.*,2018). En cas d'inflammation chronique, les macrophages de type M1 sont responsables de la destruction tissulaire.

Inversement, différentes cytokines telles que l'IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  et IL-13 peuvent induire la polarisation du macrophage en type M2, cependant, ce phénotype peut être classé en sous-catégories : M2a, M2b, M2c (Mantovani *et al.*,2004). La stimulation par IL-4 et IL-13 entraîne l'expression de la molécule CD206 par le macrophage M2a et du récepteur à l'IL-1 $\beta$  (IL-1R) et la sécrétion de facteurs pro-fibrosant comme le TGF- $\beta$  ou encore la fibronectine (Wynn and Vannella,2016). Les macrophages M2b sécrètent des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 ainsi que l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  qui vont activer la réponse humorale. Les macrophages M2c sont activés par l'IL-10 et sont appelés « macrophages de désactivation » qui vont produire de fort taux de TGF- $\beta$  (Röszer *et al.*,2015). Les macrophages M2 d'une manière générale expriment les récepteurs du Mannose, du Galactose et de l'Arginase associés à l'expression du récepteur IL-1Ra (Dinarello *et al.*,2005) et sont impliqués dans les réponses Th2, dans le remodelage tissulaire et la réparation.

Le phénotype des macrophages dépendra de leur environnement, et que lorsque les monocytes se différencient en macrophage de type M1 celui-ci peut basculer vers un macrophage de type M2, en effet, il a été montré que lorsque le facteur de transcription NF- $\kappa$ B était inhibé, une polarisation des macrophages de type M1 vers un type M2 est observée (Wang *et al.*,2014). Cependant, cette classification des phénotypes de macrophages de type

M1 et M2 est destinée à évoluer, car la réalité n'est pas si stringente. En effet, une étude a montré qu'un macrophage de type M1 était capable d'être impliqué dans des fonctions de réparation (Novak and Koh,2013). Ainsi, la réponse immunitaire *via* les macrophages n'est pas seulement M1 ou M2 elle forme un équilibre régulé *via* les signaux tissulaires locaux (Desalegn and Pabst,2019).

Parmi les molécules ayant un rôle essentiel dans l'environnement des macrophages, on trouve le « transforming growth factor » (TGF- $\beta$ ) et le Cx3CL1. Le TGF- $\beta$  induit la différenciation terminale du macrophage dans la muqueuse intestinale (Na *et al.*,2019). Également, il a été montré qu'un déficit d'expression de Cx3CR1 par les macrophages entraînait une diminution d'expression d'IL-10 et de ce fait une diminution d'activation des Treg dans la *lamina propria* (Hadis *et al.*,2011). De plus, les macrophages exprimant le Cx3CR1 ont la capacité de capturer les antigènes solubles et luminaux grâce à l'extension de dendrites transépithéliales (Kim *et al.*,2011).

Les macrophages sont capables de maintenir le système immunitaire silencieux et préserver une coexistence avec la flore de la muqueuse intestinale et en cas de besoin sont capables de déclencher la réponse immunitaire (Kühl *et al.*,2015).

#### 4.2.4. Macrophages et régénération tissulaire

L'un des aspects les plus intéressants des macrophages est leur implication dans la fonction de réparation tissulaire et de régénération. Le « Colony Stimulating Factor 1 » (CSF-1) est une molécule qui joue un rôle dans la survie, la prolifération et la différenciation des macrophages dans l'intestin. Des études ont montré que lorsque CSF-1 n'était pas exprimé, le nombre de macrophages intestinaux diminuait drastiquement (Ryan *et al.*,2001), (Dai *et al.*,2004). Chez des souris déficientes en CSF-1, une étude a montré qu'il y avait une perte de macrophages qui entraînait une dérégulation de la différenciation des entérocytes et une perte des cellules de Paneth (Huynh *et al.*,2013). De même, lorsque CSF-1 était déplété suite à l'injection d'anticorps anti-CSF-1R, cela impactait la différenciation des cellules de Paneth. Cette absence des cellules de Paneth a entraîné une diminution du nombre de cellules Lgr5<sup>+</sup> et impactait la différenciation épithéliale (Sauter *et al.*,2014). Le caractère essentiel du CSF-1 dans le

maintien de l'homéostasie intestinale a été ainsi souligné dans de nombreuses études (Sehgal *et al.*,2018).

Les macrophages peuvent produire des médiateurs initiant le renouvellement épithélial intestinal, comme la prostaglandine (PGE<sub>2</sub>), de l'« hepatocyte Growth Factor » (HGF) et les ligands de Wnts (Ortiz-Masia *et al.*,2014) (Cosin-Roger *et al.*,2016)(Chng *et al.*,2016). Des éléments suggèrent un lien entre une différenciation altérée dans la lamina propria des monocytes et une mauvaise résolution de l'inflammation, causant ainsi une augmentation de la sécrétion de cytokine pro-inflammatoires telles que l'IL-23 et le TNF- $\alpha$  chez des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques intestinales (Bain *et al.*,2013) (Bernardo *et al.*,2018).

Les macrophages sont capables d'influencer la perméabilité de la barrière épithéliale *via* la sécrétion d'IL-6, amplifiant le risque d'invasion de pathogènes (Du Plessis *et al.*,2013). Ils vont pénétrer l'épithélium intestinal en formant des structures appelées « Trans-epithelial dendrites » (TED) facilitant la capture des antigènes au niveau luminal, il s'agirait de macrophages exprimant la molécule Cx3Cr1 (Niess *et al.*,2005).

#### 4.2.5. Les neutrophiles

Les neutrophiles faisant partie de la lignée myéloïdes sont des cellules indispensables à l'immunité innée (Patel *et al.*,2021). Chez l'homme, dans la circulation sanguine les neutrophiles sont la plus large population de leucocytes par litre de sang (Patel *et al.*,2021). Ils sont les premiers à être recrutés sur le site inflammatoire, facilité par l'expression de nombreuses molécules d'adhésion sur la membrane des neutrophiles et de l'endothélium (Kolaczowska *et al.*,2013). Leur durée de vie est courte environ 24 h pour la souris et 8 h chez l'homme en condition non inflammatoire (Naumenko *et al.*,2018) ; Cependant, cette durée de vie pouvait être rallongée lors d'une inflammation jusqu'à 12 h chez la souris et 5 jours chez l'homme (Pillay *et al.*,2010).

Les neutrophiles possèdent des granules azurophiles et des vésicules sécrétoires contenant des cytokines, du lysozyme, des métalloproteinases, de la cathelicidine et de la myeloperoxydase (Häger *et al.*,2010), (Cowland and Borregaard,2016). Ces granules sont libérés au site lésionnel ou de l'infection afin d'apporter une réponse rapide face aux pathogènes (Rosales *et al.*,2020). Le facteur chemoattractant (l'IL-8 ou CXCL8) guide les



neutrophiles jusqu'au site de l'inflammation (De Oliveira *et al.*,2013) (Motwani *et al.*,2016). La reconnaissance des pathogènes par les macrophages résidents du tissu est également en partie responsable du recrutement des neutrophiles (Cailhier *et al.*,2005), même si d'autres cellules immunitaires résidentes dans le tissu peuvent aussi moduler leur infiltration (Kim and Luster,2015). La génération de neutrophiles implique une série d'étape de maturation commençant par les progéniteurs « granulocyte-macrophage progenitors » (GMPs) dans la moelle osseuse donnant des pré-neutrophiles qui se développeront en neutrophiles immatures puis matures et relargués dans la circulation (Evrard *et al.*,2018). CXCR4 est un récepteur clé impliqué dans la rétention des neutrophiles au sein de la moelle osseuse *via* l'interaction avec le CXCL12 (Eash *et al.*,2010). Les neutrophiles ont été caractérisés par leur mécanisme de défense contre les pathogènes, en produisant des ROS, des peptides microbiens et de la NETosis, qui correspond à un programme de mort cellulaire des neutrophiles (Brinkmann *et al.*,2018). Ces mécanismes ne sont pas spécifiques des pathogènes et peuvent résulter en dommages collatéraux sur le tissu, ainsi ces cellules sont « programmées » pour mourir rapidement afin d'empêcher des dommages excessifs (Patel *et al.*,2021)(Figure 22).

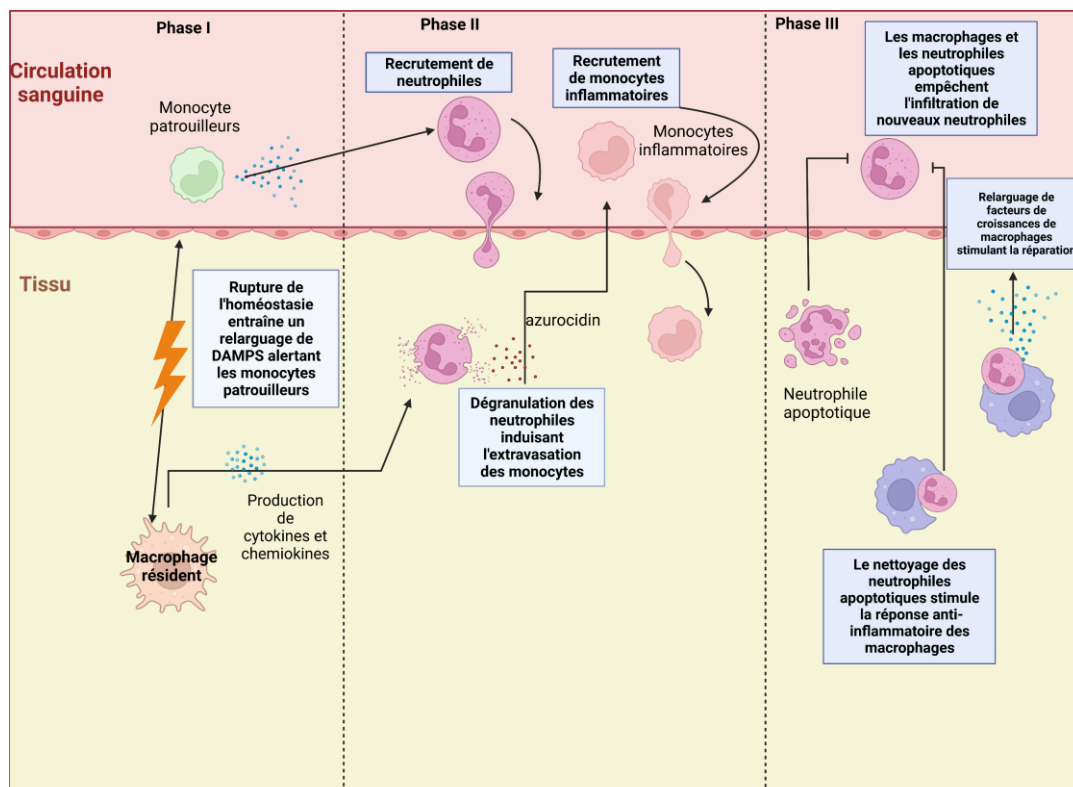


Figure 22: Schéma représentant les relations existantes entre les monocytes/macrophages/neutrophiles durant l'inflammation. Créé avec Biorender.com et basé sur l'article : Soehnlein, O., & Lindbom, L. (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 10(6), 427-439.

### 4.3. Inflammation radio-induite

L'exposition aux rayonnements ionisants peut être considérée comme un signal pro-inflammatoire, la réponse du tissu intestinal à l'irradiation est immédiate et s'installe dans le temps (François *et al.*,2013). Cette réponse inflammatoire est initiée par la production de ROS et l'induction d'apoptose des cellules épithéliales intestinales ainsi que des cellules des cryptes. Ce qui entraîne une dégradation de la muqueuse et une activation des facteurs de transcriptions de plusieurs cytokines pro-inflammatoires et des facteurs de croissance. L'ensemble de ces phénomènes accélèrent le recrutement des cellules immunitaires et l'activation de celles résidentes dans le tissu. En effet, il a été montré après irradiation chez la souris une infiltration de lymphocytes dans la lamina propria (Polistena *et al.*,2008) (Ong *et al.*,2010). Les cellules immunitaires vont produire de l'IL-6 et l'IL-17 afin de stimuler la prolifération du compartiment cellule souche de l'intestin (Biswas *et al.*,2015). Les neutrophiles sont ceux qui sont recrutés rapidement au site lésionnel, et leur présence est caractéristique de l'inflammation aiguë (François *et al.*,2013). Les monocytes pro-inflammatoires Ly6C<sup>+</sup> vont infiltrer le tissu et activer les macrophages résidents ainsi que les mastocytes qui vont produire des cytokines pro-inflammatoires tel que l'IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, le TGF- $\beta$  et le TNF- $\alpha$  (Soehnlein and Lindbom,2010). Simultanément l'activation des fibroblastes entrainera la sécrétion de MMP1 et 3 (métalloprotéinases) qui vont dégrader la lame basale épithéliale amplifiant ainsi la réponse inflammatoire radio-induite du tissu (Sonis *et al.*,2004). L'activation des cellules endothéliales irradiées va inter l'expression des molécules d'adhésion comme la E-selectine, la P-selectine, ICAM-1 et VCAM-1 (Molla *et al.*,2003). De plus, l'irradiation de l'endothélium vasculaire entraîne l'apoptose des cellules endothéliales et l'acquisition d'un phénotype pro-inflammatoire, prothrombotique et antifibrinolytique avec une sécrétion accrue de médiateurs solubles tels que les cytokines, les chimiokines et les facteurs de croissance (Wang *et al.*,2007).

Il a été montré chez 17 patients, de 2 à 6 semaines après leur radiothérapie pour le traitement d'un carcinome de la prostate, une invasion de macrophages et un changement des MMP-9 et 2 au niveau de la muqueuse rectale ; ainsi l'exposition aux rayonnements ionisants entraîne une stimulation des macrophages (Hovdenak *et al.*,2002). De même, chez le rat après une exposition en dose unique localisée de l'intestin ou en fractionnée, une augmentation du

nombre des macrophages et de l'expression du TGF- $\beta$  est observée (Boerma *et al.*,2006). Chez la souris les mêmes résultats sont observés après irradiation en dose unique à 27 Gy (Blirando *et al.*,2011). Une augmentation de neutrophiles a été également observée chez des patients atteints de défaillance multiviscérale (MOF) (Botha *et al.*,1995) et l'apoptose des neutrophiles était significativement retardée ainsi que l'initiation de leur nettoyage (Biffl *et al.*,1999).

La réponse immunitaire innée suite à l'exposition aux rayonnements ionisants, induit des modifications du microenvironnement, ce qui favorise la maturation des cellules dendritiques et ainsi la présentation des antigènes aux lymphocytes T et B (François *et al.*,2013). Il a été montré qu'après irradiation abdominale chez le rat, une augmentation du taux de lymphocytes Treg a été observée avec une défaillance dans leur capacité à immunomoduler les lymphocytes T ce qui favorise l'inflammation et compromet la réparation tissulaire (Billiard *et al.*,2011). Dans une autre étude, chez le rat après une irradiation colorectale fractionnée, une polarisation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en Th2 est observée et ce déséquilibre en faveur des Th2 persiste jusqu'à 6 mois post-irradiation (Grémy *et al.*,2008). Il a été montré que le déséquilibre de la balance Th1/Th2 jouait un rôle crucial dans le développement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, avec une réponse pro Th1 dans la maladie de Crohn et une réponse pro Th2 dans la rectocolite hémorragique (François *et al.*,2013). Une diminution de la capacité des cellules dendritiques à présenter l'antigène aux lymphocytes T a été observée, avec des taux bas de TNF- $\alpha$  produits et d'IL-6 après un choc hémorragique chez la souris (Kawasaki *et al.*,2006).

## Partie 5 : Thérapie cellulaire innovante

### 5.1. Définition des cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses ont été pour la première fois décrites en 1860 par l'équipe de Cohnheim. Ils ont démontré qu'il existait des cellules non-hématopoïétiques, adhérentes au plastique et ayant des caractéristiques de fibroblastes de la moelle osseuse, et que ces cellules étaient impliquées dans les processus de cicatrisation (Prockop *et al.*,2009). En 1869 Goujon a observé chez la poule et les lapins, que leur moelle osseuse avait la capacité de créer des ossifications lorsqu'elle était transplantée au muscle (Goujon *et al.*,1869). Il faudra attendre 1970 afin que ces cellules soient caractérisées ; en effet, il a été montré que lorsque la moelle osseuse était dépourvue d'os, elle contenait des cellules à potentiel ostéogénique (Tavassoli and Crosby,1968). Friedenstein *et al.* ont confirmé l'existence d'une population cellulaire qui peut adhérer aux surfaces utilisées en culture cellulaire et qui ont une capacité de différenciation *In Vitro* et *In Vivo* (Friedenstein *et al.*,1976) (Owen and Friedenstein,2007). L'équipe de Caplan a montré la capacité des cellules à se différencier en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes (Caplan *et al.*,1991); ainsi, ces cellules ont été nommée « cellules souches mésenchymateuses » (CSMs) (Figure 23).

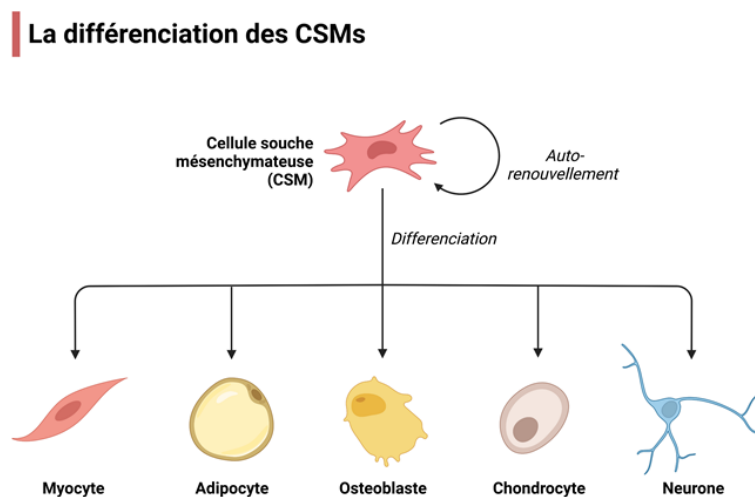


Figure 23 : Schéma illustrant la multipotente des cellules souches mésenchymateuses.  
Crée avec Biorender.com

Cependant, l'intérêt grandissant pour les CSMs et l'augmentation du nombre d'études utilisant les CSMs ont nécessité une clarification dans la dénomination (Horwitz *et al.*,2005). Ainsi lors du workshop annuel de l'ISCT « International Society For Cellular Therapy » a été officialisée l'utilisation du terme « cellules souches mésenchymateuses » (Dominici *et al.*,2006). De plus, afin de faciliter les comparaisons des études faites sur les CSMs, l'ISCT a proposé des critères minimaux afin de définir ces cellules.

- ✓ Les cellules doivent adhérer au plastique en condition de culture (Dominici *et al.*,2006).
- ✓ L'expression de marqueurs spécifiques afin d'identifier les CSMs comme CD105, CD90 CD44, CD29, CD73 et négatives pour les marqueurs CD45, CD31, CD34, CD14 ou CD11b, CD19 (Dubey *et al.*,2018). Il a été largement décrit que le CD34 n'était pas présent sur la surface des CSMs, mais il s'agit de CSMs cultivées *In Vitro* et non sur des CSMs résidentes de tissu (Lin *et al.*,2012). Des études ont montré que le CD34 était présent sur les cellules souches mésenchymateuses fraîchement isolées du tissu adipeux et disparaissait après plusieurs passages en culture cellulaires (Lin *et al.*,2010), (Lin *et al.*,2012).
- ✓ Leur capacité à se différencier en ostéoblastes, adipocytes et chondroblastes dans les conditions normales de culture *In Vitro* (Dominici *et al.*,2006).

Ainsi, ces critères établis permettent de regrouper des populations cellulaires sous une appellation unique (Dominici *et al.*,2006). Cependant, ces critères étant des critères minimaux, d'autres critères existent afin de caractériser les CSMs comme leur capacité à se différencier en différents types cellulaires de plusieurs lignées, la sécrétion de facteurs solubles importants pour la survie cellulaire ainsi que la prolifération, leur capacité d'immunomodulation et enfin leur migration au site lésionnel (Squillaro *et al.*,2016).

## 5.2. Source et obtention des CSMs

Les CSMs sont présentes dans pratiquement tous les tissus du corps humain, cependant, elles ont été pour la première fois isolée de la moelle osseuse (Caplan *et al.*,1991), elles sont multipotentes et peuvent se différencier en plusieurs lignées mésenchymateuses (Berebichez-Friedman and Montero-Olvera,2018) et régénérer l'os, le cartilage, les muscles et les cellules

endothéliales (Wei *et al.*,2013). Les CSMs présentent un énorme potentiel pour le traitement de nombreuses maladies immunologiques ou non (Squillaro *et al.*,2016).

Le choix du tissu d'origine des CSMs repose plus sur la facilité et la richesse des prélèvements que sur la comparaison de l'efficacité de leur origine dans une pathologie donnée (Martinaud *et al.*,2010). Actuellement, les principales sources de CSMs sont la moelle osseuse et le tissu adipeux (Stanko *et al.*, 2014).

**La moelle osseuse** permet une utilisation à visée autologue ou allogénique (Martinaud *et al.*,2010). Le prélèvement est basé sur le même principe que celui du recueil des cellules souches hématopoïétiques, les ponctions se font au niveau des crêtes iliaques. Les cellules hématopoïétiques en culture disparaissent progressivement car non adhérentes au profit des CSMs (Martinaud *et al.*,2010). Les CSMs de la moelle osseuse BM-CSMs (Bone Marrow mesenchymal stem cells) ont été utilisées dans une étude clinique visant à améliorer les paramètres diastoliques chez des patients ayant eu un infarctus du myocarde. L'injection de BM-CSMs a été réalisée en autologue et a montré une amélioration de ces paramètres, cependant cette amélioration n'a pas excédé 5 ans (Schaefer *et al.*,2010). Une autre étude clinique a été réalisée avec des patients atteints d'ostéoarthrite, des injections en autologue de BM- CSMs d'1 million, 10 millions et 50 millions de cellules ont été réalisées, une réduction de l'inflammation synoviale et de la dégradation du cartilage a été observée (Chahal *et al.*,2019). Les BM-CSMs ont été utilisées également au niveau digestif, chez des patients atteints de maladie de Crohn, où il a été montré premièrement que les BM-CSMs de patients atteints de la maladie avaient la même capacité de prolifération, les mêmes phénotypes par rapport à des patients sains et deuxièmement, après injection d'1 à 2 millions de cellules en intraveineux, une diminution des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> a été observée au profit des lymphocytes T régulateurs avec une diminution des cytokines pro-inflammatoires comme TNF- $\alpha$  , IL1- $\beta$  et IL-6 (Duijvestein *et al.*,2010). Les BM-CSMs ont aussi montré avoir un effet dans la transplantation de rein, où 7 jours après la transplantation rénale, l'injection de BM-CSMs a induit une diminution significative de l'activité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Perico *et al.*,2011). Chez le rat après irradiation, il a été observé suite à l'injection de BM-CSMs une stimulation de la régénération de l'épithélium du colon et la survie des animaux a été améliorée (Sémont *et al.*,2013). Lors d'un accident de radio-oncologie à l'hôpital public d'Epinal en France, des patients subissant une radiothérapie conformationnelle pour un

cancer de la prostate ont reçu un surdosage de 20 % à 25 % au rectum pour une dose totale de plus de 75 Gy (Voswinkel *et al.*, 2013). Une toxicité de grade II à IV sur l'échelle 3.0 des critères de terminologie commune pour les événements indésirables a été rapportée. Trois patients présentant des douleurs sévères réfractaires au traitement opioïde ont reçu  $5 \times 10^6$ ,  $2,6 \times 10^6$  et  $5 \times 10^6$ /kg de BM-CSMs, respectivement, par injection intraveineuse. Après le traitement par BM-CSMs, deux patients ont révélé une réponse clinique pour la douleur et l'hémorragie. Chez un patient, la douleur est réapparue après 6 mois et a de nouveau répondu de manière substantielle lors d'une seconde perfusion de BM-CSMs. Chez un patient, un processus de fistulisation a pu être arrêté. Dans ce cas, une rémission stable a été observée pendant plus de 3 ans de suivi. Après les injections de BM-CSMs, une diminution des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> et une augmentation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ont été observées.

L'utilisation de BM-CSMs en allogénique peut induire des réponses immunitaires qui conduiraient au rejet de la greffe, en effet, il a été montré dans un modèle de transplantation en pré-clinique chez le rat, que les BM-CSMs accentuaient l'inflammation et les dommages rénaux conduisant à son rejet (Seifert *et al.*, 2012). Chez l'homme lors d'un essai clinique, les BM-CSMs injectées en allogénique ont été combinées à une faible dose de tacrolimus, un immunosuppresseur afin de prévenir un éventuel rejet de greffe, aucun rejet sur les 6 patients n'a été enregistré après la transplantation jusqu'à 2 ans post-injection (Peng *et al.*, 2013), (Pan *et al.*, 2016). Cependant, l'isolement des BM-CSMs est une technique invasive avec un risque d'infection (Naji *et al.*, 2019), malgré le fait que cette source de CSMs soit la plus documentée et utilisée en clinique et en pré-clinique (Yin *et al.*, 2019).

**Le tissu adipeux** est un tissu abondant en CSMs, facile d'accès et n'entraîne aucun risque pour le donneur (Martinaud *et al.*, 2010). La graisse est récupérée sous forme de tissu semi-solide lors de lipo-aspiration, de résection (technique de Coleman) ou de plasties abdominales (Dubey *et al.*, 2018). Le tissu graisseux subit une dissociation enzymatique et/ou mécanique, les ASCs pour « Adipose-derived stem cells » sont mises en culture. Le vacuum ou l'aspiration à la seringue sont les techniques les plus utilisées pour récolter le tissu adipeux, cependant, la taille de la canule et le type de seringue utilisé peuvent affecter le rendement, la taille et la viabilité des cellules (Özsoy *et al.*, 2006). Afin de normaliser les préparations de digestion du tissu des appareils ont été commercialisés (Oberbauer *et al.*, 2015).

Les caractéristiques des ASCs sont similaires aux BM-CSMs (Choudhery *et al.*,2014). Cependant, le rendement d'obtention des CSMs issues du tissu adipeux est influencé par différents facteurs, comme l'âge, la localisation du tissu adipeux, la technique de récupération et l'espèce (Iyyanki *et al.*,2015), (Kornicka *et al.*,2015). Une étude comparative entre le tissu adipeux des hanches, de l'abdomen et le tissu adipeux prélevé au niveau de la joue (boules de Bichat) chez des donneurs mâles et femelles a montré que les CSMs issues des boules de Bichat avaient les taux les plus élevés de prolifération, une source prometteuse de CSMs pour la régénération du tissu osseux (Rezai Rad *et al.*,2017). Aucune variation significative de la viabilité et du rendement d'obtention des CSMs n'ont été observés entre le tissu adipeux des hanches, de l'abdomen ou encore de la cuisse (Oedayrajsingh-Varma *et al.*,2006). Une autre étude comparative a montré que le tissu adipeux superficiel est une meilleure source de ASCs (Di Taranto *et al.*,2015). Deux études ont montré que l'âge diminue la capacité de rendement et de différenciation des cellules souches (Girolamo *et al.*,2009), (Alt *et al.*,2012).

Les CSMs issues du tissu adipeux peuvent sécréter différentes cytokines ainsi que des facteurs de croissance aux propriétés anti-inflammatoires et anti-apoptotiques comme l'HGF et le VEGF (Berebichez-Fridman and Montero-Olvera,2018). Le tissu adipeux est une excellente source de CSMs en allogénique, car ces CSMs n'expriment pas le complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II) minimisant le risque de rejet (Cagliani *et al.*,2017). Une étude clinique a montré que l'utilisation de CSMs issues du tissu adipeux pour la régénération du myocarde entraînait l'amélioration des fonctions cardiaques et une diminution du tissu cicatriciel (Houtgraaf *et al.*,2012). Dans un modèle de déficience de cellules souches limbiques de la cornée chez le rat, les CSMs issues du tissu adipeux améliorent la cicatrisation et induisent une immunomodulation et de manière intéressante, cette étude a également montré que lorsque le milieu de culture des CSMs issues du tissu adipeux est modifié celui-ci peut avoir un impact sur la capacité de sécrétion des CSMs en potentialisant notamment la sécrétion de cytokines (Nieto-Nicolau *et al.*,2021).

Récemment, une étude a montré la faisabilité du stockage des cellules souches mésenchymateuses issues du tissu adipeux, ce qui permettrait de faciliter les futures applications cliniques (Semenova *et al.*,2021).

Les CSMs sont présentes **dans les tissus extra-foetaux** comme dans la gelée de Wharton entourant les vaisseaux du cordon, dans le liquide amniotique ainsi que dans les couches du



placenta, l'amnios et le chorion (Martinaud *et al.*,2010). Les CSMs issues de la gelée de Wharton (WJ-MSCs pour « Wharton Jelly Mesenchymal stem cells ») ont montré une grande capacité proliférative (Alves Da Silva *et al.*,2015). Le rendement d'obtention des CSMs suivant les compartiments est également différent avec un rendement supérieur pour la gelée de Wharton et le cordon ombilical par rapport au sang de cordon (Hass *et al.*,2011), (Nagamura-Inoue *et al.*,2014). Les CSMs issues du cordon ombilical exprimaient plus de marqueurs de pluripotence que les CSMs adultes (Jin *et al.*,2013). Chez la souris, après une irradiation corps entier de 4 à 10,5 Gy des injections intraveineuses de CSMs issues de la gelée de Wharton (entre 0,25 à 1,5 millions de cellules) une protection du syndrome gastro-intestinal radio-induit et du syndrome hématopoïétique a été montrée, même lorsque les WJ-CSMs étaient injectées 24 h post-irradiation et associées à la Tetracycline induisant une accélération de la régénération du tissu hématopoïétique (Bandekar *et al.*,2020). Un Knockdown de G-CSF et d'IL-6 chez les WJ-CSMs a induit une perte d'efficacité de ces cellules chez la souris irradiée corps entier à fortes doses d'irradiation démontrant le rôle radioprotecteur de ces cytokines issues des WJ-CSMs (Bandekar *et al.*,2020). Dans un modèle d'irradiation cutanée à 40 Gy chez le rat, des CSMs déposées grâce à un hydrogel au niveau de la plaie tous les deux jours pendant 8 semaines ont induit une protection et une cicatrisation. Cette régénération semblait être dépendante de facteurs sécrétés par les CSMs qui stimulaient l'angiogenèse et la division des cellules endothéliales (Sun *et al.*,2019). Deux essais cliniques sont en cours de recrutement de patients, afin d'utiliser des WJ-CSMs chez des patients atteints de COVID-19 (Bandekar *et al.*,2021).

### 5.3. Propriétés biologiques des CSMs

#### 5.3.1 La capacité d'immunomodulation

Plusieurs études ont montré le potentiel immunomodulateur des CSMs sur les lymphocytes T, les cellules dendritiques, et les lymphocytes B (Cagliani *et al.*,2017). Une étude a montré chez la souris dans un modèle d'arthrite rhumatoïde, que l'injection de CSMs issues du tissu adipeux induisait la suppression de la différenciation des Th1, ainsi que la production de lymphocytes Treg ayant la capacité de supprimer les réponses des lymphocytes T auto-réactifs (Gonzalez *et al.*,2009). Il a également été montré dans un modèle de souris diabétiques une protection des souris du diabète par la production d'IL-10 qui stimule les lymphocytes FoxP3<sup>+</sup>

Treg protégeant ainsi les souris de la destruction auto-immune des îlots de Langerhans (Madec *et al.*,2009). Il a été conclu que les CSMs avaient la capacité de supprimer la réponse auto-immune *via* les Th1 (Duffy *et al.*,2011). En présence de BM-CSMs injectées en allogénique, une diminution du nombre d'éosinophiles infiltrants ainsi qu'une réduction de la production d'IL-4 et d'IL-13 associées à une augmentation des lymphocytes Treg ont été observées dans un modèle murin d'inflammation des voies respiratoires (Kavanagh and Mahon,2011). De manière intéressante, une étude a révélé dans un modèle murin d'inflammation hépatique, que l'IL-17 potentialisait l'effet immunosuppresseur des CSMs sur la prolifération des lymphocytes T *via* l'expression d'iNOS par les CSMs (Han *et al.*,2014). Précédemment il avait été montré que les CSMs en sécrétant de « l'hépatocyte Growth Factor » (HGF) ainsi que de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  inhibaient la prolifération des lymphocytes T *in vitro* (Ryan *et al.*,2007), la neutralisation par des anticorps anti-TGF- $\beta$  et anti-HGF restaurait la prolifération des lymphocytes T (Di Nicola *et al.*,2002). D'autres études ont également montré que l'IFN- $\gamma$  seul ou en combinaison avec le TNF- $\alpha$  stimulaient l'expression de cyclooxygénases (COX-2), d'IDO et la sécrétion du PGE2 par les CSMs permettant de moduler l'activité immunosuppressive (Krampera *et al.*,2006), (Ryan *et al.*,2007), (Delarosa *et al.*,2009).

Les CSMs peuvent agir également sur d'autres cellules immunitaires que les lymphocytes T. *In vitro* les BM-CSMs sont capables de réduire significativement la différenciation des monocytes en cellules dendritiques en diminuant l'expression du CD80, CD83 et HLA DR et dès que les CSMs sont retirées de la co-culture, les monocytes se différencient en cellules dendritiques, ceci démontrant que l'inhibition observée s'effectue *via* un contact cellule-cellule ou *via* la production de facteurs solubles (Nauta *et al.*,2006). De même *in vitro* les CSMs augmentent la production d'IL-10 par les cellules dendritiques matures stimulées par le LPS et diminuent la sécrétion du facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ), induisant un phénotype plus anti-inflammatoire ou tolérant (Aggarwal and Pittenger,2005) (Figure 24).

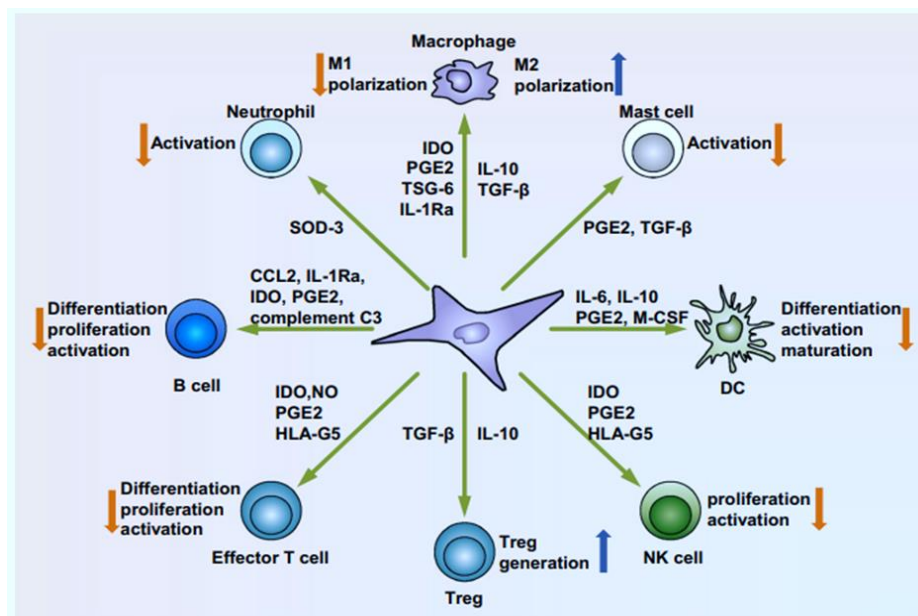


Figure 24 : Schéma illustrant les capacités d'immunomodulation des CSMs. Tiré et modifié de l'article: Li, N., & Hua, J. (2017). Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74, 2345-2360.

Le potentiel de régénération des CSMs passe également par leur sécrétome (cytokines, chimiokines, facteurs inflammatoires, facteurs de croissance, exosomes et microvésicules) (Wechsler *et al.*, 2021). Ainsi au vu de ces caractéristiques, l'ISCT (International Society for Cellular Therapy) en 2019 a mis à jour la définition des CSMs pour que celle-ci soit complétée par l'origine tissulaire des cellules, ce qui met en évidence les propriétés spécifiques des CSMs aux tissus démontrés par des essais fonctionnels pour préciser le mode d'action thérapeutique comme l'immunomodulation des cellules immunitaires ou encore la stimulation de l'angiogenèse (Viswanathan *et al.*, 2019).

### 5.3.2. La capacité de « homing »

Le mécanisme de « homing » réside dans la capacité des CSMs à atteindre le tissu lésé en réponse à une combinaison de signaux moléculaires émis par le site lésionnel (Squillaro *et al.*, 2016). Cependant, le mécanisme par lequel les CSMs migrent vers le site lésionnel est encore mal connu. En 2003, chez le rat dans un modèle de traumatisme crânien, il avait été montré que les CSMs migraient au niveau des sites lésionnels dans le cerveau et restaient localisées à proximité de la région endommagée (Mahmood *et al.*, 2003). De même dans un modèle de sténose de la carotide chez le rat, la capacité des CSMs à migrer au site lésionnel et à rester localisées au niveau des carotides sténosées avait été observée (Forte *et al.*, 2008). Non seulement les CSMs migrent, mais elles s'intègrent au tissu. Chez l'enfant atteint de

maladie héréditaire dite « ostéogénèse imparfaite » rendant les os extrêmement fragiles par le manque de collagène de type 1, après la transplantation de moelle osseuse, la migration des CSMs au niveau des sites osseux, l'intégration au tissu osseux et la différenciation des CSMs en ostéoblastes fonctionnels capable de contribuer à la formation de collagène ont été observés (Horwitz *et al.*,2002).

Le « homing » des CSMs implique de nombreuses molécules de signalisation comme des métalloprotéinases, des chimiokines ou encore des molécules d'adhésion (Wang *et al.*,2013). Parmi ces molécules la principale est le « Stromal-derived Factor 1 » (SDF-1) qui est le ligand de CXCR4. L'axe CXCR4-SDF-1 associé aux MMPs (métalloprotéinases) serait impliqué dans le recrutement des CSMs au site lésionnel (Wynn *et al.*,2004), (Son *et al.*,2006). Chez la souris NOD/SCID après irradiation la neutralisation du CXCR4 présent sur les CSMs a entraîné une réduction de leur migration et leur intégration au niveau de la moelle osseuse (Shi *et al.*,2007). De même, l'HGF/c-Met a la capacité d'induire la migration des CSMs mais pas leur prolifération (Neuss *et al.*,2004). D'autres molécules ont été décrites comme intervenant dans la migration des CSMs comme le CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5 et CXCR6 (Sohni *et al.*,2013).

Afin d'atteindre le tissu lésé, les CSMs adhèrent aux cellules endothéliales et traversent cette barrière *via* le mécanisme de transmigration (Schmidt *et al.*,2006) impliquant les molécules d'adhésion VLA-4/VCAM-1 ainsi que la P-selectine (Rüster *et al.*,2006). De plus, les molécules aidant au « homing » des CSMs peuvent être surexprimées par les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-1- $\beta$  (Ren *et al.*,2010). Suggérant que l'inflammation pourrait avoir un impact sur la capacité des CSMs à s'intégrer et sur leur efficacité thérapeutique (Wei *et al.*,2013).

### 5.3.3. La capacité de différenciation

Les CSMs sont multipotentes et peuvent se différencier *in vitro* et *in vivo* en différents tissus mésenchymateux comme le cartilage, les muscles, le tissu adipeux, les tendons et la moelle osseuse (Squillaro *et al.*,2016) (Figure 25). Les CSMs peuvent se différencier en îlots de Langherans et produire de l'insuline (Chen *et al.*,2004) et en hépatocytes (Fatima *et al.*,2021) ou donner naissance aux kératinocytes et d'autres cellules de la peau favorisant la cicatrisation (Sasaki *et al.*,2008). Dans un modèle d'ischémie et de reperfusion de reins chez la souris les

CSMs se différencient en cellules appartenant à l'épithélium des tubulures rénaux contribuant au maintien de l'intégrité du tissu et de sa régénération (Li *et al.*,2010).

Cependant, la plupart des CSMs se retrouvent piégées au niveau de la micro-vascularisation du poumon (Lee *et al.*,2009), (Squillaro *et al.*,2016), suggérant que l'injection localement de CSMs serait une méthode d'administration avantageuse pour leur potentiel de différenciation (Sohni *et al.*,2013).

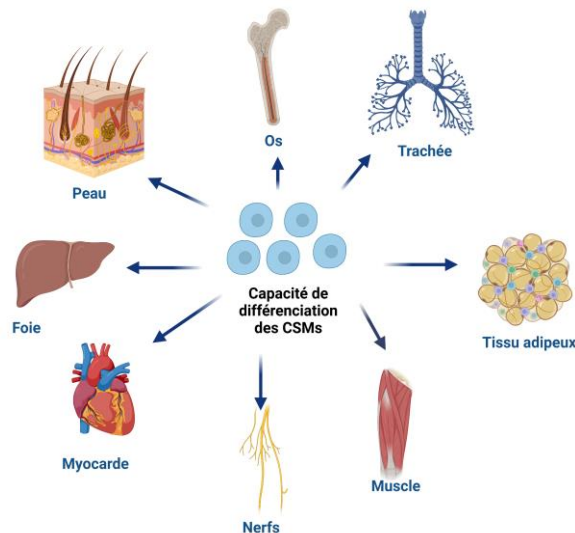
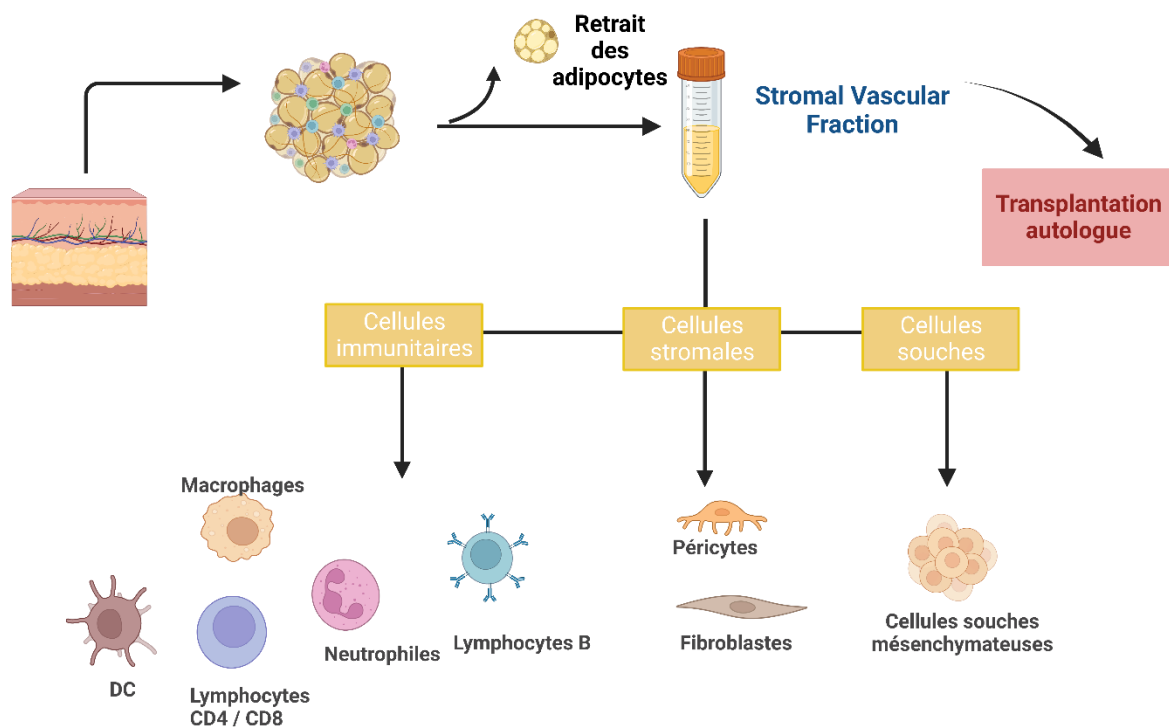


Figure 25 : Schéma illustrant les capacités de différenciation des CSMs sur différents organes et tissus. Créé avec Biorender.Com

#### 5.4. La « stromale Vascular Fraction »

La SVF est une population cellulaire hétérogène extraite du tissu adipeux. Depuis plusieurs années, elle est classée comme un médicament de thérapie innovante (MTI) et évaluée dans de multiples essais cliniques pour sa capacité de régénération. La SVF est composée de fibroblastes, de cellules souches mésenchymateuses, de cellules endothéliales, des progéniteurs cellulaires ainsi que des cellules immunitaires et des globules rouges (Ramakrishnan *et al.*,2018) (Figure 26).



**Figure 26** : Schéma illustrant la composition cellulaire de la SVF. Créé avec Biorender.com basé sur l'article : Al-kharboosh, R., Perera, J. J., Bechtler, A., Bu, G., & Quinones-Hinojosa, A. (2022). Emerging point-of-care autologous cellular therapy using adipose-derived stromal vascular fraction for neurodegenerative diseases. *Clinical and Translational Medicine*, 12(12), e1093.

Les CSMs présentes dans la SVF ont été appelées cellules souches/stromales dérivées du tissu adipeux (ASC), cellules souches adultes dérivées du tissu adipeux, cellules stromales adultes dérivées du tissu adipeux, cellules stromales dérivées du tissu adipeux, ASC ou cellules souches mésenchymateuses adipeuses, ce qui a prêté à confusion. La Fédération internationale pour la thérapeutique et la science du tissu adipeux (IFATS) est parvenue à un consensus et a adopté le terme "cellules souches dérivées du tissu adipeux" (ASCs) pour identifier la population de cellules isolées, adhérentes au plastique, multipotentes et de type CSM. De plus, dans une déclaration commune avec la Société internationale de thérapie cellulaire (ISCT), l'IFATS a également établi des critères et des lignes directrices minimales pour l'identification des ASC dérivées de la SVF. Les ASCs peuvent être identifiées phénotypiquement comme  $CD45^-CD235a^-CD31^-CD34^+$ . Les ASCs cultivées peuvent être identifiées, de la même manière que les CSMs, comme des cellules adhérentes au plastique  $CD13^+CD73^+CD90^+CD105^+CD31^-CD45^-CD235a^-$ , avec un potentiel de différenciation sur trois lignées. Sur le plan phénotypique, cependant, les ASCs diffèrent des CSMs dérivées de la moelle osseuse par leur positivité pour le CD36 et leur négativité pour le CD106. Il est intéressant de noter que l'expression du CD34 est présente dans la majorité des cellules de la

SVF (jusqu'à 80 %), et que deux jours après culture, plus de 95 % des ASCs adhérentes expriment le CD34.

Cependant, la proportion exacte des cellules composant la SVF reste encore à déterminer, en effet, il y a un manque de consensus entre les préparations (Ramakrishnan *et al.*,2018). Chez l'homme, cette composition varie en fonction du site de prélèvement du tissu adipeux, des moyens de prélèvements (type de canules), de la technique de digestion (mécanique et/ou enzymatique), du tissu et du donneur (Cousin *et al.*,2006). Chez l'homme, 2h après la récupération du tissu adipeux et la digestion enzymatique à la collagénase, la SVF est constituée de 66 % de cellules souches, 5,8 % de progéniteurs cellulaires, 17,8 % de monocytes, 4,2 % de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, le reste des cellules CD45<sup>+</sup> représente 8,8 %. Cette étude a permis d'établir que contrairement aux cellules souches mésenchymateuses, le stockage de la SVF affecte la viabilité des cellules CD45<sup>+</sup> modifiant leur proportion cellulaire (Svalgaard *et al.*,2020). Une étude chez l'homme a montré que la SVF était composée de 23 % de monocytes/macrophages et 13 % de cellules CD45<sup>+</sup> le reste étant constitué de cellules CD45<sup>-</sup> (CSMs et progéniteurs cellulaires) (Tiryaki *et al.*,2020). Cependant, il a été mis en évidence chez l'homme et la souris que la composition en macrophages pouvait varier en fonction de la masse graisseuse. En effet, il a été montré que les adipocytes étaient responsables du recrutement de macrophages circulants, en sécrétant du « monocyte chemotactic protein » (MCP-1), du « macrophage migration inhibition factor » (MIF-1) et du « macrophage stimulating factor » (M-CSF) qui permettent de stimuler la différenciation des monocytes en macrophages matures (Schäffler and Scholmerich,2010), (Ouchi *et al.*,2011). Ainsi en 2021, afin de contribuer à une meilleure harmonisation et normalisation des pratiques dans le domaine de la thérapie utilisant la SVF, une analyse rétrospective a été effectuée sur 364 lots de SVF de qualité « grade clinique » par deux établissements de thérapie cellulaire autorisés au niveau national : la Fondation suisse pour les cellules souches (FSCS) et le service de thérapie cellulaire de l'hôpital universitaire de Marseille (AP-HM) en France (François *et al.*, 2021). Les résultats montrent des variations dans la proportion de cellules endothéliales (de 32 % à 6 %). Aucune différence n'a été observée dans la distribution des cellules souches (35 %). Enfin, les leucocytes varient entre 30 % et 45 % et les péricytes entre 4 % et 12 %. De cette étude, quatre paramètres essentiels ont été identifiés pour établir les critères d'acceptation à savoir la viabilité ( $\geq 80\%$ ), la quantité de cellules obtenues ( $\geq 1,50 \times 10^5$

cellules viables/ml de liposuction) et la composition cellulaire de la SVF avec la proposition pour les cellules souches  $\geq 20\%$  et les leucocytes  $\leq 50\%$  (François *et al.*,2021).

Chez la souris, une variabilité a été également observée, mais les proportions semblent être identiques à l'homme avec 22 % de cellules myéloïdes et parmi les cellules CD11b<sup>+</sup> 80 % sont des macrophages (Morris *et al.*,2015). Ainsi, ces études soulignent le caractère hétérogène de la SVF et la nécessité d'avoir un ensemble de marqueur défini pour la caractériser et pouvoir comparer les études entre elles (Ramakrishnan *et al.*,2018).

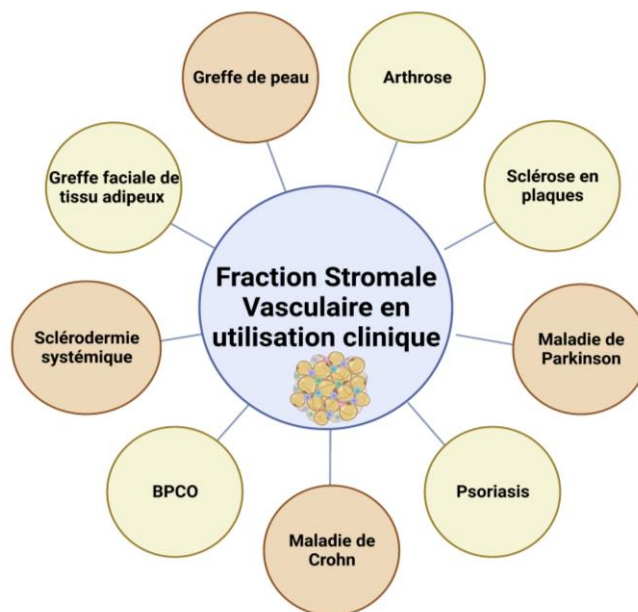
### 5.5. Les effets thérapeutiques de la SVF

Les premières études ont montré que la SVF avait une efficacité thérapeutique notamment dans la néovascularisation. Chez la souris, *in vivo* la SVF stimule la formation d'un réseau vasculaire (Koh *et al.*,2011) et de manière intéressante lorsque les cellules endothéliales de la SVF sont déplétées, la capacité de la SVF à former ce réseau vasculaire est diminuée (Koh *et al.*,2011). La SVF a montré avoir des capacités d'immunomodulation, en effet dans un modèle de sclérose multiple chez la souris, une injection de SVF induit une diminution des lymphocytes Th1 et Th17 dans la rate associée à une augmentation du taux de cytokines anti-inflammatoires de type IL-10 (Bowles *et al.*,2017). Dans cette étude, les résultats obtenus avec la SVF ont montré une efficacité supérieure aux résultats avec les CSMs issues du tissu adipeux. Outre l'immunomodulation, la SVF stimule la régénération, comme il a été montré dans un modèle de souris diabétiques où la SVF stimule la cicatrisation des blessures dites « blessures réfractaires » grâce à l'induction de l'angiogenèse (Bi *et al.*,2019). Dans un modèle de fibrose du foie chez la souris, après l'injection de SVF en intraveineux, une augmentation de la sécrétion d'HGF ainsi que d'IL-10 et du VEGF-A et une diminution du taux d'IL-6 et d'IL-1 $\beta$  ont été observées par rapport aux souris traitées aux CSMs issues du tissu adipeux ; la SVF a stimulé la régénération du foie et de manière intéressante les cellules de la SVF se sont intégrées au tissu (Choi *et al.*,2019).

Dans le versant clinique actuellement de nombreux essais cliniques utilisant la SVF sont en cours aussi bien pour l'alopecie, l'osteoarthrite, le diabète de type 2, la maladie pulmonaire obstructive chronique et la sclérodermie.



Un essai clinique est en cours pour son efficacité thérapeutique notamment dans la maladie de Crohn de type fistulisant. Des micro-injections de SVF aux alentours des fistules ont induit une cicatrisation totale des fistules sans effet secondaire (Philandrianos *et al.*,2018), (Serrero *et al.*,2019). Le suivi a révélé que 60 % des patients étaient en rémission après 1 an et 3 ans après l'injection 70 % des patients étaient toujours en rémission ; aucun effet secondaire n'a été déclaré, ainsi les effets de la SVF ont été conservés dans le temps (Guillo *et al.*,2022). Une autre étude a montré dans le cadre du psoriasis, chez un patient réfractaire aux traitements conventionnels, que l'injection intraveineuse de SVF a induit une diminution des symptômes et une amélioration de la qualité de vie dès 1 mois post-injection avec une diminution nette des plaques sur le corps (le score de sévérité de 50,4 avant l'injection et de 0,3 après injection à 1 mois) et cet effet a perduré jusqu'à 12 mois post-injection ; aucun effet secondaire n'a été répertorié (Comella *et al.*,2018) (Figure 27).



**Figure 27** : Schéma illustrant des exemples d'applications de la SVF en clinique. Créé avec Biorender.com basé sur l'article : Dykstra, J. A., Facile, T., Patrick, R. J., Francis, K. R., Milanovich, S., Weimer, J. M., & Kota, D. J. (2017). Concise review: fat and furious: harnessing the full potential of adipose-derived stromal vascular fraction. *Stem cells translational medicine*, 6(4), 1096-1108.

**L'utilisation de la SVF dans le modèle de syndrome gastro-intestinal radio-induit est pertinente.** La mortalité du SGI est située entre 7 et 10 jours, ainsi l'utilisation des CSMs comme contre-mesure médicale ne peut pas être appliquée du fait de l'expansion préalable des CSMs en laboratoire avant l'injection. La SVF présente le grand avantage d'être récupérée

rapidement, le temps total de préparation étant estimé à 45 minutes (Comella *et al.*,2018) permettant de s'affranchir de la mise en culture. La SVF montre des effets prometteurs sur la régénération, l'immunomodulation ou encore la néovascularisation dans diverses pathologies et semble être un bon candidat pour l'utilisation dans le SGI. De plus dans des pathologies du tractus gastro-intestinal, l'utilisation de CSMs a montré son efficacité (Cao *et al.*,2020) laissant présager que la SVF pourrait avoir la même capacité thérapeutique.

# Problématique & Objectifs

---

L'exposition aux rayonnements ionisants suite à un accident d'irradiation ou un acte de malveillance peut concerner à la fois des personnes militaires et civiles. Cette exposition peut engendrer des conséquences graves sur la santé des personnes exposées et impacter potentiellement un grand nombre de victimes. L'irradiation d'un large volume à des doses d'irradiation moyennes à fortes induit des lésions tissulaires multiples. La rapidité d'apparition des symptômes dépend de la vitesse de renouvellement des cellules constituant les tissus lésés mais aussi de la radiosensibilité des cellules souches et progénitrices. Chez l'homme, les doses supérieures à environ 6 Gy sur un large volume induisent principalement une destruction de la moelle osseuse (syndrome hématopoïétique) et des lésions gastro-intestinales, entraînant diarrhée, déshydratation, septicémie, hémorragie intestinale avec une mortalité dans les 10 à 15 jours suivant l'exposition. Ces symptômes gastro-intestinaux sont collectivement connus sous le nom de syndrome gastro-intestinal radio-induit (SGI). La rapidité d'intervention pour traiter les personnes irradiées est primordiale, il existe à la fois un besoin crucial de contre-mesure médicale efficace et rapide. En dépit des effets prometteurs des cellules souches mésenchymateuses dans plusieurs modèles, dans le cadre du SGI les CSMs ne peuvent pas être utilisées. En effet, le temps de culture nécessaire à leur amplification est de plusieurs semaines. Le tissu adipeux issu de liposuction est une source riche en progéniteurs cellulaires, de cellules myéloïdes, de cellules stromales facile d'accès et rapide à obtenir. A partir de ce tissu adipeux, la fraction stromale vasculaire (SVF) est isolée par dissociation enzymatique, pouvant être préparée en extemporané dans un bloc opératoire dans le cadre de la prise en charge de victimes de SGI. Cette rapidité d'obtention et cette facilité à isoler la SVF, en fait un outil thérapeutique pertinent pour le traitement du SGI.

L'objectif de ce travail de thèse, est d'évaluer les effets de la SVF dans un modèle murin de syndrome gastro-intestinal radio induit. Le modèle préclinique le plus utilisée est celui de l'irradiation corporelle totale pour des doses >10 Gy. Cependant, afin de s'affranchir du syndrome hématopoïétique, l'irradiation sera réalisée sur un modèle d'irradiation abdominale, conservant ainsi une partie de la moelle osseuse. Ce type de modèle se rapproche plus des accidents d'irradiation recensés, l'exposition étant hétérogène sur l'ensemble du corps cela permet de conserver une partie de moelle osseuse. Une caractérisation du modèle

d'irradiation abdominale sera réalisée par une gamme de doses, les effets liés à l'irradiation à fortes doses pourront être également établis. Ensuite, le premier axe de cette thèse sera d'évaluer les effets d'atténuation du SGI par la SVF dans notre modèle et d'identifier les compartiments cibles de la SVF *In Vivo*. Le deuxième axe portera sur l'influence des monocytes/macrophages dans l'efficacité thérapeutique *In Vivo* de la SVF, ainsi que le phénotypage des monocytes impliqués dans la réponse immunitaire. D'autres cellules immunitaires seront étudiées, comme les neutrophiles, les cellules dendritiques et les lymphocytes. Le troisième axe s'intéressera à la stimulation du compartiment cellules souches par la SVF de manière plus précise *In Vitro* grâce à un modèle d'organoïdes issu de cryptes d'intestins irradiés. Et *In Vivo*, en évaluant l'effet du traitement sur la régénération épithéliale.

## Résultats

---

## Axe 1 : La SVF atténue le syndrome gastro-intestinal radio-induit

Cet article a été publié le 29 mai 2021 dans la revue scientifique Stem Cell Research and Therapy.

Article 1: The stromal Vascular Fraction mitigates radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice

### **Objectifs :**

L'objectif de cette étude était de développer une stratégie thérapeutique innovante afin de traiter le SGI dans le cadre d'une irradiation accidentelle. Cette première étude s'est intéressée aux effets de la Stromal Vascular Fraction (SVF) dans un modèle d'irradiation forte dose en zone abdominale chez la souris. Le premier objectif était la caractérisation du modèle préclinique du syndrome gastro-intestinal radio-induit avec la détermination de la dose la plus pertinente à délivrer pour obtenir un SGI basé à la fois sur des paramètres cliniques et sur la viabilité. Le deuxième objectif était de caractériser le produit de thérapie cellulaire à la fois sur la quantité et le phénotype des cellules obtenues dans la préparation et d'évaluer l'effet de la SVF sur le SGI. Une étude mécanistique de l'efficacité *in Vivo* de la SVF a été menée afin d'identifier les compartiments cibles intestinaux de l'efficacité de la SVF.

### **Résultats :**

Un SGI est caractérisé par une forte et rapide perte de poids et la mort entre 7 et 10 jours. L'irradiation en zone abdominale chez des souris à 16, 18, 20 et 22 Gy est létale chez 0, 70, 75 et 100% des souris en 14 jours. La dose qui induit un SGI a été établie sur la base du nombre de cryptes régénératrices formant des microcolonies à 3,5 jours après l'irradiation. Il s'agit d'un marqueur de l'intégrité intestinale objectivé par la présence de 10% de cryptes par section intestinale avec au moins 8-10 cellules par cryptes et qui est corrélé avec la survie. Ainsi sur la base des résultats obtenus sur la survie et de l'analyse histologique, la dose de 18 Gy était la dose sublétales induisant un SGI.

La SVF a été isolée par dissociation mécanique et enzymatique à partir du tissu adipeux prélevé en zone inguinale chez la souris. La caractérisation cellulaire de la SVF montre la présence de cellules souches mésenchymateuses, de cellules hématopoïétiques, de cellules endothéliales et de progéniteurs. Plusieurs concentrations de cellules ont été testées sur la

survie et le traitement par la SVF à  $2,5 \times 10^6$  cellules s'est révélé limiter la perte de poids et la mortalité avec 80% de survie des souris traitées contre 35% des souris irradiées et non traitées.

Au niveau intestinal, il a été mis en évidence une diminution significative du pourcentage de cellules en apoptose chez les souris traitées à la SVF 7 jours post-irradiation. Cette diminution de l'apoptose était associée à un maintien de l'intégrité de la barrière intestinale après le traitement. L'analyse immunohistologique montre une augmentation des zones de régénération épithéliale et de prolifération du compartiment cellule souche de la crypte induite par la SVF. La restauration du compartiment épithélial est associée à un effet anti-inflammatoire. Le traitement par la SVF induit une diminution du taux d'expression des cytokines pro inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-6. La SVF limite le processus inflammatoire en modifiant (la rate est la source des principaux sous-types de monocytes générateurs de macrophages) le phénotype des monocytes en monocytes exprimant le Cx3Cr1 et des macrophages en macrophages de type M2.

### **Conclusion :**

La SVF permet d'atténuer les effets liés à l'irradiation à forte dose sur un large volume chez la souris. Cet effet thérapeutique induirait une immunomodulation des cellules immunitaires et une stimulation du compartiment cellule souche permettant une augmentation de la survie.

## **The Stromal Vascular Fraction mitigates radiation-induced gastro-intestinal syndrome in mice**

Lydia Bensemmane<sup>1</sup>, Claire Squiban<sup>1</sup>, Christelle Demarquay<sup>1</sup>, Noëlle Mathieu<sup>1</sup>, Marc Benderitter<sup>1</sup>, Bernard Le Guen<sup>2</sup>, Fabien Milliat<sup>1</sup>, Christine Linard<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Radiological Protection and Nuclear Safety, Laboratory of Medical Radiobiology, Fontenay-aux-Roses, France

<sup>2</sup>Electricité de France, Cap Ampère, Saint-Denis, France

Running title: SVF limits gastro-intestinal radiation syndrome

Corresponding author: Christine Linard

Institute of Radiological Protection and Nuclear Safety, Laboratory of Medical Radiobiology, Fontenay-aux-Roses, France

Telephone: +33 1 58 35 91 86 Fax: +33 1 58 35 84 67

e-mail: [christine.linard@irsn.fr](mailto:christine.linard@irsn.fr)



## Abstract

**Background:** The intestine is particularly sensitive to moderate-high radiation dose and the development of gastrointestinal syndrome (GIS) leads to the rapid loss of intestinal mucosal integrity, resulting in bacterial infiltration, sepsis that comprise patient survival. There is an urgent need for effective and rapid therapeutic countermeasures. The stromal vascular fraction (SVF) derived from adipose tissue is an easily accessible source of cells with angiogenic, anti-inflammatory and regenerative properties. We studied the therapeutic impact of SVF and its action on the intestinal stem cell compartment.

**Methods:** Mice exposed to the abdominal radiation (18 Gy) received a single intravenous injection of stromal vascular fraction (SVF) ( $2.5 \times 10^6$  cells), obtained by enzymatic digestion of inguinal fat tissue, on the day of irradiation. Mortality was evaluated as well as intestinal regeneration by histological analyses and absorption function.

**Results:** The SVF treatment limited the weight loss of the mice and inhibited the intestinal permeability and mortality after abdominal irradiation. Histological analyses showed that SVF treatment stimulated the regeneration of the epithelium by promoting numerous enlarged hyperproliferative zones. SVF restored CD24<sup>+</sup>/lysozyme<sup>-</sup> and Paneth cell populations in the ISC compartment with the presence of Paneth Ki67<sup>+</sup> cells. SVF has an anti-inflammatory effect by repressing pro-inflammatory cytokines, increasing M2 macrophages in the ileum and anti-inflammatory monocyte subtypes CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>low</sup>CX3CR1<sup>high</sup> in the spleen.

**Conclusions:** Through the pleiotropic effects that contribute to limiting radiation-induced lethality, SVF opens up attractive prospects for the treatment of emergency GIS.

**Key words:** Stromal Vascular Fraction, intestine, irradiation, regeneration

## Background

Accidental or intentional exposure to high doses of ionizing radiation can have serious health consequences for the exposed persons and can potentially affect many people at the same time. Irradiation of large volumes at medium to high radiation doses has serious effects on normal, fast-renewing tissues and all these effects are grouped together under the acute radiation syndrome (ARS). The speed at which the first symptoms appear depends on the rate of renewal of the cells making up the damaged tissue, but also on the radiosensitivity of the stem cells. The gastrointestinal (GI) tract is particularly sensitive to irradiation and lethality resulting from GI tract failure, which is the primary endpoint of ARS. A dose greater than 10 Gy in TBI (Total Body Irradiation) leads to diarrhea, dehydration, sepsis and intestinal haemorrhage with mortality within 7-10 days after exposure.

Normal homeostasis of the intestinal epithelium is maintained by a complex cell replacement process. This renewal is initiated by intestinal stem cells (ISCs), notably the Lgr5<sup>+</sup> cells located at the base of the crypts (1). These stem cells divide, migrate and become Lgr5 progenitors or transit-amplifying progenitor (TA) cells committed to differentiation. Differentiated TA cells generate villi composed of intestinal epithelial cells (IECs). Lgr5<sup>+</sup> cells are flanked on both sides by secretory Paneth cells. In addition to their antimicrobial role, these cells have played an essential niche role in supporting Lgr5<sup>+</sup> cells, both through cell-cell contact and by secreting the factors necessary to maintain the gut stem cell niche (2).

Radiation-induced gastrointestinal syndrome (GIS) is due in part to the destruction of intestinal stem cells (ISCs) in the crypt (3), which are radiosensitive. The crypt becomes “non-viable” and dies out within 48 hours. However, one or more surviving ISCs can rapidly proliferate to regenerate the crypt within 72-96 hours. Therefore, the repopulation of clonogenic proliferating progenitor cells by the ISCs plays a key role in the fate of the crypt. A damaged intestinal epithelium promotes the influx of bacteria into the bloodstream leading to sepsis and death (4). Considering the logistical barrier and urgency delay within the first 24 hours after exposure for treatment of the victim, in large casualty settings there is a concrete need for therapeutic measures that can be effective even if started days after the accidental radiation exposure. Currently, there are very few drugs known to mitigate the effects of radiation. In part of an artificial analogue of flagellin, which has improved gut stem cell survival

after whole body irradiation in mice (5) and in a non-human primate (6), it may have mitigating pharmacological treatment potential, but there is no medical countermeasure for gastrointestinal treatment in humans. Studies have shown that cell therapies restore the niche of intestinal stem cells after irradiation (7), and that MSC (Mesenchymal Stem Cell) administration can improve survival, restore intestinal structure and function, and increase epithelial cell proliferation (8-11). However, the culture time required to amplify enough cells remains an obstacle to their use in emergency treatment of gastrointestinal syndrome (GIS).

It has been recently demonstrated that adipose tissue can be an important source of cell progenitors, easily accessible and extremely rapid. Adipose tissue-derived stem cells (ASC) share many properties with bone marrow mesenchymal stem cells. They have the potential to differentiate into multiple cell lineages, and have angiogenic, anti-apoptotic, immunomodulatory and regenerative properties (12). ASCs have self-renewal properties and are localised in the stromal vascular fraction (SVF) obtained from enzymatically digested adipose tissue. SVF constitutes a vascular niche with an important source of endothelial progenitors, endothelial cells, and pericytes, thus contributing to vessel remodeling and growth (13). In addition, SVF contains various immune cells, including monocytes and macrophages that perform anti-inflammatory functions (14). The mechanisms through which SVF regenerates tissue remain inconclusive, but the literature suggests a contribution by paracrine effects, with crosstalk between SVF components and the host leading to repair and healing (12). Currently, the therapeutic use of SVF is expanding in some clinical trials of multiple pathologies (12), particularly for refractory Crohn's fistula (15).

In this study, we evaluated the therapeutic efficacy of SVF in a GIS model and examined the impact of SVF on the niche compartment of intestinal stem cells and the impact on the inflammatory process.

## **Methods**

### **Mice**

Male C57BL/6JRj mice were purchased from Janvier (Le Genest Saint Isle, France) and the animals were housed in the IRSN animal facilities, which are accredited by the French Ministry

of Agriculture for performing experiments on rodents. The animal experiments were performed in compliance with French and European regulations on the protection of animals used for scientific purposes (EC Directive 2010/63/EU and French Decree 2013–118). All experiments were approved by the Ethics Committee #81 and authorised by the French Ministry of Research (under the reference APAFIS#10434-2017062814437026-v1). In this study, experimental protocol was in line with standard support treatment recommended for patient presenting an acute radiation syndrome (16). Thus, the antibiotic Avemix (8g/L) will be associated with all treatments and during the experimentation.

### **Irradiation procedure**

Eight-week-old C57BL/6JRj mice were irradiated under anesthesia (with a continuous flow 1.5% isoflurane in oxygen) on a medical linear accelerator (Elekta synergy®) delivering 4MVp X-rays (mean photon energy about 1.3 MeV). Reference dosimetry measurements were performed using a 0.125 cc cylindrical ionisation chamber calibrated in dose to water in a mouse equivalent tissue phantom placed on a plexiglass support. A dose rate about 2.5 Gy/min in dose to water was used. A localised 2 cm larger abdominal irradiation window containing intestine was chosen to limit upper thorax, head and neck, lower and upper extremity exposure. The mice were exposed to 16, 18, 20, and 22 Gy. The dose of 18 Gy was further selected as the sublethal optimal irradiation dose for SVF related effects. The uncertainty of the dose rate measurement was about 5% at  $k=2$ .

### **Isolation of SVF**

Stromal vascular fraction (SVF) cells were isolated from inguinal fat pad adipose tissue samples of 12-week-old C57BL/6JRj mice donors. From the modified methods (17) the fat pads were excised, finely cut and incubated in a digestion medium containing 0.1% type I collagenase (Sigma-Aldrich, France), 1% penicillin-streptomycin in MEM- $\alpha$  milieu by gentle shaking for 20 min at 37°C. The samples were briefly mechanically disrupted using the gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec) and then digested again in MEM- $\alpha$  0.1% type I collagenase medium followed by mechanical disruption using the gentleMACS Dissociator. To remove mature adipocytes and undigested tissue, the cell suspension was filtered sequentially through 100 and 70  $\mu\text{m}$  cell strainers and centrifuged (400g, 10 min) to spin down stromal-

vascular fraction cell pellets. The pellets were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) for i.v. injection.

## **Histology**

*Microcolony stem cell assay:* Freshly isolated ileal tissue was excised, flushed with cold phosphate-buffered saline and fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. At day 3.5 ileal sections were stained using Hematoxylin, Eosin and Safran (HES). The sublethal dose was determined by the number of regenerating crypts along the ileum with the presence of 10% of the crypts by unit of length of intestine containing at least 8-10 cells at day 3.5 after irradiation (18).

*Immunohistochemical analysis:* Sections 5 µm in thickness were de-paraffinised and re-hydrated. A pretreatment method using heat-induced epitope retrieval was used and the nonspecific binding was blocked with a protein blocker (DakoCytomation, Trappe, France) for 30 min at room temperature (RT). The sections were then incubated with the following primary antibodies against: Ki67 (ab15580; Abcam), EpCam (clone G8.8; Biolegend), α-SMA (ab21027; Abcam), CD34 (RAM34, eBioscience), GP38 (MA615113; Thermo Fisher), CD24 (ab64064; Abcam), Lysozyme (ab108508; Abcam), Muc2 (Thermo Fisher) and ZO-1 (Invitrogen) antibodies.

The co-labelling with antibodies from the same species was performed using Opal™ Multiplex IHC kits (Akoya). After incubation with the primary antibodies, the slides were washed in PBS-T three times and probed with appropriated fluorescence-conjugated secondary antibodies for one hour at room temperature. After three washings in PBS, the cell nuclei were counterstained by Vectashield mounting medium with DAPI (Vector).

*TUNEL Assay:* A TUNEL assay was performed using an In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics, France) following the manufacturer's instructions. Intestinal tissue sections were incubated with a reaction mixture of terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) and fluorescein (FITC)-labeled precursor in cacodylate-based buffer for 1 h at 37 °C, then rinsed three times with 0.05% Tween-20 in PBS, and mounted under Vectashield mounting medium with DAPI (Vector). The apoptotic rate in the crypts and villis cells was quantified by counting the number of apoptotic cells per unit area of section.

### **Intestinal permeability *in vivo***

*In vivo* intestinal permeability measurement was assessed at seven days following irradiation, using 4000 Da FITC-dextran (Sigma-Aldrich, France). In short, FITC-dextran (0.60 mg/g body weight) was administered by gavage and 4 hours after the mice were euthanised and plasma obtained by cardiac puncture. Standard curves were obtained by diluting the FITC-dextran in the PBS-diluted plasma to determine the serum levels of FITC-dextran in the different treatment groups. The FITC concentration in the plasma was then measured with a microplate Luminometer (Mithras LB940, Berthold) at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 520 nm.

### **Splenic cell isolation**

To isolate the splenic cells, the spleen was smashed with a syringe plunger and the cells were collected in PBS buffer followed by passage through 40 µm cell strainers and centrifuged (400xg, 10 min). The red blood cells were lysed with ACK lysis buffer (Thermo Fisher Scientific, France).

### **Flow cytometric analysis**

Flow cytometry was performed using the BD FACSCanto II and analysed with FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR). Dead cells were excluded through Fixable Viability Dye eFluor staining (eBioscience). Non-specific antibody binding was blocked with an anti-CD16/32 (Mouse Fcγ block clone 2.4G2). The cells were incubated for 30 min in 100 µl PBS with conjugated antibodies (BD Biosciences, France): anti CD45 (V500 conjugated; clone 30-F11); CD11b (BV421 conjugated; clone M1/70); anti CD3 (FITC conjugated; clone 145-2C11); anti CD45R/B220 (PE-Cy7 conjugated; clone RA3-6B2); anti Ly6C (FITC conjugated; clone AL-21); anti CD31 (PE conjugated; clone MEC13.3); anti CD34 (Alexa Fluor 647 conjugated; clone RAM34); anti CD146 (FITC conjugated; clone ME-9F1); anti CD29 (PE conjugated; clone HM B1.1); anti Sca-1 (PE-Cy7 conjugated; clone D7); anti CD44 (PE-Cy5.5 conjugated; clone IM7); anti CD105 (Alexa Fluor 647 conjugated; clone MJ7/18); anti SSEA (BV421 conjugated; clone MC631); anti CX3CR1 from Biolegend (France) (PE-Cy7 conjugated; clone SA011F11); anti CCR2 (Alexa Fluor 647 conjugated; clone SA203G11); CD90 from southern Biotech (FITC conjugated; clone SA203G11). Isotype-matched antibodies (BD Biosciences) were used for

control staining. All antibodies were used at 1:100 dilution. The concentration of cell suspensions was adjusted to  $1 \times 10^6$  cells per 100  $\mu$ l.

### **Spreading Assay and immunostaining**

Spleen Mononuclear cells MNCs isolated from all the experimental groups were resuspended in RPMI 1640 medium containing 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin and seeded on round 12 mm diameter coverslips in a 24-well plate coated with 5  $\mu$ g/ml recombinant mouse VCAM-1 (R&D Systems) for 2 hours at 37°C. After two washes with PBS, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 minutes at +4°C. The cells were rinsed three times with PBS and then incubated in PBS/0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) for 10 minutes. After three rinses with PBS and incubation with 2% BSA to block nonspecific staining, the cells were stained with 0.165  $\mu$ M Alexa Fluor 546 Phalloidin (Thermo Fisher Scientific, France) for 60 min at 37°C. The primary antibody anti-CX3CR1 (Abcam) was used for immunostaining. After the incubation slides were washed with PBS-T and probed with fluorescence-conjugated secondary antibodies for one hour at RT. The cell nuclei were counterstained by Vectashield mounting medium with DAPI (Vector). Cells with flat morphology or lamellipodia were positively scored for spreading.

### **Monocyte/macrophage polarisation**

The spleen cells were washed three times and cultured in a 12-well tissue culture in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS and antibiotics (Penicillin/Streptomycin, Invitrogen) and 100 ng/mL of M-CSF (R&D Systems, France) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> for 7 days to induce full macrophage differentiation and maturation. Macrophage polarisation was obtained by removing the culture medium and culturing cells for an additional 24 h in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS and antibiotics and 100 ng/mL LPS (derived from *E. coli* 0111: B4, Invivogen) plus 20 ng/mL IFN- $\gamma$  (for M1 polarisation, M(LPS-IFN- $\gamma$ )) or 20 ng/mL IL-4 (for M2 polarisation, M(IL-4)) (R&D Systems). The cells were harvested for RT-qPCR analysis.

## **Real-time PCR analysis**

Total RNA was extracted from the ileum and spleen cells with the RNeasy Mini kit (Qiagen), and cDNA was prepared with the SuperScript RT Reagent Kit (Applied Biosystems). Real-time PCR was performed on an ABI Prism 7900 Sequence Detection System. All Taqman primers and probes came from Life Technologies (France) (Supplemental table). The data were analysed using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method, with normalisation to the Ct of the GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) housekeeping gene.

## **Statistics**

The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. We used one-way or two-way analyses of variance (ANOVA) and then a Bonferroni post-test to determine the significance of the differences. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

## **Results**

### **Characteristics of radiation-induced GIS after abdominal irradiation**

In order to limit bone marrow exposure, abdominal irradiation was performed (19). The current standard endpoint for the study of acute GIS is animal lethality within 10 days of radiation exposure (LD50/10) (LD: lethal dose for 50% at 10 days). In this way, to define the sublethal dose, we administered an increasing dose up to 16 to 22 Gy to obtain a GIS characterised by a strong and rapid weight loss and death between 7 and 10 days. Exposure to 16, 18, 20 and 22 Gy was lethal in 0, 70, 75 and 100% of the mice within 14 days with a DL0/10, DL65/10, DL75/10 and DL100/10, respectively (Fig.1a). Lethality was strongly correlated with weight loss, with about a 30% loss observed 7 days after irradiation in groups of animals irradiated at 18 and 20 Gy (Fig.1b). The dose that induces a GIS was established on the basis of the number of regenerating crypts forming microcolonies 3.5 days after irradiation. It is a marker of intestinal integrity objectified by the presence of 10% of crypts per intestinal section with at least 8-10 cells per crypts and is correlated with survival. This time corresponds to the maximum expected difference between restoration and loss of crypts/villi. At day 3.5, histological analysis (HES) showed a change in tissue architecture observed from the 18 Gy dose with drastic reductions in villi length, hypoplasia of crypts, and destruction of epithelial architecture (Fig.1c). The analysis of the density of regenerating



intestinal crypts was 66, 17, 8 and 1% at doses of 16, 18, 20, 22 Gy, respectively, compared with non-irradiated mice (Fig.1d). In parallel, representative images of TUNEL-positive cells characterising the irreversible cell death showed an increase in the frequency of TUNEL positive cells in the mucosa with an escalating dose from 16 to 22 Gy compared with non-irradiated mice (Fig.1e). Taken together, from the results of survival experiments and the histological analysis, a dose of 18 Gy was the sublethal dose inducing a GIS.

SVF improves survival following a sublethal dose of irradiation and mitigates GIS

SVF was prepared from animal donors and characterised by flow cytometry. The gating strategy and subpopulation determination are shown in supplemental figure (S1). The viability of cells was >95%. Expression of mesenchymal, vascular, pericytic and haematopoietic markers as well their combinations showed that the percentage of mesenchymal marker was >60% for CD90, CD44, CD29; >50% for Sca-1; >10% for CD105 and 0.3% for SSEA3. The SVF also contained haematopoietic cells with >60% CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>, 2% CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> and >20% CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> B220<sup>+</sup>. Interestingly, SVF also contained a small amount (<1%) of endothelial mature cell (CD31<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>CD146<sup>+</sup>) and endothelial progenitor (CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup>).

Weight loss monitoring was first used to establish the concentration of SVF cells to be injected. At a concentration of  $0.5 \times 10^6$ , SVF cells had no effect on weight loss on day 7 (about 25%) compared with the irradiated group. Seven days after irradiation, a loss of only 10% was observed in the groups of animals injected with 1 and  $2.5 \times 10^6$  (Fig.2a). The SVF concentration of  $2.5 \times 10^6$  cells will be injected in future experiments. Treatment with SVF of  $2.5 \times 10^6$  cells limits weight loss and allows them to regain weight faster than the irradiated mice (Fig.2b). In terms of mortality, while 65% of the untreated-irradiated mice died within 10 days, the SVF treatment saved 80% of mice from lethality (Fig.2c).

High irradiation doses induce apoptosis of the crypt epithelial cells, resulting in a decrease in regenerating crypt colonies at 3.5 days and ultimately villi denudation by day 7 post-irradiation. The number of regenerative crypts microcolonies 3.5 days after irradiation was significantly increased in mice treated with SVF ( $44.5 \pm 5.3/\mu\text{m}$ ;  $p < 0.001$ ) compared with the irradiated mice ( $17.5 \pm 2.2/\mu\text{m}$ ) (Fig.2d), indicating an intestinal regenerative response. Moreover, mice treated with SVF had a significant decrease in the number of TUNEL<sup>+</sup> cells (5-fold;  $p < 0.001$ ), especially near the position of the crypt cells 7 days after irradiation,

compared with irradiated mice; the number and the localisation (far away from the crypt cells) of TUNEL<sup>+</sup> cells were similar to the non-irradiated mice (Fig.2e).

Disruption of the intestine structural integrity alters its barrier function, making it permeable to luminal content. Dextran is unable to cross the intestinal epithelium when it is intact (20). Intestinal permeability was quantified 7 days after irradiation with FITC-labelled dextran in the blood 4 hours after gavage. Abdominal irradiation significantly increased intestinal permeability ( $17.5 \pm 2.6 \mu\text{g/ml}$  versus  $1.4 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$  for the control;  $p < 0.001$ ). Treatment with SVF restores the impermeability ( $3.2 \pm 1.5 \mu\text{g/ml}$ ) compared to the non-irradiated mice (Fig.2f). The permeability was characterised by tight junction loss. Indeed, immunostaining of the tight-junction protein zonula occludens-1 (ZO-1) showed that ZO-1 in the control group was expressed in the cytomembrane of epithelial cells along the villi. Seven days post-irradiation, the expression of ZO-1 was considerably reduced when SVF treatment restored its expression (Fig.2g). These results indicate that SVF treatment induced a functional restoration of intestinal epithelial integrity.

### **SVF increases intestinal regeneration**

The maintenance of the epithelial barrier is also mediated by epithelial cell adhesion molecules such as EpCam, which also plays a role in cell proliferation, migration and differentiation (21). In non-irradiated mice, EpCam expression is observed at the crypts and villi and localised on the plasma membrane. Seven days after irradiation, a decrease in EpCam expression was observed as well as a disturbance in its localisation, with a mislocalisation in cytoplasm (Fig.3a). SVF treatment is associated with a recovery of EpCam expression both in the stem cell compartment and on the surface of the mucosa.

Decreased EpCam expression may also impact stem cell proliferation/differentiation (21). In the control group, Ki-67 immunostaining showed that the majority of proliferating cells were located in the transient amplification cell compartment and did not reside in the base of the crypt. Irradiation leads to a decrease in the number of Ki-67<sup>+</sup> cells in the ISC compartment. SVF treatment results in a significant increase in the number of Ki-67-positive cells in the ISC compartment, the transient amplification cell compartment and the extending regenerative epithelium, resulting in an enlarged and expanded hyperproliferative cluster area (Fig.3b).

Mesenchymal-derived factors are essential for maintaining intestinal epithelial stem cell homeostasis. In particular, the double-positive stromal cells Gp38<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> in the pericryptal localisation implicated in the production of niche factors are localised near the crypts in close contact with Lgr5<sup>+</sup> stem cells (22). The double immunostaining Gp38/CD34 showed that irradiation negatively impacts these stromal niches 7 days after irradiation and that the treatment by SVF enables them to be restored (Fig.3c).

### **SVF stimulates the restoration of the IECS**

CD24 is a marker of the lower crypt IECS (23) and therefore used to identify LGR5<sup>+</sup> and Paneth cells. In non-irradiated mice, we observed the presence of 2.5 CD24<sup>+</sup> lysozyme<sup>-</sup> cells per crypt, the corner-shaped cell population between Paneth cells (Fig.4a). An 80% loss of these cells was observed at day 7 after irradiation and SVF treatment restored this cell population. Paneth cells contribute to intestinal homeostasis by synthesizing peptides and antimicrobial proteins such as lysozyme and stem cell niche factors (2) and further promoting crypt base formation (24). By using lysozyme staining to identify Paneth cells, we observed that number of lysozyme<sup>+</sup> cells decreased significantly on day 7 after irradiation ( $p < 0.001$ ) compared with the control mice (Fig.4b). In the control mice, the lysozyme was normally efficiently packaged in well-defined secretory granules in the Paneth cells. In the irradiated mice, the Paneth cells exhibited altered lysozyme allocation patterns, with the majority showing reduced (lowly granular) or diffuse lysozyme staining. After SVF treatment, the number of Paneth cells per crypt increased compared with the irradiated mice ( $p < 0.001$ ), which was also higher than in the control mice. Interestingly, we also observed that the number of lysozyme<sup>+</sup> cells in the "upper crypt" increased in mice treated with SVF, suggesting an aberrant ISC niche architecture. The co-localisation of MUC2 (goblet cell marker) and lysozyme (Paneth cell marker) staining characterised an "intermediate" goblet/Paneth cells and were defined as immature or bipotential progenitor cells (25). Double immunostaining showed that the presence of Paneth cells at the "upper crypt" was co-staining with Muc2 after SVF treatment, indicating the presence of the 'intermediate' cells (Fig.4c). To assess whether the observed proliferative cluster was related to IECS, we performed a Ki67/CD24 co-staining. In the control mice, rare Ki67<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> cells were present in the crypts, with the majority of proliferating cells being located in the transit amplification compartment (TA) and not in the base of the crypt

(Fig.5a). On the other hand, in the proliferative cluster induced by SVF treatment, the CD24<sup>+</sup> cells were Ki67<sup>+</sup>; an expansion of the TA zone was also observed. In addition, to determine which population was responsible for increased crypt cell numbers, a double Ki67/lysozyme staining was carried out and showed the presence of Ki67<sup>+</sup>/lysozyme<sup>-</sup> and Ki67<sup>+</sup>/lysozyme<sup>+</sup> cells 7 days after irradiation in the irradiated mice treated with SVF (Fig.5b), indicating the proliferation of ISC and in particular the Paneth cells. It has recently been reported that hyperproliferative crypts show a high expression of HSP60, the mitochondrial molecular chaperone involved in the control of ISC homeostasis, and that HSP60-deficient crypts display a loss of stemness and cell proliferation, resulting in an aberrant Paneth cell phenotype (26). Here, we observed an increase in the HSP60<sup>+</sup> cells in the regeneration zone after treatment of SVF (Fig.5c), indicating the absence of mitochondrial impairment. Together these results showed that treatment with SVF restored the CD24<sup>+</sup>/lysozyme<sup>-</sup> and Paneth cell populations and increased the proliferation of the TA compartment (Ki67<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>) as well as the proliferation of Paneth cells (Lysosyme<sup>+</sup>/Ki67<sup>+</sup>).

#### **SVF limits the inflammatory process by shifting the monocyte-macrophage phenotype**

Macrophages have a central role in the epithelial barrier and in the maintenance of mucosal homeostasis. The spleen is the source of the main subsets of macrophage-generating monocytes (27, 28) and we therefore evaluated the percentage of pro-inflammatory and anti-inflammatory monocytes in the spleen 7 days after irradiation and the impact of SVF treatment on the subsets of splenic monocytes. Firstly, the migration potential of splenic monocytes was assessed using the spreading assay performed on a rmVCAM-1 matrix at day 7 after irradiation with and without SVF treatment. Unspread cells were defined as round cells, while spread cells were defined as cells with extended pseudopodia. The percentage of cells adopting the spreading morphology was quantified using fluorescein-conjugated phalloidin, which binds to filamentous actin (Fig. 6a). In the non-irradiated mice, actin filament staining was weak in the splenic monocytes and significantly increased in the irradiated mice (2.7-fold compared with the control; P<0.001). Treatment with SVF significantly reduced the intensity of phalloidin staining to 42% compared with the irradiated mice. This is associated with morphological changes characterised by a normalisation of cell diameter, suggesting an impact on the pro-inflammatory phenotype of these cells (29). Flow cytometry analysis of pro-

inflammatory and anti-inflammatory monocytes subsets showed a 2.5-fold ( $p < 0.01$ ) increase in the percentage of Ly6c<sup>high</sup> pro-inflammatory monocytes defined as CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>high</sup>CCR2<sup>high</sup> in the irradiated mice compared with the control mice (Fig.6b). Treatment with SVF did not reduce the percentage of Ly6c<sup>high</sup> monocytes. On the contrary, the anti-inflammatory monocytes subset CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>low</sup>CX3CR1<sup>high</sup> of mice treated with SVF showed a 2-fold ( $p < 0.001$ ) higher percentage of anti-inflammatory Ly6c<sup>low</sup> monocytes than the irradiated mice, which was confirmed by CX3CR1 immunostaining of the splenic monocytes ( $p < 0.001$ ) (Fig.6c). In addition, the splenic monocytes could differentiate into pro-inflammatory M1 or anti-inflammatory M2 macrophages and contribute to tissue repair (30). To address this issue, macrophages generated by 7 days of culture with M-CSF were stimulated with LPS-IFN $\gamma$  (M1 conversion) or IL-4 (M2 conversion) and the level of mRNA associated with macrophage polarity was analysed by real-time PCR. Our results showed that irradiation stimulated the expression of genes linked to the M1 marker (i.e. iNos, MMP9) without any effect on the expression of genes linked to the M2 marker (Fig.6d). SVF treatment, on the other hand, reduced the mRNA levels of M1 (iNos, MMP9) markers and increased the mRNA levels of M2 markers (CX3CR1, CD206, Arg1, IL-10). Interestingly, the SVF treatment limited the levels of mRNA coding for excessive remodeling markers such as TGF- $\beta$  1 or TNC.

In the ileum, the double CD68/CD206 staining showed the absence of CD206<sup>+</sup> cells in the irradiated mice and the SVF treatment led to an increase in CD68<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> cells (Fig.7a). This anti-inflammatory effect in the intestine by the SVF treatment is supported by real-time PCR results with a significant suppression of mRNA levels coding for IL1-1 $\beta$  and IL-6 compared with the irradiated mice ( $p < 0.001$ ) (Fig.7b). Taken together, these results suggest that SVF treatment changes the polarity of monocyte/macrophage to an anti-inflammatory phenotype, which may contribute to improving the GIS.

## Discussion

In the event of accidental or intentional exposure to high doses of radiation resulting in GI syndrome in many victims, there is an urgent need to implement effective and rapid therapeutic countermeasures. SVF can be produced within a few hours, injected on the same day and injected in an autologous way. In our study we showed that intravenous injection of SVF limited the weight loss of the mice exposed to sublethal irradiation, inhibited the

intestinal permeability which resulted in increased survival against lethal doses of radiation. Histological analyses showed that SVF treatment stimulated the regeneration of the epithelium by promoting numerous enlarged hyperproliferative zones and restored the cell populations in the ISC compartment. The therapeutic efficiency was associated to an anti-inflammatory effect.

Potential countermeasures to attenuate GIS have been identified by their ability to improve acute survival in mice (LD50/10) and to increase survival times at LD80/10 by at least 50% (19). In our study, the therapeutic effect was very important in terms of mortality, with an 80% mortality in the irradiated and treated animals, compared to 38% in the untreated irradiated animals. In addition to the practical advantages of obtaining SVF easily and quickly, the other advantage is its composition that is rich in different cell lineages, which are potentially pro-regenerating and therefore have more pleiotropic effects than MSCs (8-11, 31). Indeed, previous studies have shown that the injection of MSC into irradiated mice resulted in improved regeneration of intestinal or colonic tissue, increasing the survival of the animals and reducing colonic ulcerations (10, 31). The effectiveness of MSCs is due to the production of growth factors with anti-inflammatory and pro-angiogenic effects. The supportive effect of MSCs in the regeneration of the intestinal epithelium is not specific to this subpopulation of cells. However, *in vitro* amplification before their injection limits their use in clinic emergencies. Other cell types are involved in the regenerative response to irradiation such as endothelial cells and immune cells (32). In our study, the characterisation of SVF in mice showed a high proportion of both MSCs and immune cells and the presence of endothelial progenitors. The combined presence of these different cell types seems to be responsible for the superiority of efficacy compared to the treatment of MSCs alone (33).

The mechanism of the therapeutic efficiency of SVF remains poorly understood. The literature supports the contribution of paracrine effects, with crosstalk between SVF components and the host, leading to repair and healing (12). In our model, the SVF treatment both stimulated the epithelial cell regeneration and restored the impermeability as indicated by ZO-1 and EpCam IHC and measurement of permeability. Moreover, SVF treatment leads to hyperproliferative Ki67<sup>+</sup> areas, features typical of actively regenerating intestinal epithelium

(34) combined with the restoration of the Gp38<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> mesenchymal cells associated to crypts, which plays a predominant role in the maintenance of ISC pool (22, 25).

Under physiological conditions, ISCs LGR5<sup>+</sup> located at the bottom of the crypts are responsible for the replenishment of intestinal epithelial cells. Using the genetic labelling and the tracing of distinct cell types, recent reports have indicated that Lgr5<sup>+</sup> ISC are radiosensitive. At an abdominal dose of 10 Gy, the surviving Lgr5<sup>+</sup> ISCs are still sufficient to sustain complete intestinal recovery 2 weeks after irradiation (35); beyond this dose, the more widespread apoptosis of Lgr5<sup>+</sup> ISCs induces a failure in the restoration of viability of the small intestine (36). In our study, in order to visualise the ISC compartment, we used the co-location of CD24, more strongly expressed at the base of the crypt (23, 37, 38) and the lysozyme expressed by the Paneth cells that support the stem cell niche of the crypt (2). We showed that irradiation caused a significant loss of ISC and Paneth cells. At day 7 after 18 Gy irradiation, the time and the dose where the modest surviving Lgr5<sup>+</sup> ISCs could not dramatically support intestinal recovery, treatment with SVF restored the CD24<sup>+</sup>/lysozyme<sup>-</sup> and Paneth cell populations, increased the proliferation of the TA compartment (Ki67<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>) as well as the proliferation of Paneth cells (Lysozyme<sup>+</sup>/Ki67<sup>+</sup>), whereas under normal homeostasis, Paneth cells do not express ISC or proliferative markers *in vivo* (39).

It has already been shown that Paneth cells can return to the proliferative state and differentiate into all types of epithelial cells after radiation injury. Schmitt *et al.* (40) have indeed shown that, in acute inflammation, Paneth cells de-differentiate into proliferating stem-like cells that are able to form 3D organoids *ex vivo* (in the absence of LGR5<sup>+</sup> cells), whereas LGR5<sup>+</sup> cells alone cannot form organoids, and finally repopulate the epithelial wall *in vivo* (38). In addition, a depletion of Paneth cells leads to a concomitant reduction of Lgr5<sup>+</sup> ISCs (41). In our work, SVF treatment was associated with a proliferation of Paneth cells as well as their number per crypt. Interestingly, this effect was also observed in the "upper crypt", which could suggest a process of dedifferentiation (25). Thus, we observed the presence of a lysozyme<sup>+</sup>/Muc2<sup>+</sup> population after treatment with SVF. These cells expressed Paneth and goblet biomarkers reflecting a bipotential progenitor of secretory cells, or intermediate cells (25). In addition, mitochondrial impairment reduced stemness induced by loss of Paneth cell functionality and ISC differentiation. Specifically HSP60 deficiency in ISC has

been associated with complete loss of proliferation (26). SVF treatment restored a mitochondrial function in the proliferation area which may have ensured the stemness.

Inflammatory cells such as monocytes/macrophages influence intestinal epithelium repair and generate dysfunctional PCs characterised by loss of lysozyme positive granules, concomitant to aberrant ISC phenotype such as observed in active ileal Crohn's disease (26, 42). Intestinal mucosa macrophages are dependent on constant replenishment by classical blood monocytes (43) and the spleen produces a majority of monocyte subsets generating macrophages (44). Tissue repair after inflammatory insult requires coordinated mobilisation of both subsets: Ly6C<sup>high</sup> monocytes, which digest damaged tissue, but their persistence is deleterious and Ly6C<sup>low</sup> monocytes act on wound healing (45). The spleen is the reservoir accommodating the demands of rapid onset inflammation and we showed that the spleens from the irradiated mice were characterised by an accumulation of pro-inflammatory monocyte subset Ly6C<sup>high</sup>CCR2<sup>high</sup> phenotypes and a high potential of migration characterised in the spreading assay. In the spleens from the SVF-treated mice, although the pro-inflammatory monocytes level was not reduced, we inversely observed an increase in the level of anti-inflammatory monocytes Ly6C<sup>low</sup> Cx3cr1<sup>high</sup>, which can be matured *in vitro* in the anti-inflammatory macrophage M2. Our results support the fact that SVF treatment is associated with anti-inflammatory process both by repressing the pro-inflammatory cytokines and by shifting the macrophage polarity toward the M2 phenotype implicated in the inflammatory resolution phase and tissue regeneration (42). More experiments are needed to understand the role of M2 macrophages in the ISC compartment after SVF treatment. Recently, it was shown that the depletion of macrophages resulted in decreased as well as crypt fission, Lgr5<sup>+</sup> stem cell proliferation and Paneth cell numbers (46).

## **Conclusion**

In this work we have shown that treatment with SVF mitigates the GIS. This cell therapy product stimulates regeneration and intestinal repair targeting the stem cell compartment and provides an immunomodulatory response that enables the animals to survive at lethal doses.



## **List of abbreviation**

SVF: Stromal vascular fraction

GIS: Gastrointestinal syndrome

Gy: Gray

ISCs: Intestinal stem cells

EpCam: Epithelial cell adhesion molecule

IECS: Intestinal epithelial stem cells

## **Declarations**

### **Ethics approval**

All experiments procedures in this study were approved and performed in accordance with the guidelines of the Animal Ethics Committee from French Ministry of Agriculture (EC Directive 2010/63/EU and French Decret 2013–118).

### **Consent for publication**

Not applicable in this section.

### **Availability of data and materials**

All relevant data and material to reproduce the findings are available in the manuscript.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Funding**

This work was supported by grant from EDF (Electricité de France) and ANR (AID/DGA, ASTRID).

### **Authors' contributions**

L.B carried out the experimentation and analyzed the data. C.S performed SVF preparation and characterization. C.D performed SVF preparation and flow cytometry analysis. N.M, M.B,

B.LG and F.M reviewed the manuscript. C.L performed study design, experiments, analyzed data and wrote the manuscript. The authors read and approved the final manuscript.

### **Acknowledgements**

The authors thank the animal core facility GSEA from the IRSN.

### **References**

1. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*. 2007;449:1003-7.
2. Clevers HC, Bevins CL. Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:289–311.
3. Potten CS. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1998;33:821-30.
4. Gunter-Smith PJ. Gamma radiation affects active electrolyte transport by rabbit ileum: basal Na and Cl transport. *Am J Physiol*. 1986;250:G540-5.
5. Krivokrysenko VI, Shakhov AN, Singh VK, Bone F, Kononov Y, Shyshynova I, Cheney A, Maitra RK, Purmal A, Whitnall MH, Gudkov AV, Feinstein E. Identification of granulocyte colony-stimulating factor and interleukin-6 as candidate biomarkers of CBLB502 efficacy as a medical radiation countermeasure. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;343:497-508.
6. Krivokrysenko VI, Toshkov IA, Gleiberman AS, Krasnov P, Shyshynova I, Bespalov I, Maitra RK, Narizhneva NV, Singh VK, Whitnall MH, Purmal AA, Shakhov AN, Gudkov AV, Feinstein E. The Toll-Like Receptor 5 Agonist Entolimod Mitigates Lethal Acute Radiation Syndrome in Non-Human Primates. *PLoS One*. 2015;10:e0135388.
7. Saha S, Bhanja P, Kabarriti R, Liu L, Alfieri AA, Guha C. Bone marrow stromal cell transplantation mitigates radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice. *PLoS One*. 2011;6:e24072.
8. François S, Bensidhoum M, Mouiseddine M, Mazurier C, Allenet B, Semont A, Frick J, Saché A, Bouchet S, Thierry D, Gourmelon P, Gorin NC, Chapel A. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes

- their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells*. 2006;24:1020-9.
9. Semont A, Mouiseddine M, Francois A, Demarquay C, Mathieu N, Chapel A, Saché A, Thierry D, Laloi P, Gourmelon P. Mesenchymal stem cells improve small intestinal integrity through regulation of endogenous epithelial cell homeostasis. *Cell Death Differ*. 2010;17:952–61.
  10. Semont A, Demarquay C, Bessout R, Durand C, Benderitter M, Mathieu N. Mesenchymal stem cell therapy stimulates endogenous host progenitor cells to improve colonic epithelial regeneration. *PLoS One*. 2013;8:e70170.
  11. Linard C, Busson E, Holler V, Strup-Perrot C, Lacave-Lapalun JV, Lhomme B, Prat M, Devauchelle P, Sabourin JC, Simon JM, Bonneau M, Lataillade JJ, Benderitter M. Repeated autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell injections improve radiation-induced proctitis in pigs. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2:916-27.
  12. Dykstra JA, Facile T, Patrick RJ, Francis KR, Milanovich S, Weimer JM, Kota DJ. Concise Review: Fat and Furious: Harnessing the Full Potential of Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6:1096-1108.
  13. Han S, Sun HM, Hwang KC, Kim SW. Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells: Update on Clinical Utility and Efficacy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2015;25:145-52.
  14. Astori G, Vignati F, Bardelli S, Tubio M, Gola M, Albertini V, Bambi F, Scali G, Castelli D, Rasini V, Soldati G, Moccetti T. “In vitro” and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells. *J Transl Med*. 2007;5:55.
  15. Philandrianos C, Serrero M, Grimaud F, Magalon J, Visée C, Velier M, Francois P, Orsoni P, Magalon G, Grimaud JC, Desjeux A, Véran J, Sabatier F. First clinical case report of local microinjection of autologous fat and adipose-derived stromal vascular fraction for perianal fistula in Crohn's disease. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9:4.
  16. Gorin NC, Fliedner TM, Gourmelon P, Ganser A, Meineke V, Sirohi B, Powles R, Apperley J. Consensus conference on European preparedness for haematological and other medical management of mass radiation accidents. *Ann Hematol*. 2006;85:671-9.

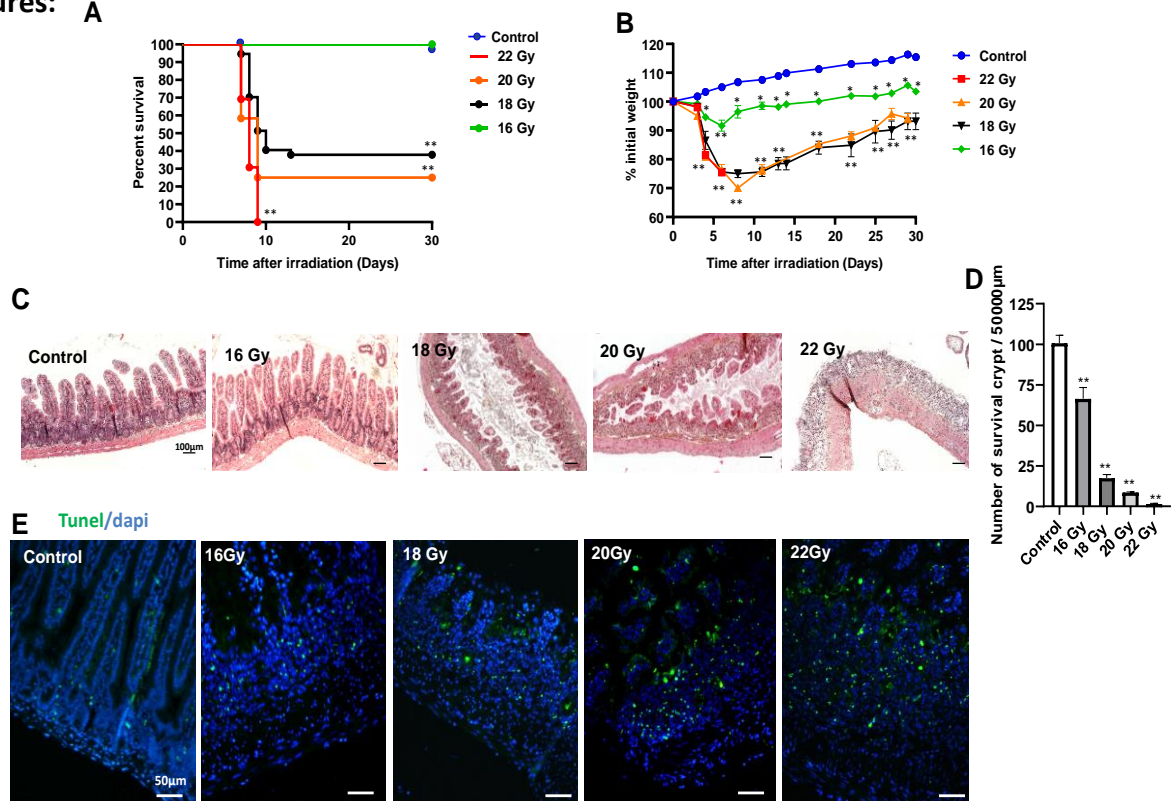
17. Bowles AC, Wise RM, Gerstein BY, Thomas RC, Ogelman R, Febbo I, Bunnell BA. Immunomodulatory Effects of Adipose Stromal Vascular Fraction Cells Promote Alternative Activation Macrophages to Repair Tissue Damage. *Stem Cells*. 2017;35:2198-2207.
18. Withers HR, Elkind MM. Microcolony survival assay for cells of mouse intestinal mucosa exposed to radiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1970;17:261-7
19. Terry NH, Travis EL. The influence of bone marrow depletion on intestinal radiation damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1989;17:569-73.
20. Dawson PA, Huxley S, Gardiner B, Tran T, McAuley JL, Grimmond S, McGuckin MA, Markovich D. Reduced mucin sulfonation and impaired intestinal barrier function in the hyposulfataemic NaS1 null mouse. *Gut*. 2009;58:910-9.
21. Schnell U, Cirulli V, Giepmans BN. EpCAM: structure and function in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1828:1989-2001.
22. Stzepourginski I, Nigro G, Jacob JM, Dulauroy S, Sansonetti PJ, Eberl G, Peduto L. CD34+ mesenchymal cells are a major component of the intestinal stem cells niche at homeostasis and after injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114:E506-E513.
23. von Furstenberg RJ, Gulati AS, Baxi A, Doherty JM, Stappenbeck TS, Gracz AD, Magness ST, Henning SJ. Sorting mouse jejunal epithelial cells with CD24 yields a population with characteristics of intestinal stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;300:G409-17.
24. Langlands AJ, Almet AA, Appleton PL, Newton IP, Osborne JM, Näthke IS. Paneth Cell-Rich Regions Separated by a Cluster of Lgr5+ Cells Initiate Crypt Fission in the Intestinal Stem Cell Niche. *PLoS Biol*. 2016;14:e1002491.
25. Smith NR, Davies PS, Levin TG, Gallagher AC, Keene DR, Sengupta SK, Wieghard N, El Rassi E, Wong MH. Cell Adhesion Molecule CD166/ALCAM Functions within the Crypt to Orchestrate Murine Intestinal Stem Cell Homeostasis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2017;3:389-409.
26. Khaloian S, Rath E, Hammoudi N, Gleisinger E, Blutke A, Giesbertz P, Berger E, Metwaly A, Waldschmitt N, Allez M, Haller D. Mitochondrial impairment drives intestinal stem

- cell transition into dysfunctional Paneth cells predicting Crohn's disease recurrence. *Gut*. 2020;69:1939-51.
27. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo JL, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E, Mempel TR, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 2009;325:612-6.
  28. Hettinger J, Richards DM, Hansson J, Barra MM, Joschko AC, Krijgsveld J, Feuerer M. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol*. 2013;14:821-30.
  29. Miteva K, Pappritz K, El-Shafeey M, Dong F, Ringe J, Tschöpe C, Van Linthout S. Mesenchymal Stromal Cells Modulate Monocytes Trafficking in Coxsackievirus B3-Induced Myocarditis. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6:1249-61.
  30. Linard C, Brachet M, L'homme B, Strup-Perrot C, Busson E, Bonneau M, Lataillade JJ, Bey E, Benderitter M. Long-term effectiveness of local BM-MSCs for skeletal muscle regeneration: a proof of concept obtained on a pig model of severe radiation burn. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9:299.
  31. Chang P, Qu Y, Liu Y, Cui S, Zhu D, Wang H, et al. Multitherapeutic effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells on radiation-induced intestinal injury. *Cell Death Dis*. 2013;4:e685.
  32. Francois A, Milliat F, Guipaud O, Benderitter M. Inflammation and immunity in radiation damage to the gut mucosa. *Biomed Res Int*. 2013;2013:123241.
  33. Sun Y, Chen S, Zhang X, Pei M. Significance of Cellular Cross-Talk in Stromal Vascular Fraction of Adipose Tissue in Neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39:1034-44.
  34. Metcalfe C, Kljavin NM, Ybarra R, de Sauvage FJ. Lgr5+ stem cells are indispensable for radiation-induced intestinal regeneration. *Cell Stem Cell*. 2014;14:149-59.
  35. Sato T, Sase M, Ishikawa S, Kajita M, Asano J, Sato T, Mori Y, Ohteki T. Characterization of radioresistant epithelial stem cell heterogeneity in the damaged mouse intestine. *Sci Rep*. 2020;10:8308.

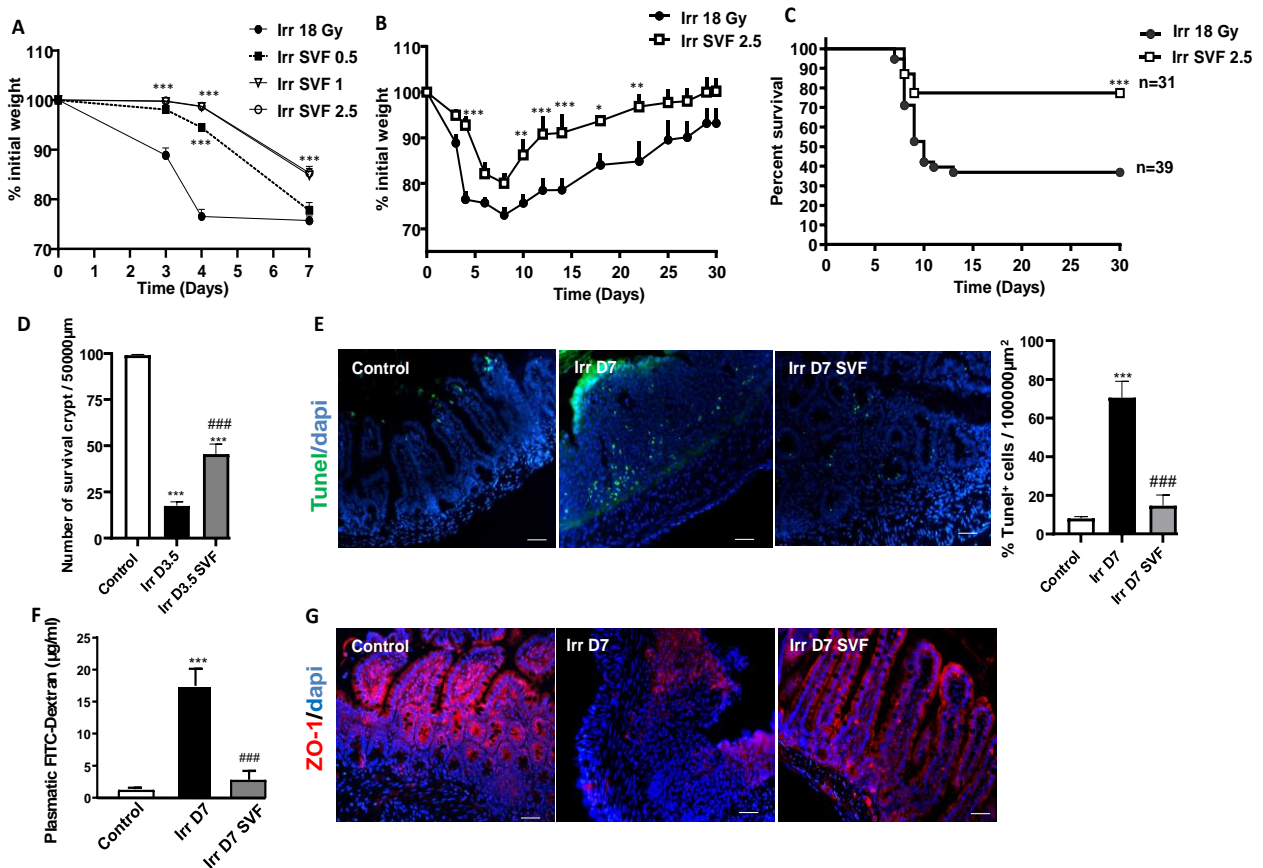
36. Hua G, Thin TH, Feldman R, Haimovitz-Friedman A, Clevers H, Fuks Z, Kolesnick R. Crypt base columnar stem cells in small intestines of mice are radioresistant. *Gastroenterology*. 2012;143:1266-76.
37. Wang F, Scoville D, He XC, Mahe MM, Box A, Perry JM, Smith NR, Lei NY, Davies PS, Fuller MK, Haug JS, McClain M, Gracz AD, Ding S, Stelzner M, Dunn JC, Magness ST, Wong MH, Martin MG, Helmrath M, Li L. Isolation and characterization of intestinal stem cells based on surface marker combinations and colony-formation assay. *Gastroenterology*. 2013;145:383-95.
38. Yu S, Tong K, Zhao Y, Balasubramanian I, Yap GS, Ferraris RP, Bonder EM, Verzi MP, Gao N. Paneth Cell Multipotency Induced by Notch Activation following Injury. *Cell Stem Cell*. 2018;23:46-59.
39. Basak O, van de Born M, Korving J, Beumer J, van der Elst S, van Es JH, Clevers H. Mapping early fate determination in Lgr5+ crypt stem cells using a novel Ki67-RFP allele. *EMBO J*. 2014;33:2057-68.
40. Schmitt M, Schewe M, Sacchetti A, Feijtel D, van de Geer WS, Teeuwssen M, Sleddens HF, Joosten R, van Royen ME, van de Werken HJG, van Es J, Clevers H, Fodde R. Paneth Cells Respond to Inflammation and Contribute to Tissue Regeneration by Acquiring Stem-like Features through SCF/c-Kit Signaling. *Cell Rep*. 2018;24:2312-28.
41. Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M, Barker N, Shroyer NF, van de Wetering M, Clevers H. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*. 2011;469:415-8.
42. Saha S, Aranda E, Hayakawa Y, Bhanja P, Atay S, Brodin NP, Li J, Asfaha S, Liu L, Taylor Y, Zhang J, Godwin AK, Tome WA, Wang TC, Guha C, Pollard JW. Macrophage-derived extracellular vesicle-packaged WNTs rescue intestinal stem cells and enhance survival after radiation injury. *Nat Commun*. 2016;7:13096.
43. Bain CC, Bravo-Blas A, Scott CL, Perdiguero EG, Geissmann F, Henri S, Malissen B, Osborne LC, Artis D, Mowat AM. Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol*. 2014;15:929-37.

44. Hettinger J, Richards DM, Hansson J, Barra MM, Joschko ACn, Krijgsveld J, Feuerer M. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol.*2013;14:821-30.
45. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res.* 2014;2:1-9.
46. Riehl TE, Alvarado D, Ee X, Ciorba MA, Stenson WF. Hyaluronic acid promotes Lgr5+ stem cell proliferation and crypt fission through TLR4 and PGE 2 transactivation of EGFR. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2020;319:G63-G73.

Figures: A

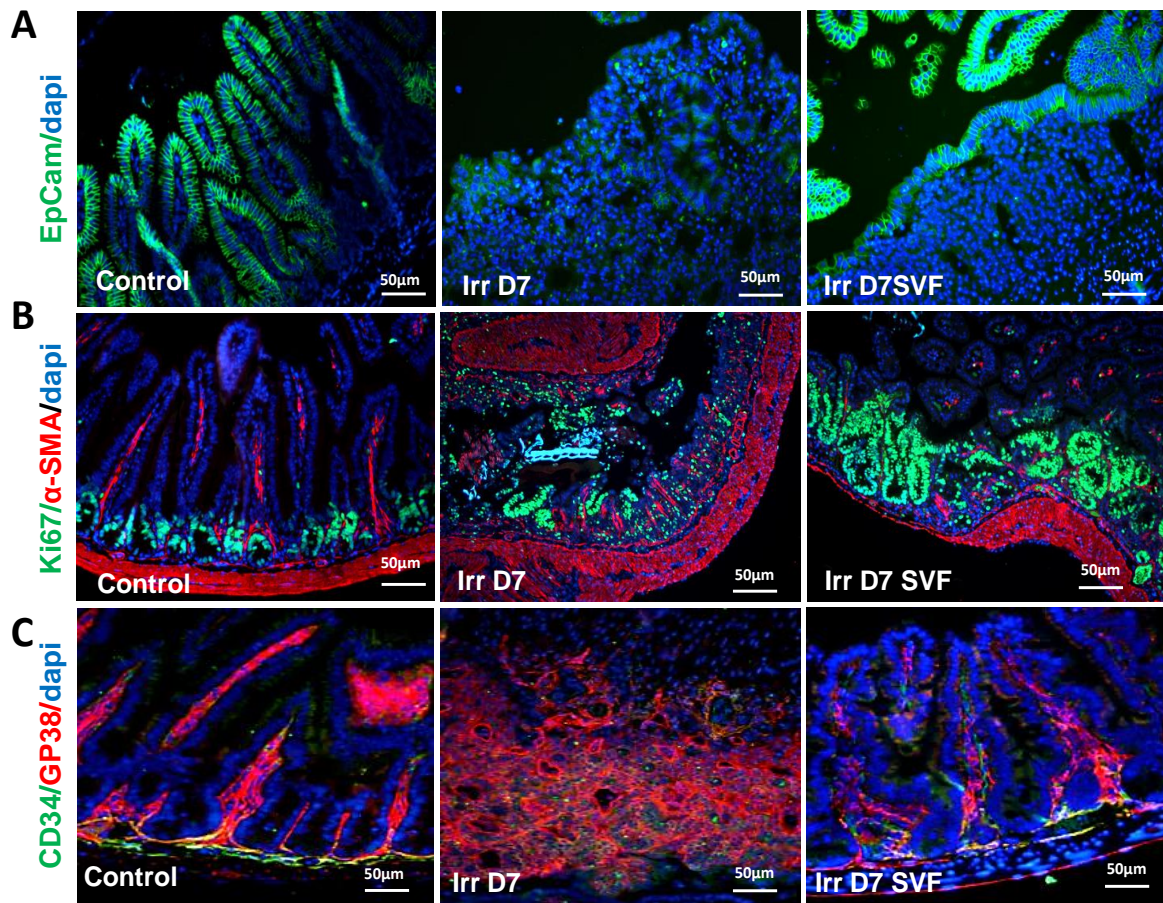


**Figure 1 :** Identification of irradiation dose inducing GIS. (a) Kaplan-Meier survival analysis of 16, 18, 20 and 22 Gy abdominal irradiated mice (n=10 per group). (b) Weight loss changes for 30 days of mice exposed to 16, 18, 20 and 22 Gy abdominal irradiation (n=10 per group). (c) Response of the small intestine to 16, 18, 20 and 22 Gy abdominal irradiation at day 3.5. Representative HES staining of the ileum showing structural modification. Scale bar: 100 μm. (d) Irradiation dose-dependent regenerative crypts. The plots illustrate the number of surviving regenerative crypts present by unit length in a small intestine 3.5 days post-irradiation. The data are represented by mean ± SEM (n=4-5), P values were calculated by one-way or two-way analyses (for Weight loss changes) of variance (ANOVA) with Bonferroni correction; \*p<0.01; \*\*p<0.001 compared with the control group. (e) TUNEL staining. Representative images of ileal sections at 3.5 days post irradiation demonstrating an increase of TUNEL-positive cells at the crypt base with the escalating dose from 16 to 22 Gy. TUNEL positive cells were stained green and the nucleus was stained with DAPI at day 3.5 post-irradiation. Scale bar: 50 μm.

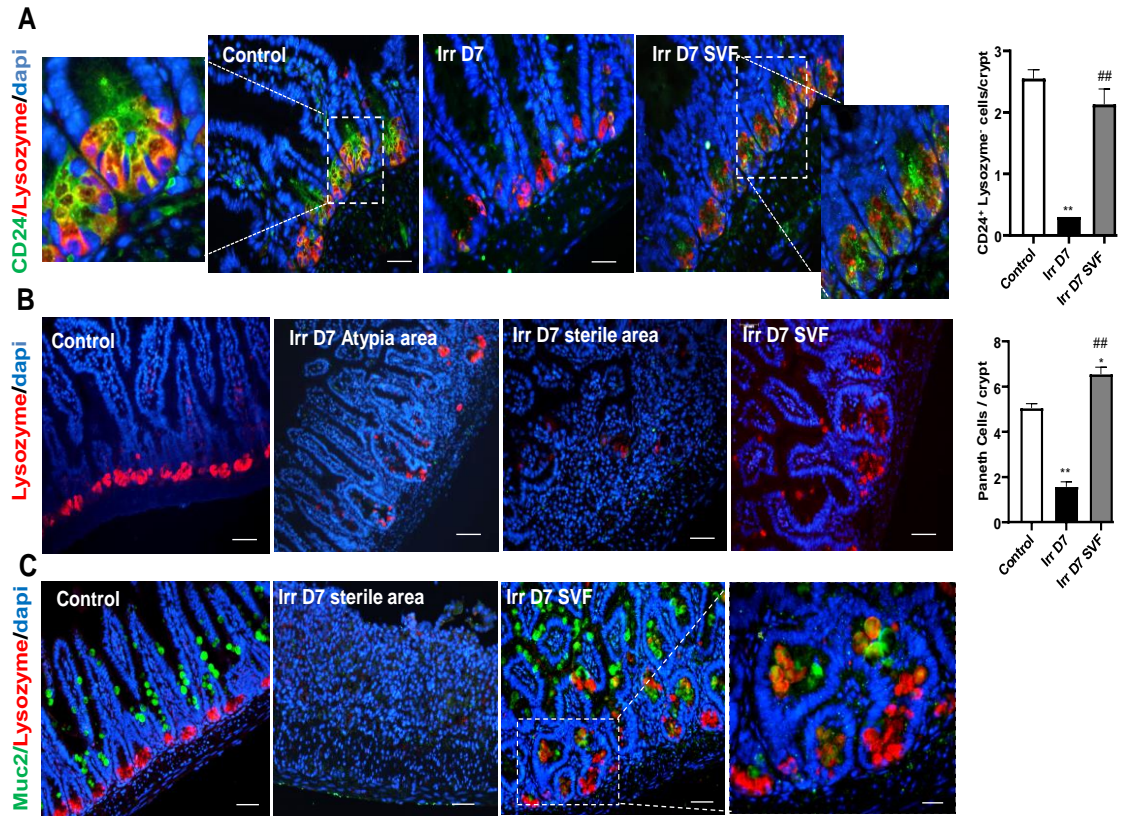


**Figure 2** : SVF treatment mitigating GIS. (a) Cells concentration-dependent effect of SVF on weight loss changes at 7 days of mice exposed to 18 Gy abdominal irradiation. (b) Weight loss changes for 30 days (n=8) and (c) Kaplan-Meier survival analysis of 18 Gy abdominal exposed mice receiving SVF ( $2.5 \times 10^6$  cells) treatment, or not receiving treatment. The data are represented by mean  $\pm$  SEM, P values were calculated by ANOVA with Bonferroni correction; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  compared with the irradiated group. (d) Number of regenerative crypts at day 3.5 after 18 Gy abdominal irradiation with or without SVF ( $2.5 \times 10^6$  cells) treatment. (e) Representative immunostaining of TUNEL and the number of TUNEL+ cells in the ileal sections from the control in irradiated and irradiated SVF treated mice 7 day post-irradiation. (f) Intestinal permeability checked by FITC/dextran assay in non-irradiated mice and 7 days after abdominal irradiation with or without SVF treatment. (g) Representative immunostaining of Zonulin-1 (ZO-1) in the ileal sections from the control in irradiated and irradiated SVF treated mice 7 day post-irradiation. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ . The data are represented by mean  $\pm$  SEM (n=8). P values were calculated by ANOVA with Bonferroni correction; \*\*\* $p < 0.001$  compared with the control mice; ### $p < 0.001$  compared with the irradiated mice.

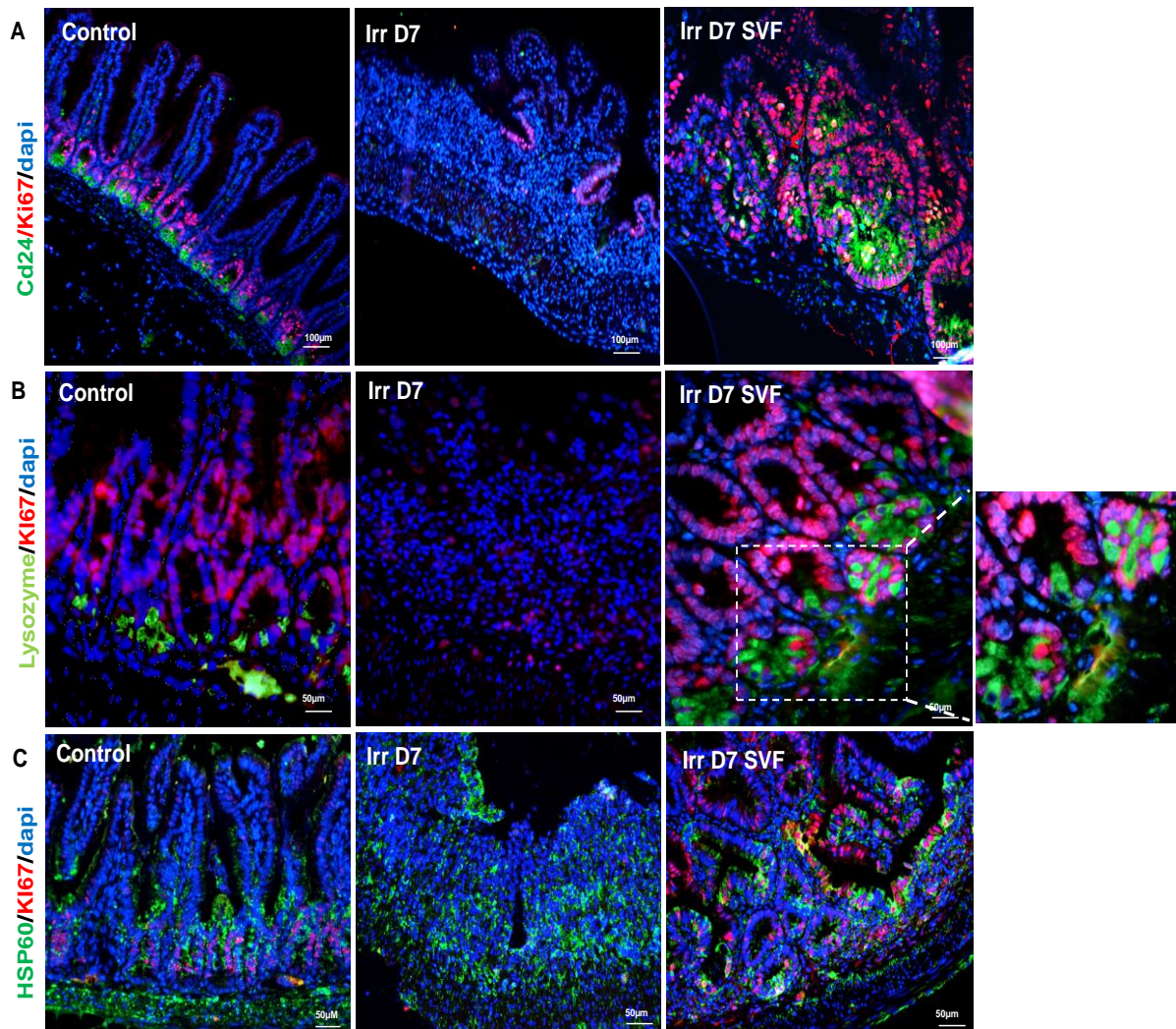




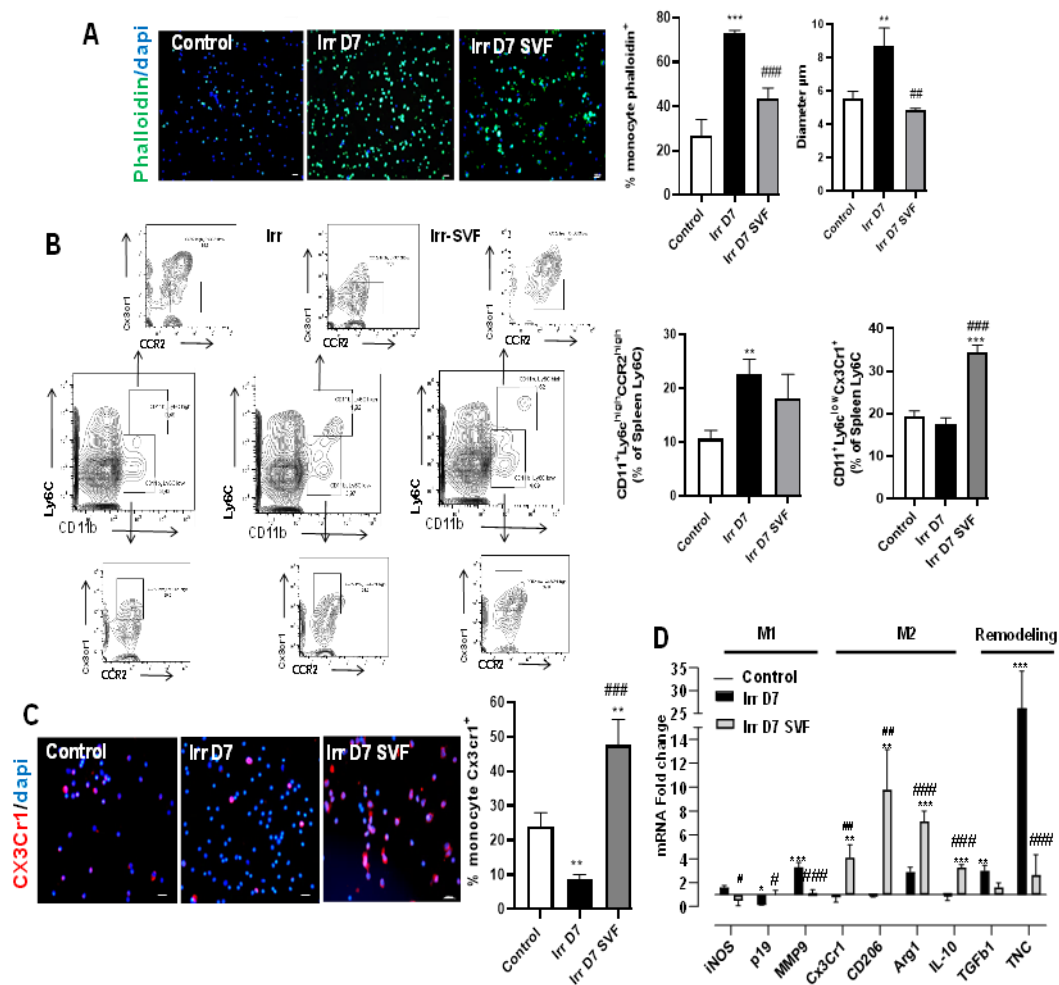
**Figure 3 :** Ileal regenerative response induced by SVF treatment. Sections of ileum from mice 7 days after 18 Gy abdominal irradiation, with or without SVF treatment were stained with (a) EpCam (green) (b) Ki67 (green). Note the hypertrophic (green) crypts under SVF treatment. (c) Co-staining of gp38 (red) and CD34 (green) identifying pericryptal mesenchymal cells. Double positive gp38<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> appeared in orange/yellow at the base of crypts. Dapi stained nuclei. Scale bars: 50  $\mu$ m.



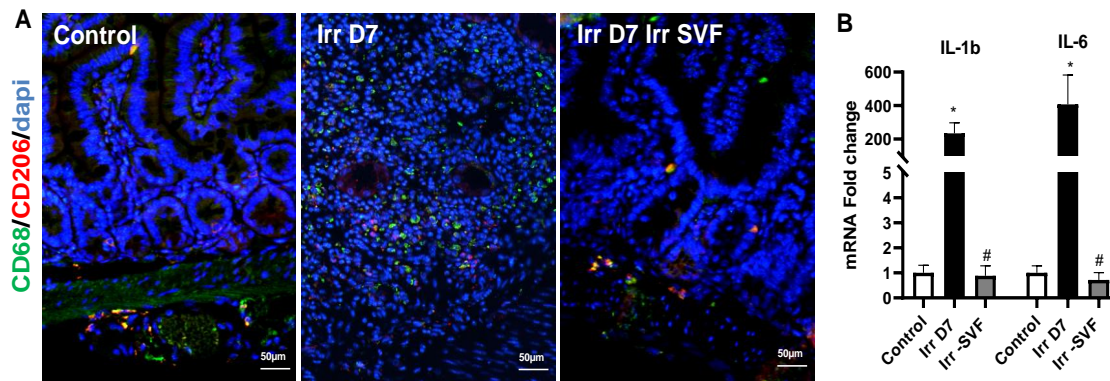
**Figure 4 :** Effect of SVF on crypt IECs. (a) IHC staining showing the expression pattern of CD24 (green), Lysozyme (red) in ileum. The cross section shows the co-staining of CD24 and lysozyme in the control and after SVF treatment. The histogram shows the restoration of the CD24 population after SVF treatment in crypts. (b) Lysozyme staining and histogram of the Paneth cell number per crypts. (c) IHC co-stained with Lysozyme (red) and goblet cell marker Muc2 (green) to identify immature Paneth progenitor cells. Dapi stained nuclei. Scale bars: 50  $\mu$ m. The data are represented by mean  $\pm$  SEM (n=4-5). P values were calculated by ANOVA with Bonferroni correction, \*p<0.01; \*\*p<0.001 compared with the control group; ##p<0.001 compared with the irradiated group.



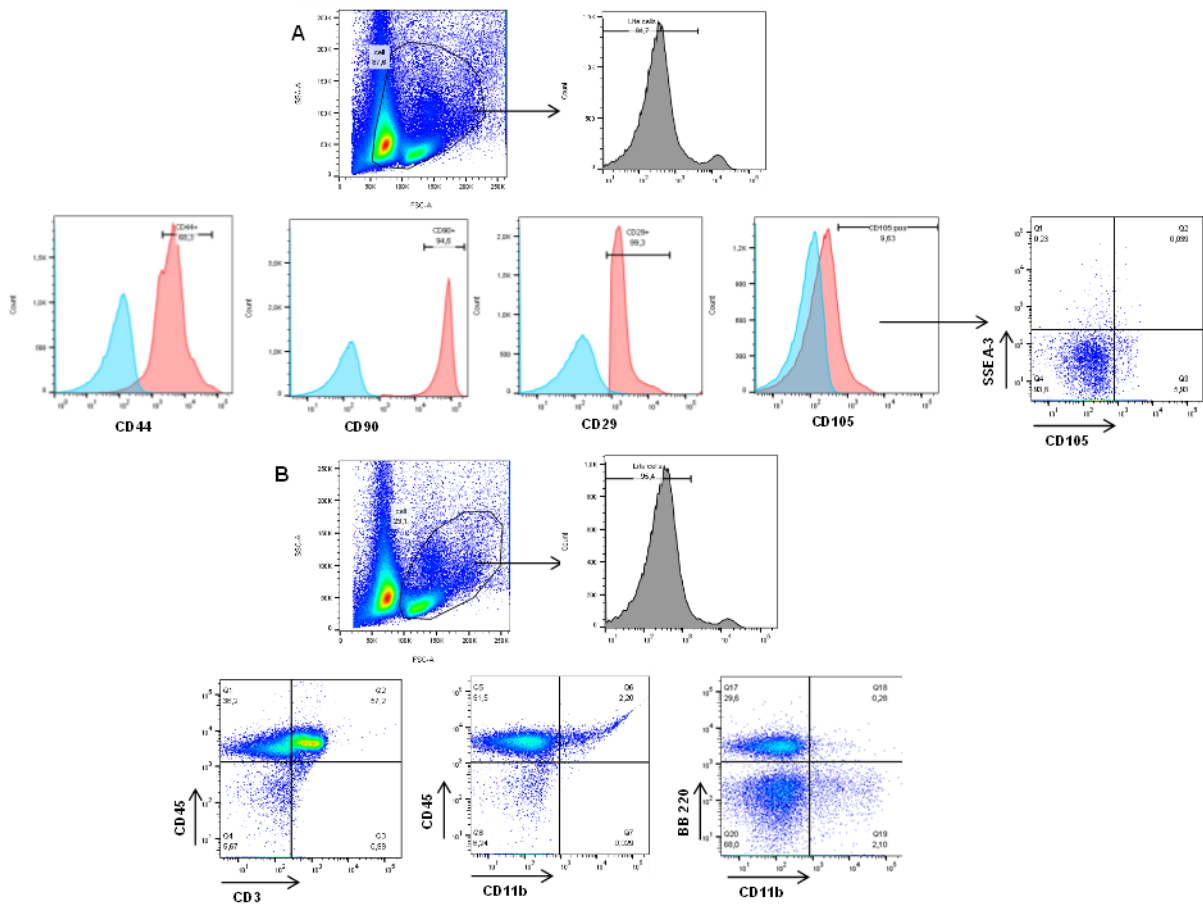
**Figure 5 :** Crypt IECS proliferation induced by SVF treatment. (a) IHC co-staining CD24 (green), Ki67 (red) in the ileum showing the hyperproliferative area after SVF treatment. (b) IHC co-staining Lysozyme (green), Ki67 (red) in the ileum. (c) IHC co-staining HSP60 (green), Ki67 (red) in the ileum. Dapi stained nuclei.



**Figure 6** : SVF promoting anti-inflammatory monocytes/macrophages subsets in the spleen. (a) Phalloidine staining (green) of splenic monocytes from the control and at day 7 post-irradiation with or without SVF treatment. Dapi stained nuclei. Scale bar: 20  $\mu$ m. The bar graphs are represented by the mean  $\pm$  SEM of monocytes phalloidine<sup>+</sup> and the monocyte diameters. (b) Representative FACS plots and frequencies of CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup>CCR2<sup>high</sup> and CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>low</sup>Cx3cr1<sup>high</sup> among live cells from the control and at day 7 post-irradiation with or without SVF treatment. (c) Cx3cr1staining (red) of splenic monocytes. The bar graphs are represented by the mean  $\pm$  SEM of Cx3CR1<sup>+</sup> monocytes. Dapi stained nuclei. Scale bar: 20  $\mu$ m. (d) Gene expression from splenic monocytes differentiated in different culture conditions from the control and at day 7 post-irradiation with or without SVF treatment. Macrophages were generated from splenic monocytes in the presence of M-CSF. Real-time-PCR in an unstimulated condition, a M1 condition after stimulation with LPS and IFN- $\gamma$  and a M2a condition after stimulation with IL-4. The data are expressed relative to control and normalised to GAPDH. All results are expressed as means  $\pm$ SEM (n=8). P values were calculated by ANOVA with Bonferroni correction, \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 compared with the control group; #p<0.05; ###p<0.01; ####p<0.001 compared with the irradiated group.



**Figure 7** : SVF facilitated induction of M2 macrophages in the ileum and reduced radiation induced inflammatory response. a) IHC co-staining CD68 (green), CD206 (red) in the ileum showing an increase of the co-staining CD68/CD206 related to M2 macrophage after SVF treatment. Dapi stained nuclei. b) Real-time-PCR analysis of IL-1 $\beta$  and IL-6. The results are expressed as means  $\pm$ SEM (n=8). p values were calculated by analysis of variance with Bonferroni correction; \*p<0.001 compared with the control mice; #p<0.001 compared with the irradiated mice.



**Figure S1:** Gating strategies utilized for analyzing sub-populations within the stromal vascular fraction of mice. a) ASC-like populations. Isotype controls are shown as blue histogram. b) Leucocytes populations.

## Axe 2 : L'immunité dans la réponse d'immunomodulation du SGI radio-induit

L'article a été soumis à Stem Cell Research and Therapy.

### **Article 2 : Systemically delivered adipose stromal vascular fraction mitigates radiation-induced gastro-intestinal syndrome by immunomodulating the inflammatory response through a CD11b<sup>+</sup> cell-dependent mechanism**

#### **Objectifs :**

Ce deuxième article s'inscrit dans la continuité de la première étude, afin d'apporter des éléments de réponse quant aux mécanismes d'action de la SVF sur le compartiment immunitaire. Le premier objectif était de confirmer la stimulation des monocytes/macrophages présents dans la lamina propria et leurs modifications phénotypiques induites par la SVF et de comprendre le rôle de l'immunité de l'hôte dans l'efficacité thérapeutique de la SVF. La SVF ayant une composition cellulaire hétérogène le deuxième objectif était d'apporter des premiers éléments de réponse sur le rôle joué par certains des composants, notamment les monocytes de la SVF dans l'efficacité thérapeutique de la SVF; cet axe n'a pas encore été largement étudié dans la littérature.

#### **Résultats :**

Le traitement des souris par la SVF module les populations de leucocytes au cours du temps. Une augmentation significative des cDC2 (CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>) contribuant à la réponse Th2 a été observée dès 24 heures post-irradiation au niveau de la muqueuse intestinale. De plus, il a été observé que la SVF induisait une diminution des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> à 7 jours post-irradiation. Une augmentation de l'expression de l'IL-22, une cytokine signature des « innates lymphoid cells 3 » (ILC3) impliquée dans l'homéostasie de la crypte intestinale a été observée après le traitement par la SVF. La caractérisation phénotypique du pool de monocytes au niveau de la lamina propria a montré que la SVF amplifie la population de monocytes pro-inflammatoires CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup> dans la lamina propria 3 jours post-irradiation et accélère la différenciation de ces monocytes vers un phénotype de monocytes/macrophages Ly6C<sup>-</sup>MCHII<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> à 7 jours post-irradiation. L'augmentation de ce pool de monocytes/macrophages permet la restauration de la population de macrophage F4/80<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> à 7 jours

post-irradiation. L'analyse de l'expression génique des cellules immunitaires de la lamina propria montre une augmentation de l'expression de marqueurs associés au macrophage de type M2 et de l'expression d'IL-10 orientant ainsi la réponse immunitaire vers une réponse immunomodulatrice. De plus, l'augmentation de l'expression de CSF1 et CSF-1R par la SVF suggère l'existence d'interactions entre le compartiment cellule souche et les cellules immunitaires pour le maintien de l'homéostasie de la crypte intestinale.

L'utilisation de souris KO CX3CR1 a montré que l'irradiation abdominale induit des dommages plus importants chez ces souris caractérisés par une létalité totale à 9 jours post-irradiation et une absence de réparation du compartiment cellule souche malgré le traitement par la SVF. De façon surprenante, la présence de cellules de Paneth anormales chez ces souris a été observée après le traitement à la SVF. L'analyse phénotypique des monocytes de la lamina propria révèle une diminution de la présence des monocytes CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup> et un défaut de leur maturation en monocytes/macrophages Ly6C<sup>-</sup>MCHII<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> et de restauration du pool de macrophages.

La SVF contient une quantité non négligeable de monocytes et de macrophages, leur influence sur l'atténuation du SGI a été examinée. Ainsi la déplétion en cellules CD11b de la SVF a entraîné une diminution significative de l'efficacité thérapeutique avec un taux de survie de seulement 30 % à 10 jours post-irradiation par rapport aux souris traitées à la SVF avec 70% de survie à 10 jours. La déplétion en CD11b de la SVF n'induit pas la restauration du compartiment cellule souche et du pool de macrophages.

### **Conclusion :**

Dans cette étude, à notre connaissance, nous avons rapporté pour la première fois que le traitement par la SVF induit un effet immunomodulateur du SGI. La SVF agit à plusieurs niveaux en augmentant le pool de monocytes pro-inflammatoires Ly6C<sup>+</sup>/CCR2<sup>+</sup> dans l'intestin et en accélérant leur maturation vers un monocyte-macrophage capable de promouvoir le processus anti-inflammatoire et la réparation du compartiment cellule souche. Nous avons montré que la coopération entre le monocyte de la SVF et le monocyte de l'hôte est nécessaire pour assurer l'efficacité de la SVF pour le SGI.



**Systemically delivered adipose stromal vascular fraction mitigates radiation-induced gastro-intestinal syndrome by immunomodulating the inflammatory response through a CD11b<sup>+</sup> cell-dependent mechanism**

Lydia Bensemmane<sup>1</sup>, Fabien Milliat<sup>1</sup>, Xavier Treton<sup>2</sup>, Christine Linard<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-SANTE/SERAMED/LRMed, F-92260, Fontenay-aux-Roses, France.

<sup>2</sup> Institut des MICI, 92200 Neuilly, France

**Running title: Immunomodulation of SVF in intestinal radiation syndrome**

**Corresponding author:** Christine Linard

Institute of Radiological Protection and Nuclear Safety, Laboratory of Medical Radiobiology, Fontenay-aux-Roses, France

Telephone: +33 1 58 35 91 86 Fax: +33 1 58 35 84 67

e-mail: [christine.linard@irsn.fr](mailto:christine.linard@irsn.fr)

## **Abstract**

### **Background**

Stromal vascular fraction (SVF) treatment promoted the regeneration of the intestinal epithelium, limiting lethality in a mouse model of radiation-induced gastrointestinal syndrome (GIS). The SVF has a heterogeneous cell composition; the effects between SVF and the host intestinal immunity are still unknown. The specific role of the different cells contained in the SVF needs to be clarified. Monocytes-macrophages have a crucial role in repair and monocyte recruitment and activation are orchestrated by the chemokine receptors CX3CR1 and CCR2.

### **Methods and Results**

Mice exposed to abdominal radiation (18 Gy) received a single intravenous injection of stromal vascular fraction (SVF) ( $2.5 \times 10^6$  cells), obtained by enzymatic digestion of inguinal fat tissue, on the day of irradiation. Using flow cytometry, we showed that SVF treatment modulated intestinal monocyte differentiation at 7 days post-irradiation by very early increasing the CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup> population in the intestine ileal mucosa and accelerating the phenotype modification to acquire CX3CR1 in order to finally restore the F4/80<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> macrophage population. In CX3CR1-depleted mice, SVF treatment fails to mature the Ly6C<sup>-</sup>MCHII<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> population, leading to a macrophage population deficit associated with proinflammatory environment maintenance and defective intestinal repair; this impaired SVF efficiency on survival. Consistent with a CD11b<sup>+</sup> being involved in SVF-induced intestinal repair, we showed that SVF-depleted CD11b<sup>+</sup> treatment impaired F4/80<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> macrophage pool restoration and caused loss of anti-inflammatory properties, abrogating stem cell compartment repair and survival.

### **Conclusion**

These data showed that SVF treatment mitigates the GIS-involving immunomodulatory effect. Cooperation between the monocyte in SVF and the host monocyte defining the therapeutic properties of the SVF is necessary to guarantee the effective action of the SVF on the GIS.

**Key words:** Stromal Vascular Fraction, intestine, irradiation, monocyte

## Background

The gastrointestinal (GI) system rapidly develops some proliferating and differentiating cells, which make it one of the most radiosensitive organs. Exposure to high doses of ionizing radiation disrupts the GI system by damaging proliferating stem cells of the crypts, which alters the histology and physiology of the intestine. Acute exposure to ionizing radiation can cause lethal damage to the gastrointestinal tract. To date, there are no Food and Drug Administration-approved agents available to mitigate radiation-induced intestinal injury (1, 2). The injection of autologous stem/progenitor cells is emerging as a therapeutic option in gastrointestinal syndrome (GIS). Accordingly, we recently reported that the stromal vascular fraction (SVF) obtained from enzymatically digested adipose tissue promoted the regeneration of the intestinal epithelium, limiting lethality in a mouse model of radiation-induced GIS (3). SVF is a dynamic and heterogeneous cell population that contains mesenchymal-like stem/stromal cells (MSC), endothelial progenitor cells (EPC), pericytes and hematopoietic and immune cells, all of which perform distinct biological functions (4).

At this time, SVF manufacturing processes for clinical use are performed in compliance with good manufacturing practices and well-defined, appropriate and harmonized release acceptance criteria (4). Historically, MSCs are the cell subset of interest in the regenerative ability of adipose tissue. Their involvement in the biological mechanisms of SVF has been extensively studied in the context of wound healing, angiogenesis, and scar remodeling (5). Except for a few papers reporting the involvement of macrophages in angiogenesis (6,7), the role of leukocytes and the importance of their presence are not fully clarified. Previous studies have shown the key role played by immune cells like macrophages in crypt regeneration. Indeed, the depletion of host macrophages or the inhibition of macrophage derived Wnt impaired recovery from radiation injury with loss of ISC, resulting in poor survival (8, 9). Macrophages play an important role in coordinating signals from gut microbes and injured epithelium, and thereby transmit regenerative signals to ISC (10). In intestine, a substantial fraction of macrophage derives from circulating monocytes, which are constantly replenished to maintain the macrophage pool (11). Monocytes were known to generate a cytokine storm leading to tissue damage but were also shown to induce regulatory functions during the inflammatory process (12). In the mouse, inflammatory monocytes are short-lived and express a high level of CCR2 and Ly6C (also called inflammatory or classical monocytes) and exhibit

antimicrobial activity. These inflammatory monocytes are precursors of longer-lived patrolling monocytes (also called nonclassical or resident monocytes) by undergoing gradual phenotypic and transcriptional changes. In the intestine, incoming monocytes are Ly6C<sup>+</sup>MCHII<sup>-</sup> cells, differentiating via Ly6C<sup>+</sup>MCHII<sup>+</sup> intermediates into Ly6C<sup>-</sup>MCHII<sup>+</sup> monocytes that gain high expression of CX3CR1 (11). The Ly6C<sup>hi</sup> classical monocytes are selectively recruited to inflamed tissues in a CCR2-dependent manner, where they produce inflammatory and antimicrobial factors and contribute to local and systemic inflammation (13). Ly6C<sup>-</sup>CX3CR1<sup>+</sup> monocytes are present in both resting and inflammatory tissues and are often found attached to or crawling on the luminal wall of the endothelium. (14). Evidence indicates that nonclassical monocytes perform a specialized form of immune homeostasis, serving as initiators of acute inflammatory responses and substantially contributing to tissue remodeling (15,16).

The aim in this work is to understand the involvement of monocytes in the efficiency of SVF treatment for the GIS. We showed that mitigation of the irradiation effect was conferred both by the SVF inducing a dynamic of host monocyte phenotype modification and by the SVF-derived monocytes acting as a potential important cell mediating SVF efficacy.

## **Material and Method**

### **Mice**

Eight-week-old male C57BL/6JRj mice were purchased from Janvier (Le Genest Saint Isle, France), CX3CR1<sup>GFP/GFP</sup> knock-out mice from the Jackson Laboratory have the endogenous locus disrupted by the insertion of sequence encoding green fluorescent protein (GFP), replacing the first 390 bp of the coding exon (exon 2) of the chemokine (C-X3-C motif) receptor 1 (Cx3cr1) gene. The animals were housed in the IRSN animal facilities, which are accredited by the French Ministry of Agriculture for performing experiments on rodents. The animal experiments were performed in compliance with French and European regulations on the protection of animals used for scientific purposes (EC Directive 2010/63/EU and French Decree 2013–118). All experiments were approved by the Ethics Committee #81 and authorized by the French Ministry of Research (under the reference APAFIS#10434-2017062814437026-v1). In this study, the experimental protocol was in line with standard support treatment

recommended for patients presenting an acute radiation syndrome (17). Thus, the antibiotic Avemix (8g/L) will be combined with all treatments throughout the experimentation process.

### **Irradiation procedure**

Mice were irradiated under anesthesia (with a continuous flow of 1.5% isoflurane in oxygen) on a medical linear accelerator (Elekta synergy®) delivering 4MVp X-rays (mean photon energy about 1.3 MeV). Reference dosimetry measurements were performed using a 0.125cc cylindrical ionisation chamber calibrated in dose to water in a mouse equivalent tissue phantom placed on a plexiglass support. A dose rate of about 2.5 Gy/min in dose to water was used. A localized 2 cm larger abdominal irradiation window containing intestine was chosen to limit upper thorax, head and neck, lower and upper extremity exposure. The mice were exposed to 18 Gy as the sublethal optimal irradiation dose for SVF-related effects. The uncertainty of the dose rate measurement was about 5% at k=2.

### **Isolation of SVF**

Stromal vascular fraction (SVF) cells were isolated from inguinal fat pad adipose tissue samples of 12-week-old C57BL/6JRj mice donors. Briefly, as previously reported (3), the fat pads were excised, finely cut and incubated in a digestion medium containing 0.1% type I collagenase (Sigma-Aldrich, France), 1% penicillin-streptomycin in MEM- $\alpha$  medium by gentle shaking for 20 min at 37°C. The samples were mechanically disrupted using the gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec) and then digested again in MEM- $\alpha$  0.1% type I collagenase medium, followed by mechanical disruption using the gentleMACS Dissociator. The cell suspension was filtered sequentially through 100 and 70  $\mu$ m cell strainers and centrifuged (400g, 10 min) to spin down stromal-vascular fraction cell pellets. The pellets were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) for i.v. injection. The mice received  $2 \times 10^6$  cells in 100 $\mu$ l PBS 4 hours post-irradiation.

### **Magnetic Depletion of SVF Cell Isolates**

The depletion experiments used the Miltenyi MACS system (Miltenyi Biotec, France) according to the manufacturer's instructions. In brief, up to  $1 \times 10^7$  screened SVF cells were suspended in 90  $\mu$ l of MACS buffer (PBS, 0.5% BSA 2 mM EDTA) and incubated with 10  $\mu$ l of anti-mouse CD11b antibody conjugated to iron particles (Miltenyi Biotec) at 4°C for 10 minutes. An additional 1 ml of MACS buffer was added to the cell suspension and loaded 0.5 ml at a time

onto a Miltenyi Biotec MACS column prewetted with 0.5 ml of MACS buffer within the magnet chamber. The cell-loaded column was gravity drained and then flushed with 0.5 ml of MACS buffer at least 3 times to remove any additional cells. The effluent was collected and considered to be the CD11b<sup>+</sup>-depleted SVF.

### **Isolation of mononuclear cells from lamina propria**

To isolate mononuclear cells, extraintestinal fat tissue was carefully removed and ileum was then flushed of its luminal content with PBS, opened longitudinally and cut into 1 cm pieces on ice. Epithelial cells and mucus were removed by 20 min incubation in predigestion solution: HBSS (without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>) containing 5% FBS, 5 mM EDTA, 1mM DTT by gentle shaking at 37°C. Then, ileum pieces were vortexed 10s and filtered through 100 µm cell strainers. Ileum pieces were again incubated in the predigestion solution 20 min by gentle shaking at 37°C, then vortexed 10s and filtered through 100 µm cell strainers. Ileum pieces were transferred into the gentleMACS C Tube (Miltenyi Biotec) containing the enzyme mix (Lamina Propria Dissociation Kit mouse, Miltenyi Biotec) and incubated for 30 minutes at 37 °C under continuous rotation. Then, the isolated cell suspension was obtained by running in gentleMACS Dissociator and filtered through 100 µm cell strainers. Cells were centrifuged for 5 min at 300g, resuspended in PBS and used for the subsequent analysis.

### **Flow cytometric analysis**

Flow cytometry was performed using the BD FACSCanto II and analysed with FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR). Dead cells were excluded through Fixable Viability Dye eFluor staining (eBioscience). Non-specific antibody binding was blocked with an anti-CD16/32 (Mouse Fcγ block clone 2.4G2). The cells were incubated for 30 min in a total of 100 µl PBS with conjugated antibodies from BD Biosciences (France): Panel T: anti CD45 (V500 conjugated; clone 30-F11); anti CD3 (FITC conjugated; clone 145-2C11); CD4 (PerCP-Cy5.5 conjugated; clone RM4-5); CD8 (PE-Cy7 conjugated; clone 53-6.7). Panel DC: anti CD45 (V500 conjugated; clone 30-F11); anti CD11c (PE conjugated; clone HL3); CD11b (BV421 conjugated; clone M1/70); CD103 (PerCP-Cy5.5 conjugated; clone M290). Panel neutrophil-monocyte-macrophage: anti CD45 (V500 conjugated; clone 30-F11); CD11b (BV421 conjugated; clone M1/70); anti Ly6G (PE conjugated, clone 1A8); anti Ly6C (FITC conjugated for WT mice or PE for CX3CR1<sup>GFP/GFP</sup> mice; clone AL-21); anti MCHII (PerCP-Cy5.5 conjugated; clone

M5/114.15.2); anti F4/80 (Alexa Fluor 647 conjugated; clone T45-2342); from Biolegend (France) anti CX3CR1 (PE-Cy7 conjugated; clone SA011F11) and anti CCR2 (Alexa Fluor 647 conjugated; clone SA203G11). Panel for intestinal stem cell from BD Biosciences (France): anti EpCam (FITC conjugated; clone G8.8); anti CD44 (PE-Cy5.5 conjugated; clone IM7), anti CD24 (BV421 conjugated; clone M5E2); from eBioscience: anti CD166 (PE conjugated, clone eBioALC48). Isotype-matched antibodies were used for control staining. All antibodies were used at 1:100 dilution. The concentration of cell suspensions was adjusted to  $1 \times 10^6$  cells per 100 $\mu$ l.

### **Immunohistology**

Sections 5- $\mu$ m thick were de-paraffinized and re-hydrated. A pretreatment method using heat-induced epitope retrieval was used and the nonspecific binding was blocked with a protein blocker (DakoCytomation, Trappe, France) 30 min at room temperature (RT). For immunofluorescence, the sections were then incubated with the following primary antibodies against: Ki67 (ab15580; Abcam), EpCam (clone G8.8; Biolegend), CD24 (ab64064; Abcam), Lysozyme (ab108508; Abcam), Ly6C (ab15627; Abcam), CX3CR1 (ab8021; Abcam), F4/80 (Ab6640; Abcam), GFP-FITC (Ab6662; Abcam). Co-labelling with antibodies from the same species was performed using Opal™ Multiplex IHC kits (Akoya). After incubation with primary antibodies, slides were washed in PBS-T three times and probed with appropriate fluorescence-conjugated secondary antibodies one hour at room temperature. After three washes in PBS cell, nuclei were counterstained by Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Laboratories).

For MPO immunohistochemistry, endogenous peroxidase was blocked with 3% hydrogen peroxide for 10 min and nonspecific binding was blocked with the protein blocker. After antigen retrieval, sections were incubated in primary rabbit anti-MPO (ab9535, Abcam). The EnVision<sup>+</sup> System-horseradish peroxidase (HRP) (DakoCytomation) was used as the secondary reagent for all immunostaining sections. The color reaction was developed with the NovaRED™ kit (Vector Laboratories) and counterstained with Mayer's hemalun.

Digital photographs were taken at x20 magnification (Zeiss Axiolmager microscope) and intestinal sections were examined using Archimed software.

## **Real-time PCR analysis**

Total RNA was extracted from ileum and spleen cells with the RNeasy Mini kit (Qiagen), and cDNA was prepared with the SuperScript RT Reagent Kit (Applied Biosystems). Real-time PCR was performed on an ABI Prism 7900 Sequence Detection System. All Taqman primers and probes came from Life Technologies (France). The amounts of loaded cDNA were normalized to GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) housekeeping gene as an endogenous control. For relative quantification, the comparative threshold cycle (Ct) method was used, and the delta Ct comparison was used to compare gene expression in cells and tissues. Individual data ( $-\Delta\Delta\text{Ct}$ ) were presented to comply with BJP guidelines (18). Fold induction was calculated as  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  for the Arg1/Inos ratio.

## **Statistics**

Mice survival/mortality in different treatment groups was analyzed by Kaplan–Meier statistics as a function of SVF efficiency using GraphPad Prism-8.0 software. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. We used one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) and then a Tukey post-test to determine the significance of differences. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

## **Results**

### **SVF treatment modulated intestinal leucocyte population**

To investigate the influence of abdominal irradiation on the intestinal immune cell population and SVF treatment, analysis of immune cell population isolated from the lamina propria was performed by flow cytometry on wild-type (WT) mice. Firstly, irradiation induced a significant increase of the neutrophil population at day 3 (43-fold;  $p < 0.001$ ) and day 7 (24-fold;  $P < 0.001$ ) as compared with non-irradiated mice. SVF treatment did not modify the elevation of neutrophil population induced by irradiation at days 3 and 7 (Fig. 1A). Strong neutrophil infiltration was confirmed through staining of myeloperoxidase positive (MPO<sup>+</sup>) cells, mainly localized near the lumen of the intestine, as well as in irradiated mice and in irradiated-SVF treated mice (Fig. 1B). For the CD T helper population, flow cytometry analysis showed a significant increase of the CD4<sup>+</sup> population and a decrease of the CD8<sup>+</sup> population from day 1 post-irradiation and inversely a decrease of the CD4<sup>+</sup> population and an increase of the CD8<sup>+</sup>



population at day 7 post-irradiation. SVF treatment only normalized the CD8<sup>+</sup> population at day 7 (Fig. 1C).

Next, we analyzed the conventional dendritic cell (cDC) subset population, which is thought to arise from a common DC progenitor, cDC1 (CD11b<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>) and cDC2 (CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>). It is of note that cDC1 were involved in maintaining not only IFN- $\gamma$  expression from T cells, but also an expression of IFN- $\gamma$  inducible genes from epithelial cells (19). SVF treatment normalized the elevation of cDC1 population induced by irradiation at day 7. On the other hand, the cDC2 population is essential for the induction of primary T cell responses in the mucosa (20). We observed that SVF treatment enhanced significantly the cDC2 population (2.4-fold;  $p < 0.01$ ) from day 1, which remains elevated on day 7 as compared with irradiated mice (Fig. 1D). As cDC2 contributes to Th2-associated responses (20), we analyzed the mRNA level of cytokines from isolated lamina propria cells. Firstly, overexpression of IL-1 $\beta$  and IL-1Rn was observed at 3 days post-irradiation as compared with control mice, which was reduced by SVF treatment (Fig. 1E). Related to Th1 cytokines, overexpression of IFN- $\gamma$  and IL-23a was observed at 3 days and repression at 7 days in irradiated mice as compared with control mice. SVF treatment normalized their expressions on days 3 and 7.

In addition, IL-22 is produced by T cells and innate lymphoid cells and contributed in both to intestinal barrier function in response to microbiota (21) and to the epithelial and the Transit-Amplifying Cells proliferation (22). Overexpression of IL-22 occurred at day 3, which did not persist at day 7 in irradiated mice; it is noteworthy that SVF treatment maintains IL-22 expression significantly enhanced at day 7 ( $p < 0.001$ ) compared with irradiated mice (Fig. 1E). Together, these data showed that SVF treatment reduced the inflammatory process and limited the Th1 response.

### **SVF treatment modulated intestinal monocyte differentiation**

As different subsets of monocytes are present during intestinal inflammation (Desalegn G, 2019) and as the monocytes can have a protective role in organ damage, notably by activating T cells and innate lymphoid cells (16, 23), we determined the kinetics of monocyte differentiation after irradiation and in cases where SVF treatment modulated the phenotypic differentiation in the lamina propria. According to previous reports (14), when monocytes

enter the tissues from the circulation, they are thought to gradually change their phenotype by losing the CCR2 and can be split into three distinct subpopulations in the small intestine based on expression of Ly6C and MCHII: Ly6C<sup>+</sup>MCHII<sup>-</sup>, Ly6C<sup>+</sup>MCHII<sup>+</sup>, and Ly6C<sup>-</sup>MCHII<sup>+</sup> cells, which can be further divided based on expression of CX3CR1 into CX3CR1<sup>int</sup> and CX3CR1<sup>+</sup> cells and definite as CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>MCHII<sup>-</sup> (P1), Ly6C<sup>-</sup>MCHII<sup>+</sup>CX3CR1<sup>int</sup> (P2), Ly6C<sup>-</sup>MCHII<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> (P3). Consistent with this, flow cytometry analysis of the monocyte population isolated from the lamina propria showed that the CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup> and the P1 populations picked up significantly (5 and 13-fold, respectively) at day 3 post-irradiation as compared with non-irradiated mice (Fig. 2B). SVF treatment increased very early the CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup> population (15-fold, p<0.05) at 1 day and maintained an increase of both CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup> and P1 populations at 3 days post-irradiation as compared with non-irradiated mice. The differentiation process occurred at day 7 with a loss of Ly6C; a significant increase of the P2 population (15-fold; p<0.001) was observed in irradiated mice as compared with non-irradiated mice (Fig. 2C). SVF treatment enhanced the P2 population about 4 and 3-fold as compared with control and irradiated mice, respectively. When disappearance of the P3 population (p<0.001) was observed at 7 days post-irradiation as compared with non-irradiated mice, SVF treatment restored the percentage of it as compared with non-irradiated mice. Double immunostaining of Ly6C/CX3CR1 showed the presence of a few Ly6C<sup>+</sup> cells and CX3CX1<sup>+</sup> cells, which are located at the base of the crypts in control mice (Fig. 2D). Seven days post-irradiation, the Ly6C<sup>+</sup> cells were predominantly present in the ileum. After SVF treatment, an increase in CX3CX1<sup>+</sup> cells were observed, localized in a chain in the lamina propria.

Together, these results showed that SVF treatment increased the entrance of Ly6C<sup>+</sup> monocytes into the ileal mucosa and accelerated the modification of the phenotype within 24 hours after irradiation, leading to the acquisition of CX3CR1.

### **SVF treatment is associated with an accumulation of macrophages in ileum**

Monocyte differentiation into intestinal macrophages involves phenotypic changes with respect to Ly6C, MCHII and CX3CR1 expression, which occurred over 96 hours after monocyte infiltration (11). In this way, flow cytometry analysis of the isolated lamina propria cell population at 7 days post-irradiation showed that the CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>MCHII<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> population remains at a very low level (53% fall) in irradiated mice as compared with non-irradiated mice and that SVF treatment normalized this population at 7 days (Fig. 3A). To confirm the presence

of macrophage, double immunostaining of F4/80 and CX3CR1 was performed and revealed the rare presence of double staining in irradiated mice; conversely, the predominant presence of F4/80-CX3CR1 double staining cells was observed after SVF treatment (Fig. 3B). As these F4/80<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> cells adopted an anti-inflammatory phenotype and produced IL-10 (24) and IL-10 is required for maintaining the tolerogenic capability of CX3CR1<sup>+</sup> macrophages (25), a real-time quantitative RT-PCR was performed on the isolated lamina propria cell population. Firstly, the Arg1/Inos ratio, an indicator of M2/M1 prevalence, revealed M2 predominance induced by SVF treatment, which was confirmed by the CD163 overexpression (4-fold, P<0.05) and MMP9 (3.3-fold, P<0.05) as compared with irradiated mice (Fig. 3C). In addition, SVF treatment restored the level of IL-10 expression (Fig. 3D), suggesting that SVF treatment promoted the induction of a M2-like macrophage.

The proliferation, differentiation, and survival of most resident macrophage populations depends upon signals from the macrophage-colony-stimulating factor receptor (Csf1R) initiated by Csf1 (26). On this basis, we analyzed Csf1R expression for the isolated lamina propria cell population and showed that SVF treatment enhanced (2-fold) and normalized the mRNA levels of Csf1R as compared with irradiated and control mice, respectively; this was linked to the restoration of Csf1 expression as compared with control mice (Fig. 3E).

### **Abdominal irradiation generates more severe damage in mice lacking the CX3CR1 receptor**

It was previously reported that the CX3CR1 receptor is functionally important during sepsis (16), where CX3CR1<sup>+</sup> macrophages play critical roles in dead cell/pathogen clearance, maintenance of immune surveillance and barrier function (27). To investigate the role of CX3CR1 in SVF efficacy in GIS, we used the KO (CX3CR1<sup>GFP/GFP</sup>) mice model. We have previously reported that 65% of the irradiated WT mice died within 10 days, the SVF treatment saved 80% of WT mice from lethality (3). Kaplan-Meier survival analysis revealed that no KO CX3CR1 mice survived beyond 9 days post-irradiation and that SVF treatment delayed total lethality by only 3 days (Fig. 4A). In the KO CX3CR1 mice, double immunostaining of CD24 (marker of the stem cell compartment) and Lysozyme (marker of Paneth cell) showed that irradiation induced destruction of the ileal architecture, with disappearance of the villi where only rare stem cell compartments persisted at 7 days post-irradiation. SVF treatment did not restore the ileal architecture but, surprisingly, we observed an abundant rise in Paneth cells in the stem cell compartment, forming Paneth-like cell hyperplasia (Fig. 4B). As Paneth cell

hyperplasia is frequently associated with severe inflammation (28), we analyzed the IL-1 $\beta$  and IL-6 expression in the KO CX3CR1 mice. We found that overexpression of IL-1 $\beta$  and IL-6 induced by irradiation was maintained despite SVF treatment (Fig. 4C). Together, these data showed that abdominal irradiation in KO CX3CR1 mice inflicts more severe acute damage and that SVF treatment does not abrogate it.

Having observed a difference in SVF efficacy for irradiation-induced injury between WT and KO CX3CR1 mice, we characterized the leukocyte subsets recruited in ileum using the flow cytometry strategy detailed before (Fig. 2A). Firstly, we observed a significant rise in the neutrophil population among the CD45<sup>+</sup> population at steady state in KO CX3CR1 mice compared to WT mice. Irradiation significantly increased the neutrophil population in the KO CX3CR1 mice and SVF treatment maintained this population at a high level (Fig. 5A). Flow cytometry analysis of the monocyte population revealed that the percentage of both Ly6C<sup>+</sup> and Ly6C<sup>-</sup> monocytes was impaired in the control KO CX3CR1 mice as compared with the control WT mice (Fig. 5B) as previously observed in other tissue (29). In KO CX3CR1 mice, irradiation induced an increase of the CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup> (3-fold; P<0.001) and P1 (3.8-fold; P<0.0001) population at 7 days. SVF treatment normalized the CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup> population but maintained the percentage of P1 population at a high level. Irradiation did not modify the P2 and P3 populations as compared with control KO CX3CR1 mice and it is of note that SVF treatment did not enhance these 2 populations as compared with irradiated KO CX3CR1 mice. The absence of P3 population maturation by SVF treatment was linked to the low presence of the Ly6C<sup>-</sup>MCHII<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> population, which was confirmed by the F4/80<sup>+</sup> immunostaining (Fig. 5C). Our results showed that the CX3CR1 deficiency impaired both the CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup> populations in the intestine. SVF treatment did not enhance the P3 and Ly6C<sup>-</sup>MCHII<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> populations, leading to maintenance in a higher proinflammatory environment and intestinal damage. Thus, we have shown that CX3CR1 is crucial to SVF efficiency.

### **CD11b-depleted SVF alters GIS mitigation**

As monocytes/macrophages play a crucial role in the resolution of inflammation and repair and the SVF contains monocytes, we examined whether the presence of monocytes in the SVF are critical for SVF-inducing GIS mitigation. Firstly, injection of the SVF isolated from GFP-mice to explore the cells homing in the intestine showed through GFP immunostaining the presence

of GFP cells located essentially in the Peyer's patches at day 1 post-irradiation. At day 7, the GFP cells were still present in the Peyer's patches but were also visible near the base of the crypts (Fig. 6A). Flow cytometry analysis to define the monocyte proportion in our SVF preparation (Fig. 6B) indicated that the SVF contained  $73\% \pm 2\%$  of CD45<sup>-</sup> cells and  $25\% \pm 2\%$  of CD45<sup>+</sup> cells. The CD11b<sup>+</sup> represented  $71\% \pm 7\%$  of the cell population among CD45<sup>+</sup> cells with  $6.9\% \pm 1.5\%$  of CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> and  $76.0\% \pm 2.0\%$  of CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup> cells. Firstly, we observed that the treatment with the CD11b-depleted SVF (SVF without CD11b) was lethal in 70% of mice, whereas 70% of mice treated with SVF survived at 20 days post-irradiation (Fig. 6C). To find out whether the SVF without CD11b treatment impacts the proliferation of cells in the stem cell compartment of the ileal crypts, double immunostaining of CD24/Ki67 was carried out. As we have previously shown (3), SVF treatment in irradiated mice increased the number of double CD24/Ki67 positive cells in the crypts, with a large expansion of Ki67<sup>+</sup> cells in the transit amplification compartment (TA) (Fig. 6D). SVF treatment without CD11b did not induce an increase of the Ki67<sup>+</sup> cells in the stem cell compartment. Double immunostaining with the CD24/Lysozyme confirmed that the SVF without CD11b did not restore the stem cell compartment. Using fluorescence-activated cell sorting, analysis of the epithelial cell population by EpCAM showed that at day 7 post-irradiation the EpCAM<sup>+</sup> population was significantly decreased ( $p < 0.001$ ) as compared with control mice. The SVF without CD11b treatment did not significantly restore the EpCAM<sup>+</sup> population as observed in the SVF treatment (Fig. 6E). To confirm the immunostaining analysis of the SVF and the SVF without CD11b treatment on the stem cell compartment, we used the flow cytometry combination previously reported (30) to identify intestinal stem cells (ISCs) with CD44, a select intestinal epithelial crypt cell marker, CD24 and CD166 excluding transient-amplifying and some progenitor cells. A significant decrease of CD44<sup>+</sup>CD166<sup>med</sup>CD24<sup>med</sup> population (4-fold,  $P < 0.001$ ) was observed at 7 days post-irradiation as compared with control mice. SVF treatment enhanced significantly (3-fold;  $p < 0.001$ ) this population as compared with irradiated mice, whereas SVF without CD11b treatment was not effective on this population.

We next examined the effect of SVF without CD11b treatment on immune cell population at day 7 post-irradiation. Unlike SVF treatment, flow cytometry analysis showed that SVF without CD11b significantly decreased the neutrophils and the cDC2 population and enhanced the CD8<sup>+</sup> induced by irradiation ( $P < 0.001$ ) in the lamina propria (Fig. 7A). Very interestingly, SVF

without CD11b treatment reduced significantly the CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup>, P2 and P3 population as compared with SVF treatment, resulting in absence of restoration of the CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>MCHII<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> population (Fig. 7B). Real time PCR analysis revealed the maintaining of the IL-1 $\beta$  and IL-6 overexpression in ileum of SVF without CD11b treated mice comparable to irradiated mice despite overexpression of IL-1 $\alpha$  (Fig. 7C). Together, these findings showed that in the absence of the CD11b<sup>+</sup> population in the SVF, the treatment loses its efficiency for stem cell compartment restoration, reducing survival. The presence of the CD11b<sup>+</sup> population in the SVF enabled an increase of the Ly6C<sup>+</sup> pool in the intestine, which finally restored the pool of macrophage population in the intestine.

## Discussion

The use of SVF from adipose tissue is safe, easily accessible, and compatible with rapid therapeutic countermeasures. Our previous study investigated treatment with SVF to mitigate the GIS (3). We showed that the intravenous injection of SVF stimulated the regeneration of the epithelium and restored the cell populations in the ISC compartment, increasing survival. Furthermore, due to its heterogeneous cellular composition and the still unknown effects between SVF and the host tissue and the specific role of the cells contained in the SVF, defining the mechanisms of therapeutic efficacy is a challenge. As we previously identified an anti-inflammatory potential of the SVF for the GIS (3) we firstly focused this work on the SVF role in the host immune cell pool and phenotype. Our results unveiled a key role of monocytes in the efficiency of SVF. Unexpectedly, SVF treatment enhanced the number of inflammatory CCR2<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> classical monocytes in the intestine. Previous studies reported the unsuspected role of inflammatory monocytes in controlling inflammation of abdominal disease (12). Because intestinal resident macrophages were non-proliferative, in inflammatory condition they were continuously replenished from inflammatory CCR2<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> classical bone marrow-derived monocytes; this demonstrates the crucial role of CCR2<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> monocytes for maintaining the adult tissue-resident F4/80<sup>hi</sup>MCHII<sup>hi</sup> macrophage pool in the intestinal lamina propria (11). We showed that SVF treatment not only increased the CCR2<sup>+</sup> monocyte pool in the intestine but accelerated the monocyte differentiation to Ly6C<sup>-</sup> non-classical monocytes through a well-known series of intermediaries (11) into proresolving macrophages by down-regulating Ly6C, acquiring MCHII expression and upregulating CX3CR1 and finally F4/80 expression. We observed an increase in the presence

of P2 and P3 monocytes as early as one day post-irradiation in irradiated SVF-treated mice, while only the P2 population appeared at day 7 in irradiated mice. In a model of Ly6C<sup>+</sup> monocytes adoptive transfer, the appearance of a Ly6C<sup>-</sup>MCHII<sup>+</sup>CX3CR1<sup>int</sup> (P2) population was observed at day 2 in the inflamed intestine (14). This suggests that SVF treatment alleviated rapidly the irradiation-induced blockage of monocyte differentiation into P2 and P3 phenotype. In the inflamed intestine, the maturation process of the P2 population was interrupted from progressing to P3 monocyte by inflammatory signals (11). The balance shifts more towards an accumulation of Ly6C<sup>int</sup>CX3CR1<sup>int</sup> cells that retain their pro-inflammatory capacity by the secretion of inflammatory cytokines, including IL-12, IL-23 and IL-1 $\beta$ , thereby promoting type 1 T helper (TH1) and aggravating tissue damage. In this study, we observed that the progression of monocyte differentiation into P3 monocyte promoted by SVF treatment as early as 1-day post-irradiation was linked to down-repression of IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  and IL-23. Note that it was very recently suggested that the inflammation does not seem to block monocyte differentiation, but rather drive monocytes to adopt an inflammation-specific expression profile immediately upon entry into tissue (14). The transcriptional profile of monocytes induced by SVF treatment will be further determined.

The Ly6C<sup>-</sup>MCHII<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> macrophage dampened inflammation and promoted tissue repair. As shown by both flow cytometry and immunostaining analysis, SVF treatment restored the macrophage pool in the intestine, which was linked to phenotypical marker expression of M2 macrophages (Arg1, CD163 and MMP9) and upregulation of IL-10 expression, markers of proresolving macrophages. In the context of an inflamed tissue micro-environment, the inflammatory monocyte population failed or delayed efficient transition to F4/80<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> macrophages (24), as we observed in irradiated mice. It is noteworthy that macrophages adopt and converse their distinct functional phenotypes in response to the micro-environment. Anti-inflammatory macrophages are known to be induced by Th2-associated responses (31); at a very early stage, SVF treatment limited the Th1 response, which may also promote the acceleration of macrophage maturation. In addition, CSF-1 signaling is also required for differentiation and maturation of macrophages from monocytes, but also survival of both monocytes and macrophages. A blocking anti-CSF1R antibody induced complete depletion of the macrophage population in the intestine, which disturbs crypt homeostasis with aberrant Paneth cell differentiation and reduction of Lgr5<sup>+</sup> stem cells.

This demonstrated the role of CSF1R-dependent crypt-associated macrophages in the control of stem cell niche maintenance (32). SVF treatment restored the CSF1R-CSF1 expression, which could also contribute to stem cell compartment restoration.

It was previously shown that CCR2 is required for monocyte migration from the blood into the intestine (14) and CX3CR1 deficiency is linked to increased mortality after LPS injection (27). Also, the severity of DSS-induced colitis in mice could be limited by the transfer of CX3CR1-macrophages (33). Importantly, Chousterman *et al.* showed that CX3CR1 deficiency reduces the adhesive properties of Ly6C<sup>high</sup> monocytes to endothelium in a kidney damage model during sepsis (16), demonstrating that the CX3CR1 receptor is involved in monocyte adhesion to the vascular wall; its absence leads to a reduction in inflammatory monocyte adhesion. In this study, using KO CX3CR1 mice, we found that irradiation induced a more severe disease, since 100% lethality was observed at day 9 post-irradiation and SVF treatment had no rescue effect. Particularly, in KO CX3CR1 mice SVF treatment did not limit the inflammatory response or restore the intestinal architecture. Note that the Paneth cell number per crypt remains high in KO CX3CR1 mice after irradiation in the same manner, with and without SVF treatment compared with control mice, while the Paneth cell number was reduced in irradiated WT mice (3). Paneth cell hyperplasia has been linked to adaptive response of inflamed tissues, to protect the site against infections. However, this response can be negative in KO CX3CR1 mice as these hyperplastic cells contribute to an ill-adapted response to inflammation and in the long term to tumorigenesis through the secretion of growth factors (34). Our findings showed that in KO CX3CR1 mice, firstly in steady state, the CCR2<sup>+</sup> monocyte population remained low as compared with WT mice. Although irradiation increased the CCR2<sup>+</sup> monocyte population in the intestine, Ly6C<sup>-</sup> differentiation remains blocked; SVF treatment did not abrogate this blockage. These observations strengthen the previous study showing that Ly6C<sup>+</sup> monocyte recruitment has a beneficial role against damage *via* a CX3CR1-dependent mechanism (16). Consistent with this, we showed that CX3CR1 interaction was necessary for SVF efficacy.

Faced with the importance of monocytes in SVF efficiency for GIS and the fact that SVF contains a non-negligible amount of monocytes and macrophages, their influence on GIS mitigation was considered. Our SVF preparation contains a proportion of monocytes similar to human SVF preparation (4) and rodent adipose SVF isolation (35). It was previously reported that CD14<sup>+</sup> cells contained in the human SVF induced *in vivo* a robust angiogenesis where the



angiogenesis function induced by SVF CD14<sup>+</sup> cells was higher than that induced by SVF-derived MSCs (7) and CD11b<sup>+</sup> cells are required for the vascular function of SVF in inflamed tissue conditions (35), suggesting that the presence of different cell types in the SVF might be beneficial. These observations may confirm the key role of monocytes in repair. Our findings showed that SVF lost its efficiency for survival and anti-inflammatory properties when the CD11b<sup>+</sup> cells were depleted from the SVF, abrogating stem cell compartment restoration. Our SVF isolation contains about 18% of CD11b<sup>+</sup> among the total life cells, with a prevalence of Ly6C<sup>-</sup> monocytes (76%). SVF depletion, in particular of CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup> monocytes, significantly reduced CCR2<sup>+</sup> monocyte recruitment, which led to defective Ly6C<sup>-</sup> monocyte maturation, impairing the restoration of the Ly6C<sup>-</sup>MCHII<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> macrophage pool. This demonstrated the fundamental role played by CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup> monocytes in SVF efficiency and the interplay between SVF monocytes and host monocyte populations.

Very interestingly, Ly6C<sup>-</sup>CX3CR1<sup>+</sup> monocytes have been demonstrated to be a source of potent neutrophils activators, facilitating their recruitment (36). Inversely, different models of neutropenia have provided evidence that monocyte extravasation and macrophage function, notably their antimicrobial activity, depends on neutrophils and their secretion product (37). An *in vivo* imaging study revealed that while migrating within microvasculature, monocytes and neutrophils undergo cell-cell contact, whose interactions are increased by inflammation (36). Here, we observed that in WT mice SVF treatment maintained the neutrophil recruitment induced by irradiation at day 7 in the intestine and, in addition, the decrease of both Ly6C<sup>+</sup> and Ly6C<sup>-</sup> monocyte populations seen with SVF without CD11b was linked to a decrease in neutrophil population recruitment. These observations may give rise to the hypothesis that neutrophil-monocyte interactions are probably required for SVF efficiency. In the past, neutrophils have been generally linked to the exacerbation of tissue injury through ROS release, but recent work revealed that neutrophil-monocyte cooperation performs key liver repair functions, with ROS-triggered macrophage skewing toward a reparative phenotype (38). An essential role of neutrophil was recently reported in a TLR5 mitigation of a lethal acute radiation sickness (39). In the intestine, excessive neutrophil transmigration created a hypoxic niche in the inflamed area, enhancing epithelial barrier function by increasing the survival of goblet cells, which can form a mucus layer protecting the luminal bacteria (40).

Earlier in this study, to our knowledge, we reported for the first time that SVF treatment mitigates the GIS-involving immunomodulatory effect. SVF acts at several levels by increasing the CCR2<sup>+</sup>/Ly6C<sup>+</sup> monocyte pool in the intestine and accelerating its maturation towards a monocyte-macrophage able to promote the anti-inflammatory process and stem cell compartment repair. We assert that cooperation between the monocyte in SVF and host monocyte defining the therapeutic properties of the SVF is necessary to ensure the efficiency of the SVF for the GIS.

## **Declarations**

### **Ethics approval**

All experiment procedures in this study were approved and performed in accordance with the guidelines of the French Ministry of Agriculture's Animal Ethics Committee (EC Directive 2010/63/EU and French Decree 2013–118).

### **Consent for publication**

Not applicable in this section.

### **Availability of data and materials**

All relevant data and material needed to reproduce the findings are available in the manuscript.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Funding**

This work was supported by a grant from EDF (Electricité de France).

### **Authors' contributions**

L.B performed study design, carried out the experimentation, analyzed the data and wrote the manuscript. F.M and X.T critically reviewed the manuscript. C.L performed study design, experiments, analyzed data and wrote the manuscript. The authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

The authors thank the animal core facility from the IRSN.

## References

1. Singh VK, Garcia M, Seed TM. A review of radiation countermeasures focusing on injury-specific medicinals and regulatory approval status: part II. Countermeasures for limited indications, internalized radionuclides, emesis, late effects, and agents demonstrating efficacy in large animals with or without FDA IND status. *Int. J. Radiat. Biol.* 2017;93:870–884.
2. Dainiak N. Medical management of acute radiation syndrome and associated infections in a high-casualty incident. *J Radiat Res.* 2018;59:ii54–ii64.
3. Bensemmane L, Squiban C, Demarquay C, Mathieu N, Benderitter M, Le Guen B, Milliat F, Linard C. The stromal vascular fraction mitigates radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12:309.
4. François P, Rusconi G, Arnaud L, Mariotta L, Giraudo L, Minonzio G, Veran J, Bertrand B, Dumoulin C, Grimaud F, Lyonnet L, Casanova D, Giverne C, Cras A, Magalon G, Dignat-George F, Sabatier F, Magalon J, Soldati G. Inter-center comparison of good manufacturing practices-compliant stromal vascular fraction and proposal for release acceptance criteria: a review of 364 productions. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12:373.
5. Dykstra JA, Facile T, Patrick RJ, Francis KR, Milanovich S, Weimer JM, Kota DJ. Concise Review: Fat and Furious: Harnessing the Full Potential of Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6:1096-1108.
6. Dong Z, Fu R, Liu L, Lu F. Stromal vascular fraction (SVF) cells enhance long-term survival of autologous fat grafting through the facilitation of M2 macrophages: stromal vascular fraction (SVF) cells enhance long-term. *Cell Biol Int.* 2013;37:855–859.
7. Navarro A, Marín S, Riol N, Carbonell-Uberos F, Miñana MD. Human adipose tissue-resident monocytes exhibit an endothelial-like phenotype and display angiogenic properties. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5:50.

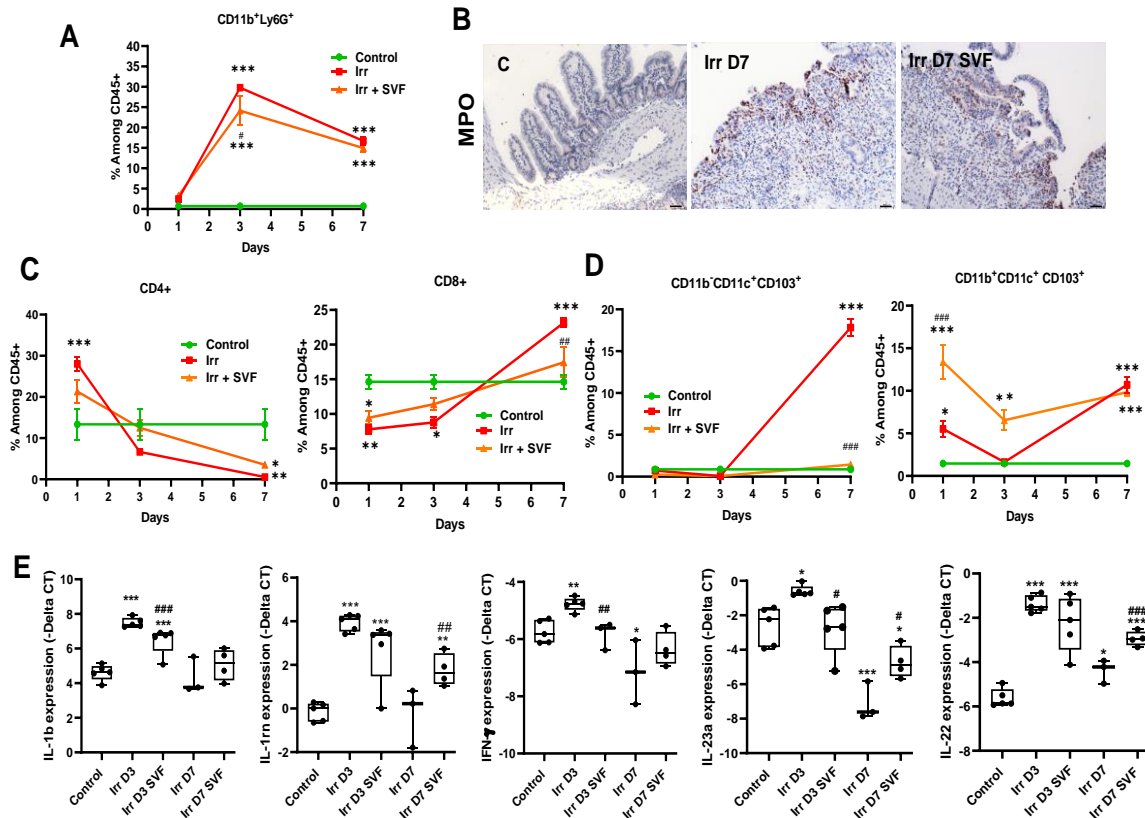
8. Saha S, Bhanja P, Kabarriti R, Liu L, Alfieri AA, Guha C. Bone marrow stromal cell transplantation mitigates radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice. *PLoS One*. 2011;6:e24072.
9. Saha S, Aranda E, Hayakawa Y, Bhanja P, Atay S, Brodin NP, Li J, Asfaha S, Liu L, Taylor Y, Zhang J, Godwin AK, Tome WA, Wang TC, Guha C, Pollard JW. Macrophage-derived extracellular vesicle-packaged WNTs rescue intestinal stem cells and enhance survival after radiation injury. *Nat Commun*. 2016;7:13096.
10. Pull SL, Doherty JM, Mills JC, Gordon JI, Stappenbeck TS. Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2005;102: 99–104.
11. Bain CC, Bravo-Blas A, Scott CL, Perdiguero EG, Geissmann F, Henri S, Malissen B, Osborne LC, Artis D, Mowat AM. Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol*. 2014;15:929-37.
12. Grainger JR, Wohlfert EA, Fuss IJ, Bouladoux N, Askenase MH, Legrand F, Koo LY, Brenchley JM, Fraser ID, Belkaid Y. Inflammatory monocytes regulate pathologic responses to commensals during acute gastrointestinal infection. *Nat Med*. 2013;19:713-21.
13. Dal-Secco D, Wang J, Zeng Z, Kolaczowska E, Wong CHY, Petri B, Ransohoff RM, Charo IF, Jenne CN, Kubes P. A dynamic spectrum of monocytes arising from the in situ reprogramming of CCR2<sup>+</sup> monocytes at a site of sterile injury. *J Exp Med*. 2015;212:447-56.
14. Desalegn G, Pabst O. Inflammation triggers immediate rather than progressive changes in monocyte differentiation in the small intestine. *Nat Commun*. 2019;10:3229.
15. Thomas G, Tacke R, Hedrick CC, Hanna RN. Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:1306–1316.
16. Chousterman BG, Boissonnas A, Poupel L, Baudesson de Chanville C, Adam J, Tabibzadeh N, Licata F, Lukaszewicz AC, Lombès A, Deterre P, Payen D, Combadière C. Ly6Chigh Monocytes Protect against Kidney Damage during Sepsis via a CX3CR1-Dependent Adhesion Mechanism. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27:792-803.

17. Gorin NC, Fliedner TM, Gourmelon P, Ganser A, Meineke V, Sirohi B, Powles R, Apperley J. Consensus conference on European preparedness for haematological and other medical management of mass radiation accidents. *Ann Hematol.* 2006;85:671-9.
18. Curtis M J, Alexander S, Cirino G, Docherty J, Geaogre C H, Giembycz M, Hoyer D, Insel PA, Izzo AA, Ji Y, MacEwan DJ, Sobey CG, Stanford SC, Teixeira MM, Wonnacott S, Ahluwalia A. Experimental design and analysis and their reporting II: Updated and simplified guidance for authors and peer reviewers. *British Journal of Pharmacology.* 2018;175:987–993.
19. Muzaki AR, Tetlak P, Sheng J, Loh SC, Setiagani YA, Poidinger M, Zolezzi F, Karjalainen K, Ruedl C. Intestinal CD103(+)CD11b(-) Dendritic Cells Restrain Colitis via IFN-Gamma-Induced Anti-Inflammatory Response in Epithelial Cells. *Mucosal Immunol.* 2016;9:336–51.
20. Flores-Langarica A, Cook C, Müller Luda K, Persson EK, Marshall JL, Beristain-Covarrubias N, Yam-Puc JC, Dahlgren M, Persson JJ, Uematsu S, Akira S, Henderson IR, Lindbom BJ, Agace W, Cunningham AF. Intestinal CD103+CD11b+cDC2 Conventional Dendritic Cells Are Required for Primary CD4+ T and B Cell Responses to Soluble Flagellin. *Front Immunol.* 2018;9:2409.
21. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, Gong Q, Abbas AR, Modrusan Z, Ghilardi N, de Sauvage FJ, Ouyang W. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med.* 2008;14:282-9.
22. Zha JM, Li HS, Lin Q, Kuo WT, Jiang ZH, Tsai PY, Ding N, Wu J, Xu SF, Wang YT, Pan J, Zhou XM, Chen K, Tao M, Odenwald MA, Tamura A, Tsukita S, Turner JR, He WQ. Interleukin 22 Expands Transit-Amplifying Cells While Depleting Lgr5(+) Stem Cells via Inhibition of Wnt and Notch Signaling. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2019;7:255–274.
23. Seo SU, Kuffa P, Kitamoto S, Nagao-Kitamoto H, Rousseau J, Kim YG, Núñez G, Kamada N. Intestinal macrophages arising from CCR2(+) monocytes control pathogen infection by activating innate lymphoid cells. *Nat Commun.* 2015;6:8010.
24. Rivollier A, He J, Kole A, Valatas V, Kelsall BL. Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *J Exp Med.* 2012;209:139–55.

25. Bernshtein B, Curato C, Ioannou M, Thaiss CA, Gross-Vered M, Kolesnikov M, Wang Q, David E, Chappell-Maor L, Harmelin A, Elinav E, Thakker P, Papayannopoulos V, Jung S. IL-23-producing IL-10R $\alpha$ -deficient gut macrophages elicit an IL-22-driven proinflammatory epithelial cell response. *Sci Immunol*. 2019;4:eaau6571.
26. Hume DA, Caruso M, Ferrari-Cestari M, Summers KM, Pridans C, Irvine KM. Phenotypic impacts of CSF1R deficiencies in humans and model organisms. *J Leukoc Biol*. 2020;107:205–19.
27. Shida Y, Hayashi T, Goto T, Kimura A, Akimoto S, Mukaida N, Kondo T: Essential involvement of CX3CR1-mediated signals in the bactericidal host defense during septic peritonitis. *J Immunol*. 2008;181:4208–4218.
28. Tanaka M, Saito H, Kusumi T, Fukuda S, Shimoyama T, Sasaki Y, Suto K, Munakata A, Kudo H. Spatial distribution and histogenesis of colorectal Paneth cell metaplasia in idiopathic inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2001;16:1353–1359.
29. Hamon P, Loyher PL, Baudesson de Chanville C, Licata F, Combadière C, Boissonnas A. CX3CR1-dependent endothelial margination modulates Ly6Chigh monocyte systemic deployment upon inflammation in mice. *Blood*. 2017;129:1296-1307.
30. Wang F, Scoville D, He XC, Mahe MM, Box A, Perry JM, Smith NR, Lei NY, Davies PS, Fuller MK, Haug JS, McClain M, Gracz AD, Ding S, Stelzner M, Dunn JC, Magness ST, Wong MH, Martin MG, Helmrath M, Li L. Isolation and characterization of intestinal stem cells based on surface marker combinations and colony-formation assay. *Gastroenterology*. 2013;145:383-95.
31. Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol*. 2010;10:225-35.
32. Sehgal A, Donaldson DS, Pridans C, Sauter KA, Hume DA, Mabbott NA. The role of CSF1R-dependent macrophages in control of the intestinal stem-cell niche. *Nat Commun*. 2018;9:1272.
33. Medina-Contreras O, Geem D, Laur O, Williams IR, Lira SA, Nusrat A, Parkos CA, Denning TL. CX3CR1 regulates intestinal macrophage homeostasis, bacterial translocation, and colitogenic Th17 responses in mice. *J Clin Invest*. 2011;121:4787-95.
34. Singh R, Balasubramanian I, Zhang L, Gao N. Metaplastic Paneth cells in extra-intestinal mucosal niche indicate a link to microbiome and inflammation. *Front Physiol*. 2020;11:280.

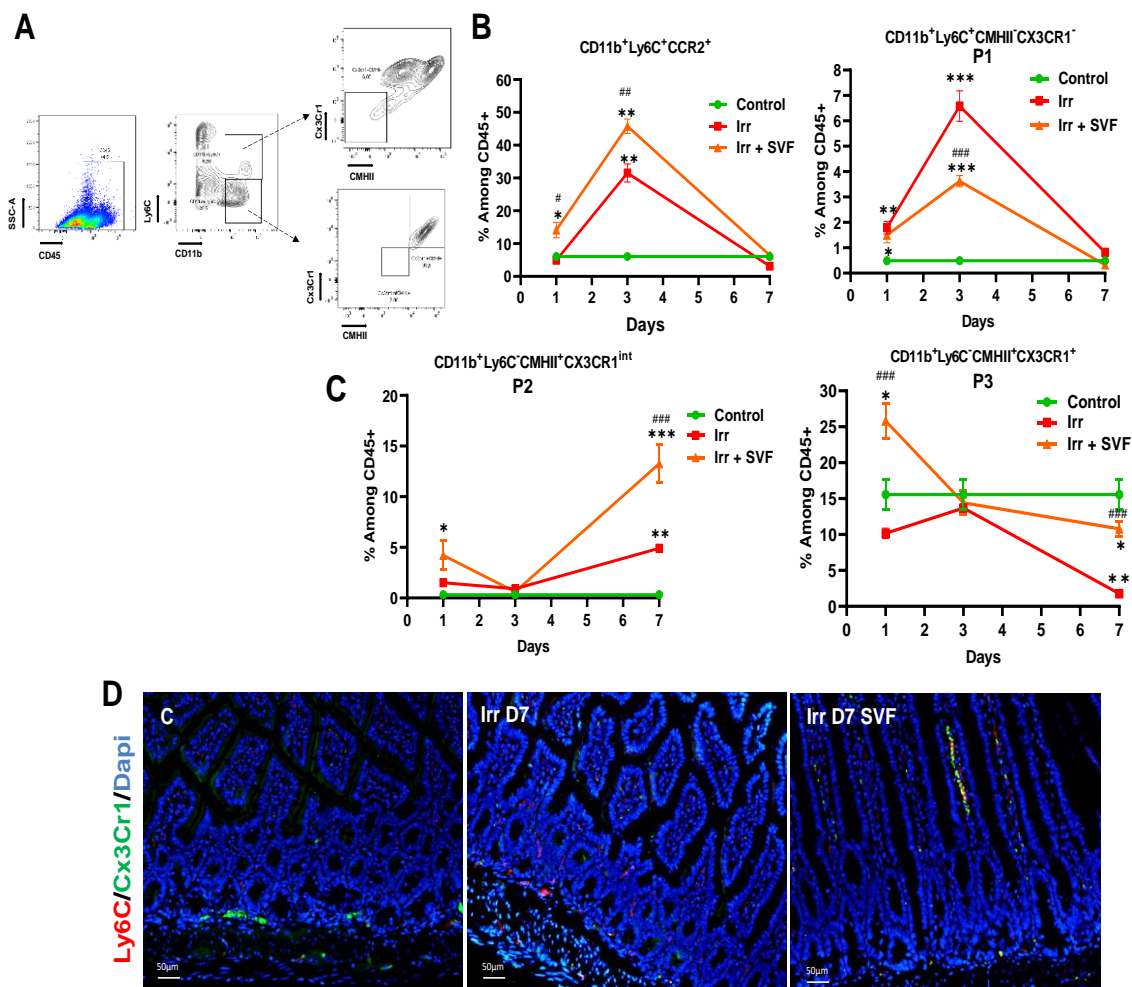
35. Morris ME, Beare JE, Reed RM, Dale JR, LeBlanc AJ, Kaufman CL, Zheng H, Ng CK, Williams SK, Hoying JB. Systemically delivered adipose stromal vascular fraction cells disseminate to peripheral artery walls and reduce vasomotor tone through a CD11b+ cell-dependent mechanism. *Stem Cells Transl Med.* 2015;4:369-80.
36. Finsterbusch M, Hall P, Li A, Devi S, Westhorpe CL, Kitching AR, Hickey MJ. Patrolling monocytes promote intravascular neutrophil activation and glomerular injury in the acutely inflamed glomerulus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113:E5172-81.
37. Soehnlein O, Zernecke A, Eriksson EE, Rothfuchs AG, Pham CT, Herwald H, Bidzhekov K, Rottenberg ME, Weber C, Lindbom L. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood.* 2008;112:1461-71.
38. Yang W, Tao Y, Wu Y, Zhao X, Ye W, Zhao D, Fu L, Tian C, Yang J, He F, Tang L. Neutrophils promote the development of reparative macrophages mediated by ROS to orchestrate liver repair. *Nat Commun.* 2019;10:1076.
39. Brackett CM, Greene KF, Aldrich AR, Trageser NH, Pal S, Molodtsov I, Kandar BM, Burdelya LG, Abrams SI, Gudkov AV. Signaling through TLR5 mitigates lethal radiation damage by neutrophil-dependent release of MMP-9. *Cell Death Discov.* 2021;7:266.
40. Campbell EL, Bruyninckx WJ, Kelly CJ, Glover LE, McNamee EN, Bowers BE, Bayless AJ, Scully M, Saeedi BJ, Golden-Mason L, Ehrentraut SF, Curtis VF, Burgess A, Garvey JF, Sorensen A, Nemenoff R, Jedlicka P, Taylor CT, Kominsky DJ, Colgan SP. Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation. *Immunity.* 2014;40:66-77.

Figures :

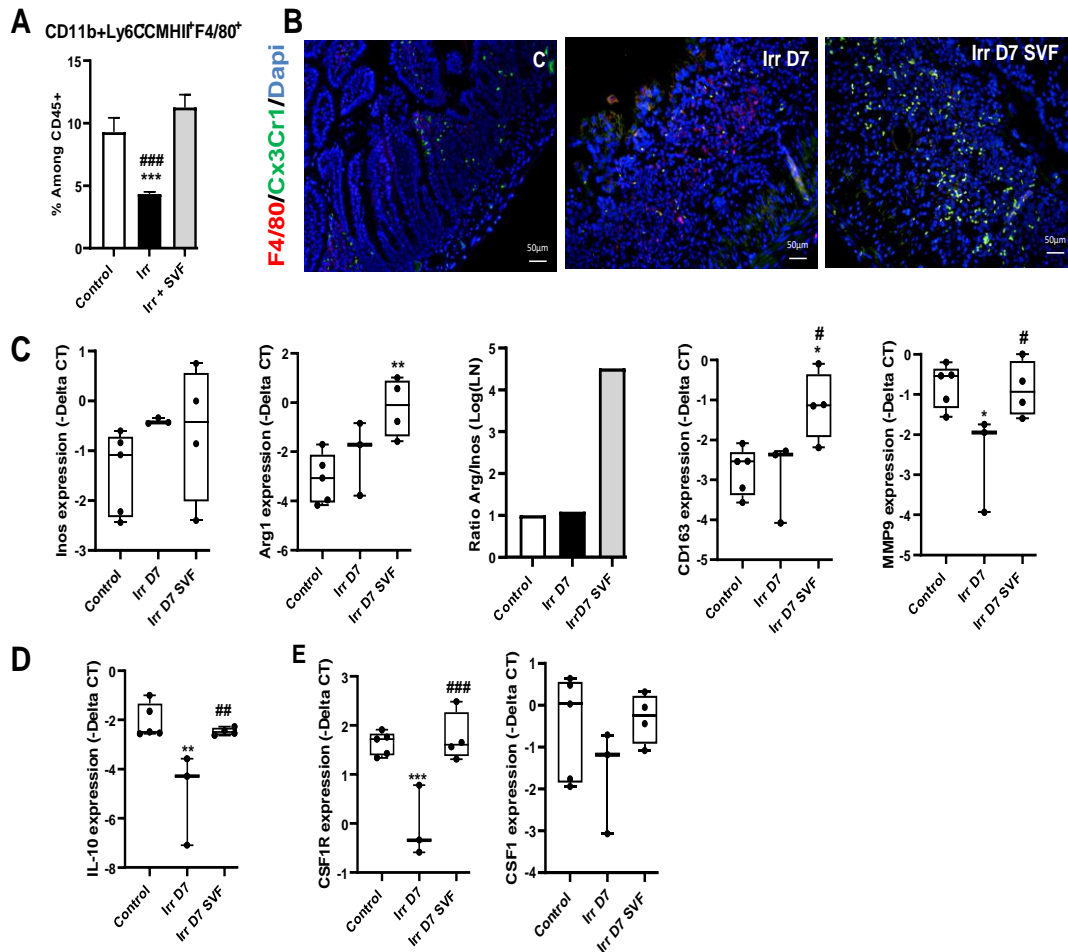


**Figure 1:** SVF treatment modified intestinal immune cells population after abdominal irradiation. (A) Percentage of neutrophil (CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>) population in ileum of control and at day 1, 3, 7 post-irradiation with or without SVF treatment. (B) Representative MPO immunostaining of the ileum at day 7 post-irradiation with or without SVF treatment. Scale bar: 100  $\mu$ m. (C) Percentage of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> population. (D) Percentage of cDC1 (CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>) and cDC2 (CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup>) population in ileum of control and at day 1, 3, 7 post-irradiation with or without SVF treatment. The data are represented by mean  $\pm$  SEM (n=6) (E) Real-time-PCR analysis of IL-1 $\beta$ , IL-1Rn, IFN- $\gamma$ , IL23a and IL-22 of isolated cell from ileal lamina propria. The comparative threshold cycle (Ct) method was used, and the delta Ct comparison was used to compare gene expression in cells. P values were calculated by ANOVA with Tukey correction; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 compared with the control group; #p<0.05; ##p<0.01; ###p<0.001 compared with the irradiated group.

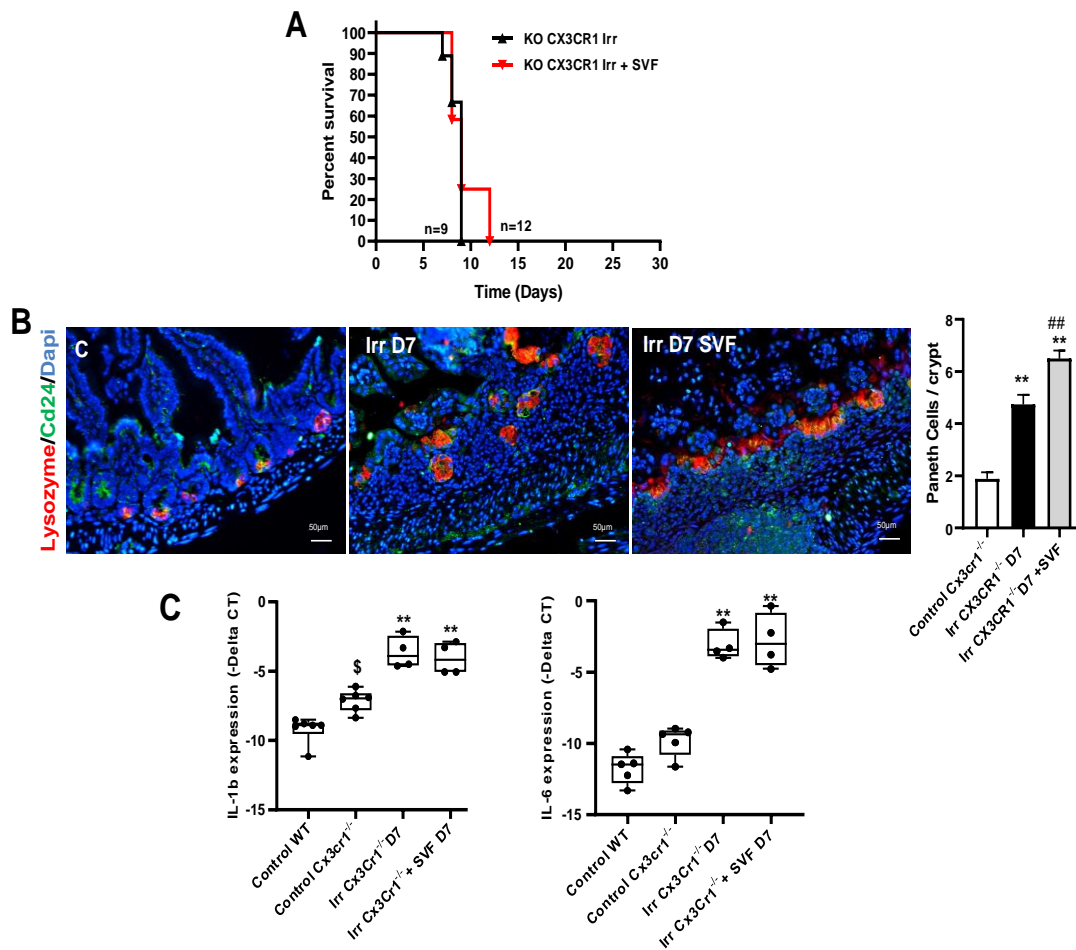




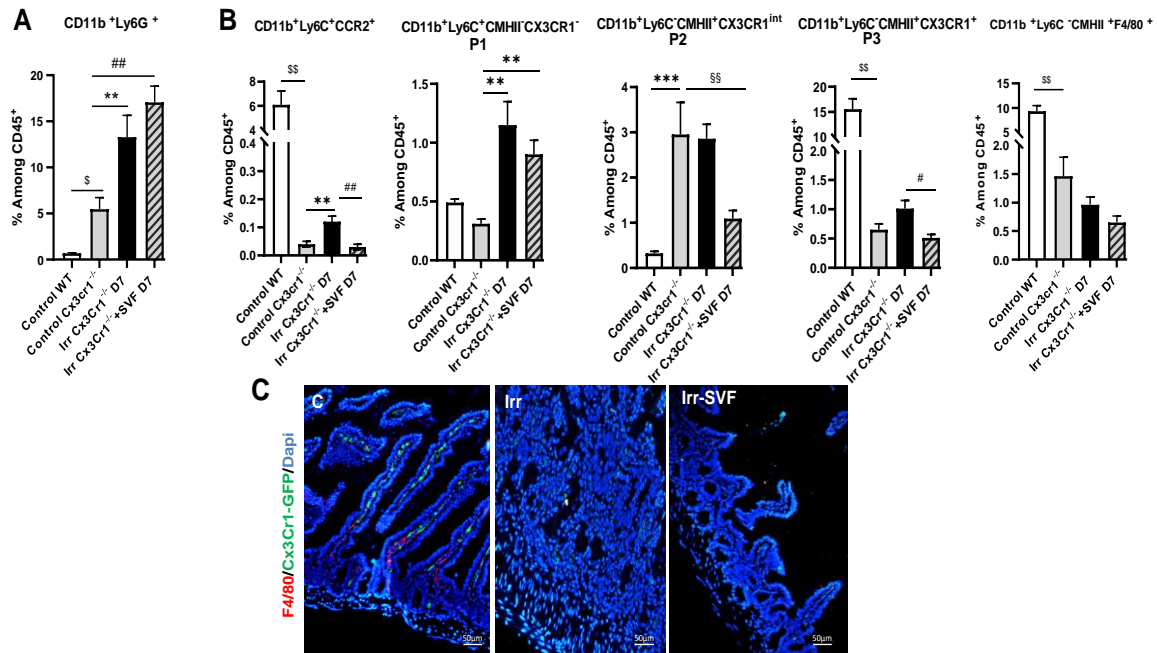
**Figure 2** : SVF treatment promotes recruitment and maturation of monocytes in ileum. (A) Strategy of monocyte gating. (B,C) Percentage of CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>MCHII<sup>-</sup> (P1), CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>MCHII<sup>+</sup>CX3Cr1<sup>int</sup> (P2) and CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>MCHII<sup>+</sup>CX3Cr1<sup>+</sup> (P3) among CD45<sup>+</sup> cells from ileal lamina propria of control and at day 1, 3, 7 post-irradiation with or without SVF treatment. The data are represented by mean  $\pm$  SEM (n=6). P values were calculated by ANOVA with Tukey correction; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 compared with the control group; #p<0.05; ##p<0.01; ###p<0.001 compared with the irradiated group. (D) Representative immuno co-staining Ly6C (red), CX3CR1 (green) in the ileum at Day 7 post-irradiation with or without SVF treatment. Dapi stained nuclei (blue). Scale bar: 50  $\mu$ m.



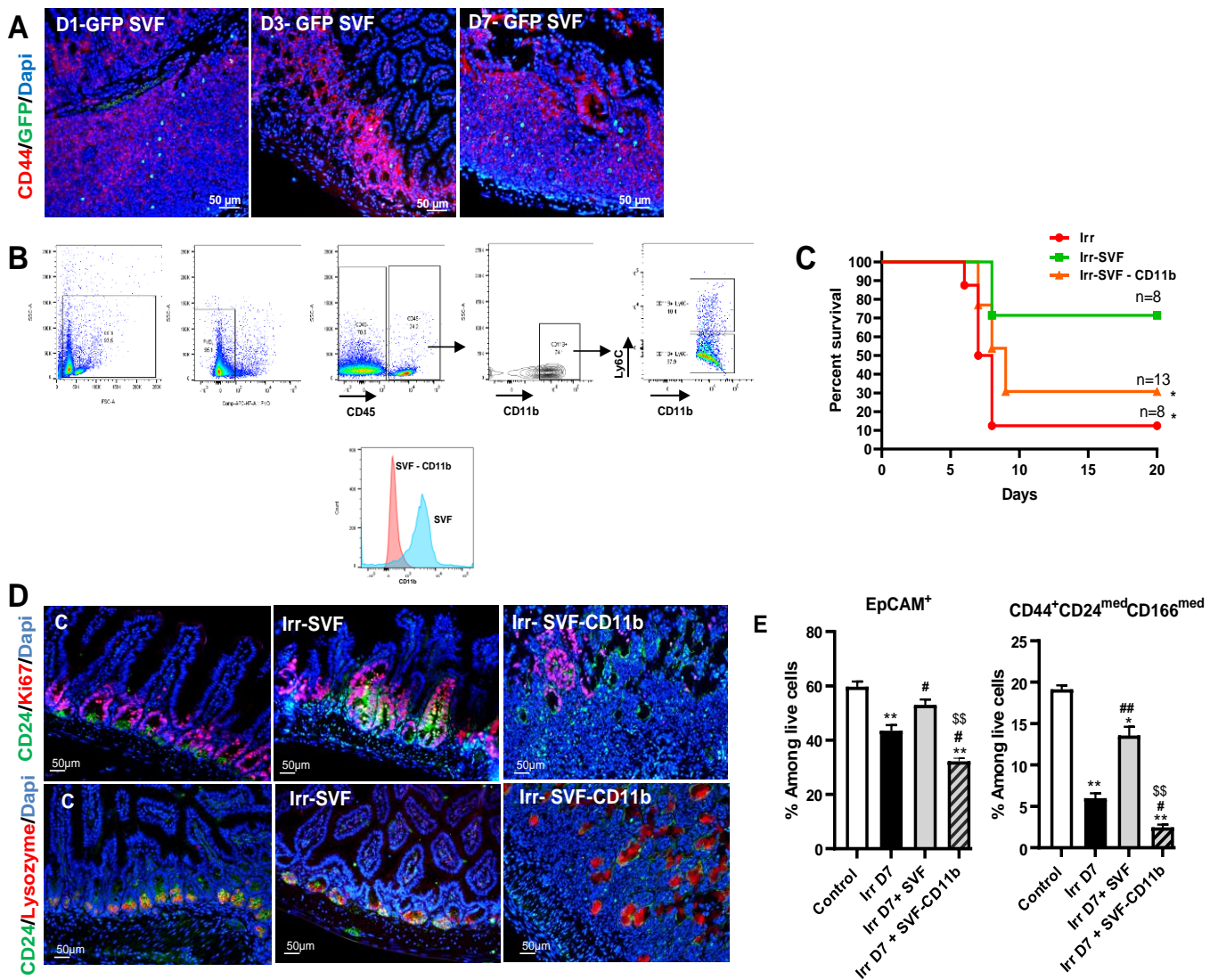
**Figure 3:** SVF treatment increase the pool of macrophage. (A) Percentage of CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>MCHII</sup>F4/80<sup>+</sup> among CD45<sup>+</sup> cells from ileal lamina propria of control and at day 7 post-irradiation with or without SVF treatment. The data are represented by mean  $\pm$  SEM (n=6). (B) Representative co-staining of F4/80 (red) and CX3CR1 (green). Dapi stained nuclei (blue). Scale bars: 50  $\mu$ m. (C, D, E) Real-time-PCR analysis of Inos, Arg1, CD163, MMP9, IL-10, CSF1R, CSF1 of isolated cell from ileal lamina propria. The comparative threshold cycle (Ct) method was used, and the delta Ct comparison was used to compare gene expression in cells. P values were calculated by ANOVA with Tukey correction; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 compared with the control group; #p<0.05; ###p<0.01; ####p<0.001 compared with the irradiated group.



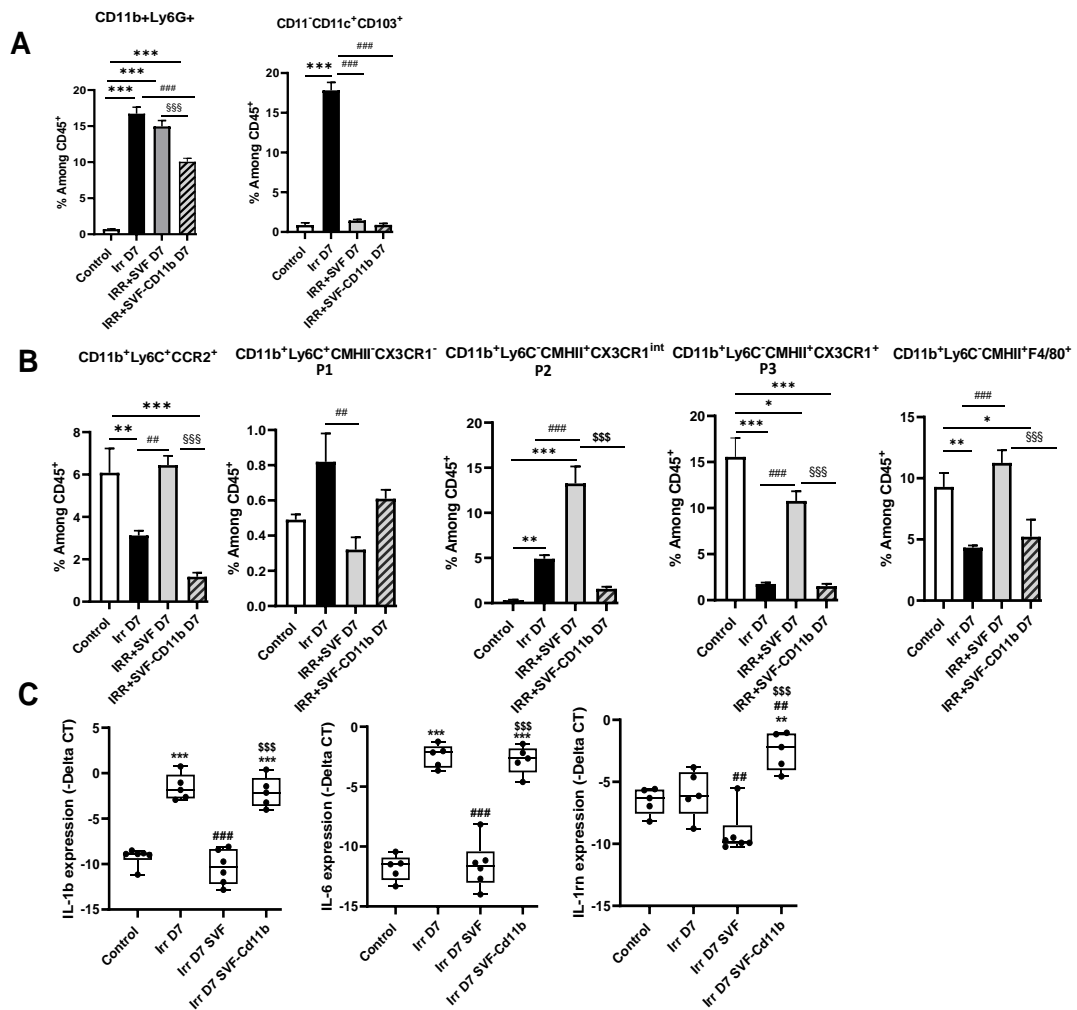
**Figure 4** : CX3CR1 is required to mitigate irradiation damage by SVF. (A) Kaplan-Meier survival analysis of KO CX3CR1 mice exposed to 18 Gy abdominal irradiation with or without SVF treatment. KO CX3CR1 mice show reduced survival following abdominal irradiation with 100% mortality within 9 days. No significant difference between KO CX3CR1 irradiated and KO CX3CR1 irradiated and treated SVF was observed. (B) IHC staining showing the expression pattern of CD24 (green), Lysozyme (red) in ileum. Dapi stained nuclei (blue). The cross section shows the co-staining of CD24 and lysozyme in the KO CX3CR1 control mice and after irradiation with or without SVF treatment. Scale bars: 50  $\mu$ m. The histogram shows an increase of the Paneth cell number at day 7 after irradiation with or without SVF treatment in KO CX3CR1 mice. The data are represented by mean  $\pm$  SEM (n=4-5). (C) Real-time-PCR analysis of IL-1 $\beta$  and IL-6 of ileal tissue. The comparative threshold cycle (Ct) method was used, and the delta Ct comparison was used to compare gene expression in cells. P values were calculated by ANOVA with Tukey correction; \*\*p<0.001 compared with the KO CX3CR1 control group; ##p<0.001 compared with the KO CX3CR1 irradiated group; \$p<0.01 compared with the WT control group.



**Figure 5 :** Recruitment and maturation of leucocytes in irradiated KO CX3CR1 mice after SVF treatment. (A) Percentage of neutrophil (CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>) population (B) Percentage of CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>MCHII<sup>-</sup> CX3Cr1<sup>-</sup> (P1), CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>MCHII<sup>+</sup>CX3Cr1<sup>int</sup> (P2), CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>MCHII<sup>+</sup>CX3Cr1<sup>+</sup> (P3) and CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>MCHII<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> among CD45<sup>+</sup> cells from ileal lamina propria of WT and KO CX3CR1 control and at day 7 post-irradiation with or without SVF treatment in KO CX3CR1 mice. (C) Representative immuno co-staining F4/80 (red), CX3CR1-GFP (green) in the ileum at day 7 post-irradiation with or without SVF treatment in KO CX3CR1. Dapi stained nuclei (blue). Scale bar: 50 μm. The data are represented by mean ± SEM (n=4-5). P values were calculated by ANOVA with Tukey correction; \*p<0.01; \*\*p<0.001 compared with the KO CX3CR1 control group; #p<0.01; ##p<0.001 compared with the KO CX3CR1 irradiated group; \$p<0.01; \$\$p<0.001 compared with the WT control group.



**Figure 6 :** Depletion of CD11b<sup>+</sup> in SVF alters SVF mitigation. (A) Visualization of GFP<sup>+</sup> SVF cells (green) within ileum from irradiated-GFP-SVF treated mice at day 1, 3, 7. The stem cell compartment in crypts was identified via CD44 immunostaining (red) and cell nuclei by Dapi (blue) (B) Strategy of CD11b gating and FACS analysis of SVF-depleted CD11b (C) Kaplan-Meier survival analysis of WT mice WT exposed to 18Gy abdominal irradiation with or without SVF treatment depleted or not of CD11b, \*p<0.01 Log rank (Mantel-cox test). (D) IHC co-stained with CD24 (green) and Ki67 (red) to identify the presence of proliferative cells in the intestinal stem cells compartment and IHC co-stained with CD24 (green) and Paneth cell (red) at day 7 post-irradiation of control mice and in irradiated mice with SVF depleted or not of CD11b. Dapi stained nuclei (blue). Scale bars: 50  $\mu$ m. (E) Fax analysis of intestinal stem cells compartment (ISC). Fax analysis of EpCam population identifying the epithelial cell population and CD44, CD24, CD166, combination for ISC population at day 7 after irradiation with or without SVF treatment depleted or not of CD11b. The data are represented by mean  $\pm$  SEM (n=5-6). P values were calculated by ANOVA with Tukey correction; \*p<0.01; \*\*p<0.001 compared with the WT control mice; #p<0.01; ##p<0.001 compared with the WT irradiated mice; \$\$\$p<0.001 compared with the WT irradiated treated SVF mice.



**Figure 7 :** Depletion of CB11b in SVF modifies intestinal immune cells population. (A) neutrophil (CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>), cDC1 (CD11b<sup>+</sup>CD11<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>) and cDC2 (CD11b<sup>+</sup>CD11<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> population. (B) Percentage of monocytes phenotype CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>MCHII<sup>-</sup>CX3Cr1<sup>-</sup> (P1), CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>MCHII<sup>+</sup>CX3Cr1<sup>int</sup> (P2), CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>MCHII<sup>+</sup>CX3Cr1<sup>+</sup> (P3) and CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>MCHII<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> are analysis among CD45<sup>+</sup> cells from ileal lamina propria of control and at day 7 after irradiation with or without SVF treatment depleted or not of CD11b. The data are represented by mean  $\pm$  SEM (n=6). (C) Real-time-PCR analysis of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-1Rn of ileal tissue. The comparative threshold cycle (Ct) method was used, and the delta Ct comparison was used to compare gene expression in cells. P values were calculated by ANOVA with Tukey correction; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 compared with the WT control mice; #p<0.05; ##p<0.01; ###p<0.001 compared with the WT irradiated mice; \$\$\$p<0.001 compared with the WT irradiated treated SVF mice.

### Axe 3 : Stimulation du compartiment cellule souche intestinal et initiation de la régénération du compartiment épithéliale

Les résultats de cette étude obtenus dans le cadre du travail de thèse sont en cours de finalisation et feront l'objet d'un article à soumettre dans une revue à comité de lecture.

#### **Objectifs :**

Le deuxième compartiment intestinal identifié comme cible de la SVF est le compartiment cellule souche. Les cryptes de l'intestin sont le compartiment le plus radiosensible du tissu, ainsi l'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de la SVF sur le compartiment cellule souche. L'effet direct de la SVF sur le compartiment cellule souche a été caractérisé sur un modèle murin *in vivo* afin de définir les cellules cibles de la SVF et sur un modèle d'organoïdes *in vitro* pour caractériser les effets de la SVF sur la prolifération des cellules souches de la crypte et les voies de signalisation pouvant être impliquées dans la différenciation cellulaire.

#### **Résultats :**

Nous avons utilisé la technique de cytométrie en flux pour identifier les cellules du compartiment cellule souche chez la souris après irradiation abdominale à 18 Gy avec et sans traitement par la SVF. Nous avons montré que le traitement par la SVF induisait une augmentation du pourcentage de cellules épithéliales sur toute la longueur de l'intestin à 7 jours post-irradiation en comparaison aux souris irradiées. Grâce à la combinaison de plusieurs marqueurs définissant le compartiment cellule souche, il a été mis en évidence une augmentation significative des cellules CD44<sup>+</sup>CD166<sup>med</sup>CD24<sup>med</sup>c-Kit<sup>-</sup> (décrites représenter les cellules Lgr5<sup>+</sup>, cellules souches de la crypte) après le traitement à la SVF par rapport aux souris irradiées. L'augmentation de cette population cellulaire est associée à une augmentation de l'expression de Lgr5 tissulaire.

Afin de cibler l'effet direct de la SVF sur le compartiment cellule souche un modèle *ex vivo* d'organoïdes a été utilisé. Ces organoïdes sont issus de cryptes intestinales provenant de souris irradiées à 18 Gy et co-cultivés 8 jours, le temps d'induire la signature de la régénération en présence ou non de SVF. Les organoïdes formés à partir de souris irradiées sont moins nombreux et restent avec un aspect cystique (forme immature des organoïdes), alors qu'en

présence de SVF on observe la formation des bourgeons (forme mature des organoïdes) à 6 jours post-co-culture. Une analyse immunohistologique sur les organoïdes formés montre une augmentation du nombre de cellules Ki67<sup>+</sup> (cellules en prolifération) dans les organoïdes essentiellement colocalisées avec CD44 (marqueur du compartiment cellule souche). De plus, la SVF induit l'augmentation de l'expression de Hes1 (qui contrôle à la fois l'auto-renouvellement des cellules souches intestinales et la direction de leur différenciation) à proximité des cellules de Paneth. YAP1 est impliqué dans la prolifération cellulaire et la rupture de symétrie dans les organoïdes. L'immunomarquage dans les organoïdes témoins a montré que YAP1 était largement cytoplasmique. En revanche, une augmentation des cellules présentant une accumulation nucléaire de YAP1 a été observée dans les organoïdes en présence de SVF par rapport aux organoïdes de souris irradiées et de souris témoins, reflétant ainsi un état activé. Analyse de l'expression génique de YAP1, Notch et Atoh1 montre une augmentation de leur expression dans les organoïdes après traitement à la SVF, ce qui indique une activation de ces voies moléculaires. Une augmentation du marqueur de progéniteur cellulaire, Alpi, présent dans la partie supérieure de la crypte a été observée après co-culture en présence de la SVF par rapport aux cryptes irradiées, indiquant une initiation de la différenciation.

### **Conclusion :**

Cette étude a permis de confirmer que la SVF stimulait de façon directe le compartiment cellule souche. La SVF stimule notamment les cellules de Paneth ainsi que les cellules Lgr5<sup>+</sup>, en mettant en place des voies moléculaires maintenant l'homéostasie de la crypte. Cette stimulation a permis d'initier la différenciation des organoïdes *In Vitro* et *In Vivo* la régénération épithéliale de l'ensemble de l'intestin.

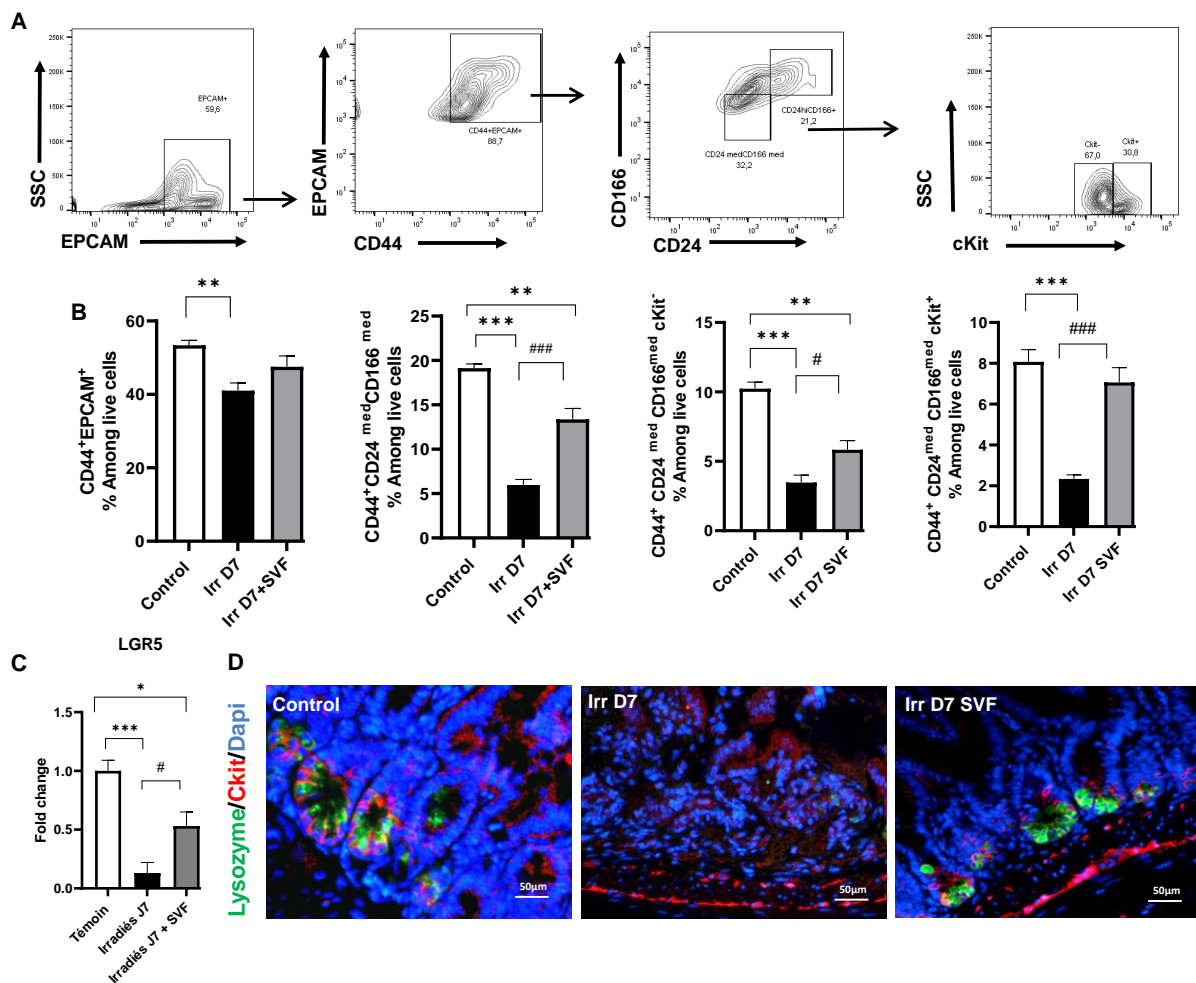
Des analyses Single cell sont en cours de finalisation et permettront d'apporter de nouvelles informations concernant la signature de la stimulation de la crypte par la SVF.



## Effet direct du traitement par la SVF sur le compartiment cellule souche

### Le traitement par la SVF agit sur le compartiment des cellules souches

Les cellules souches intestinales (CSI) résidant dans les cryptes sont essentielles pour l'auto-renouvellement continu et la récupération rapide de l'épithélium intestinal. Récemment, nous avons rapporté que le traitement par la SVF favorisait la régénération de l'épithélium intestinal dans un modèle murin de SGI radio-induit (Bensemmane *et al.*,2021). Ainsi, pour déterminer si le traitement à la SVF agissait sur le compartiment des cellules souches et comme rapporté (Wang *et al.*,2013), nous avons utilisé une stratégie de cytométrie en flux (FACS) pour identifier les CSI avec le marqueur CD44, un marqueur de cellules épithéliales intestinales, le marqueur CD24 et le marqueur CD166 qui excluent les cellules du compartiment de transition-amplification et certaines cellules progénitrices (Fig.1A). Tout d'abord, après dissociation des cellules intestinales, l'analyse en cytométrie d'EpCam, le marqueur du lignage des cellules épithéliales, a confirmé que l'irradiation induisait une diminution significative de la population EpCam et que le traitement à la SVF restaurait cette population 7 jours après l'irradiation (Fig.1B). L'analyse en cytométrie basée sur la combinaison des marqueurs CD44, CD24 et CD166 pour l'enrichissement des CSI a montré une diminution de la population CD44<sup>+</sup>CD166<sup>med</sup>CD24<sup>med</sup> 7 jours après l'irradiation et que le traitement à la SVF permettait de limiter significativement ( $p < 0,001$ ) la diminution de cette population. Comme précédemment montré que les cellules Lgr5 du compartiment cellule souche n'expriment pas c-Kit et que la population c-Kit<sup>+</sup> pourrait être liée aux cellules de Paneth (Schmitt *et al.*,2018), la population CD44<sup>+</sup>CD166<sup>med</sup>CD24<sup>med</sup> pourrait être divisée en population c-Kit<sup>-</sup> et C-Kit<sup>+</sup>. L'analyse par FACS a montré que le traitement à la SVF multipliait par 2 la population CD44<sup>+</sup>CD166<sup>med</sup>CD24<sup>med</sup>c-Kit<sup>-</sup> par rapport aux souris irradiées et restaurait ainsi le pourcentage de cette population. L'analyse de l'expression génique de Lgr5 dans l'intestin confirme une augmentation significative (4 fois ;  $P < 0,05$ ) de son expression comparée aux souris irradiées (Fig.1C). Le double marquage Lysozyme/c-Kit appuie les résultats de cytométrie (Fig.1D), où après traitement à la SVF les cellules de Paneth sont présentes au niveau de la crypte contrairement au groupe irradié et présentent un double marquage indiquant que les cellules de Paneth expriment cKit.

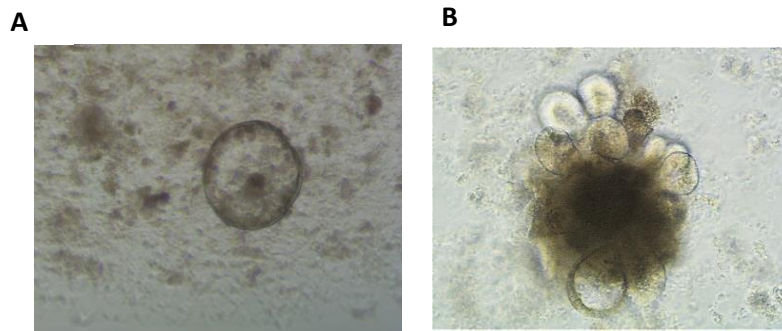


**Figure 1** : Le compartiment cellule souche est stimulé par la SVF. A) Stratégie de « gating » mise en place pour l'analyse cytométrique B) Caractérisation des cellules épithéliales et des cellules souches de l'intestin par cytométrie en flux. L'expérience a été réalisée sur n=6 souris WT pour chaque condition. C) Quantification par PCR du taux d'expression du Lgr5 avant irradiation, 7 jours post-irradiation, 7 jours après le traitement. L'expérience a été réalisée sur n=5 souris WT pour chaque condition. D) Images représentatives du double marquage Lysozyme (vert) et Ckit (rouge). Visualisation des noyaux par le Dapi (bleu). La valeur de P est déterminée par une analyse de variance Anova et un test de Tukey \*  $P < 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$  ; \*\*\*  $P < 0,001$  vs Tem ; #  $P < 0,05$  ; ###  $P < 0,01$  vs Irr .

### Le traitement par la SVF stimule la formation d'organoïdes intestinaux

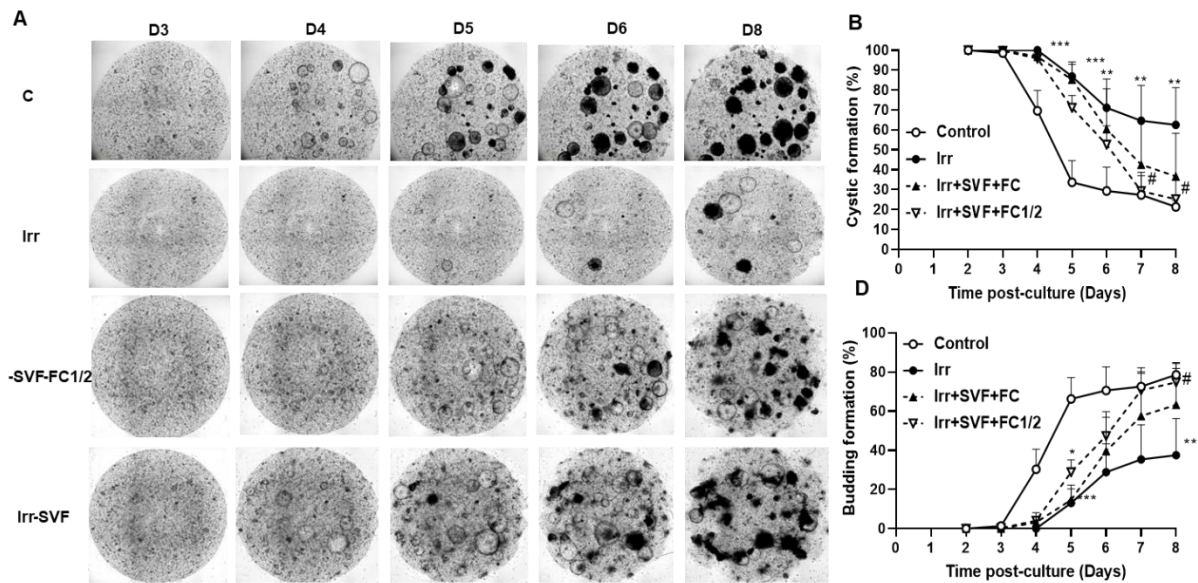
Afin de confirmer la stimulation du compartiment cellule souche par la SVF, nous avons utilisé un modèle d'organoïde *ex vivo* récapitulant le processus de régénération intestinale après irradiation. Les organoïdes ont été obtenus à partir de cryptes intestinales de souris irradiées à 18 Gy et cultivées pendant 8 jours, le temps d'induire des caractéristiques d'une régénération en présence ou non de la SVF (Qu *et al.*, 2020). Les organoïdes formés à partir des cryptes des souris irradiées sont moins nombreux avec un aspect cystique (forme

immature) (Fig.2A) et une paroi plus fine par rapport aux organoïdes de souris témoins qui sont plus grands avec une paroi épaisse et ont formé des bourgeons (forme mature) (Fig.2B) à 4-5 jours de co-culture.



**Figure 2 :** Evolution de la maturation des organoïdes. Images représentatives A) un organoïde immature à l'état de cyste à 6 jours post-irradiation B) un organoïde formant des bourgeonnements à 6 jours de culture provenant de souris témoins. Photos prises en microscopie optique X 100.

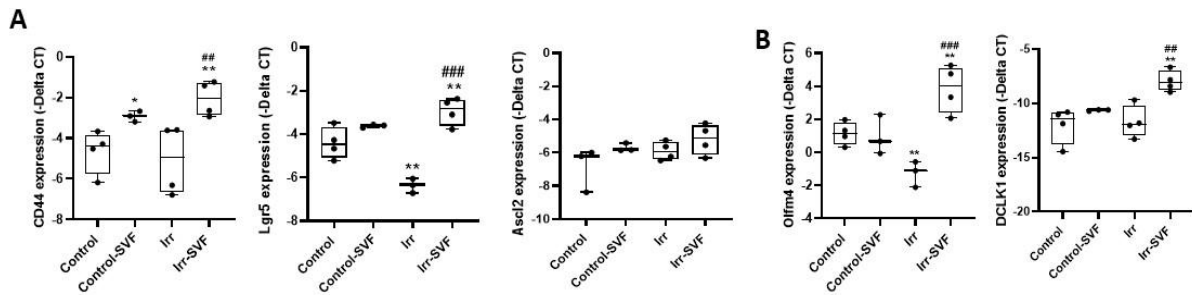
Au 8ème jour de culture, les organoïdes provenant de souris irradiées et co-cultivés avec la SVF présentent une morphologie comparable à celle des organoïdes provenant de souris non irradiées (Fig.3A). La cinétique d'apparition des cystes et des bourgeons a confirmé que l'irradiation maintenait les organoïdes dans un état cystique sur une période plus longue, avec seulement 40 % des organoïdes formant des bourgeonnements à 8 jours de culture, contre 50 % des organoïdes en bourgeonnement à 4-5 jours pour les organoïdes des souris témoins (Fig.3B). Lorsque les organoïdes provenant de souris irradiées ont été cultivés en présence de SVF, 50 % des organoïdes sont en bourgeonnement à 6,5 jours. Il est important de noter que, en comparaison aux organoïdes cultivés en présence de la SVF dans les conditions standards de facteurs de croissances (Sato *et al.*,2009), les organoïdes cultivés avec la SVF et la moitié de la concentration des facteurs de croissance présentent une accélération de la formation de bourgeons par la SVF (50% de bourgeons à J6) par rapport aux conditions standard (50% de bourgeons à J7).



**Figure 3** : Effet de la SVF sur le compartiment cellule souche *in vitro*. A) Images représentatives des organoïdes prise par le système d'imagerie en temps réel « incucyte » avant irradiation, après irradiation avec ou sans SVF + facteurs de croissances ou SVF Facteurs de croissances à la demi-concentration. B) Evaluation du pourcentage de formations de cystes et de buddings des organoïdes en fonction du temps. n=5 souris WT pour chaque condition. La valeur de P est déterminée par une analyse de variance Anova et un test de Tukey \*  $P < 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$  ; \*\*\*  $P < 0,001$  vs Tem ; #  $P < 0,05$  vs Irr.

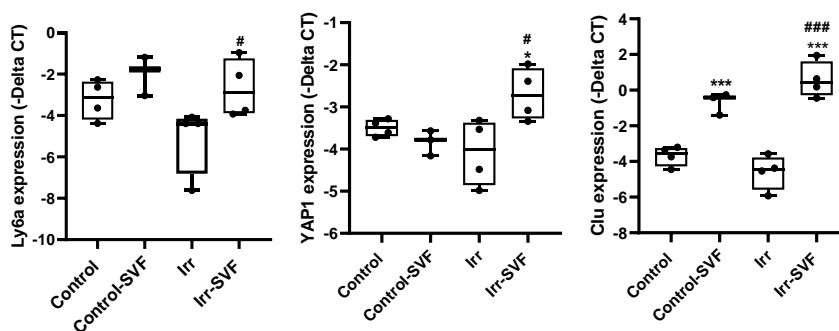
### La SVF agit sur le compartiment cellule souche au niveau moléculaire

Pour explorer la dynamique des cellules souches après le traitement par la SVF, l'expression génique des marqueurs du compartiment cellule souche a été utilisée afin de définir une signature moléculaire de l'efficacité de la SVF sur la prolifération des organoïdes. Les marqueurs de cellules souches (Lgr5, Ascl2) et du compartiment « transient amplifying cells » (Olfm4) sont réprimés dans les organoïdes issus des cryptes de souris irradiées (Fig.4A, B). En revanche, une surexpression d'environ 6 fois de ces marqueurs du compartiment cellule souche (Lgr5, Ascl2), y compris le CD44 et des marqueurs compartiment « transient amplifying cells » Olfm4 (6 fois) et DCLK1 (15 fois) a été observée pour les organoïdes mis en co-culture avec la SVF par rapport aux contrôles et aux organoïdes irradiés.



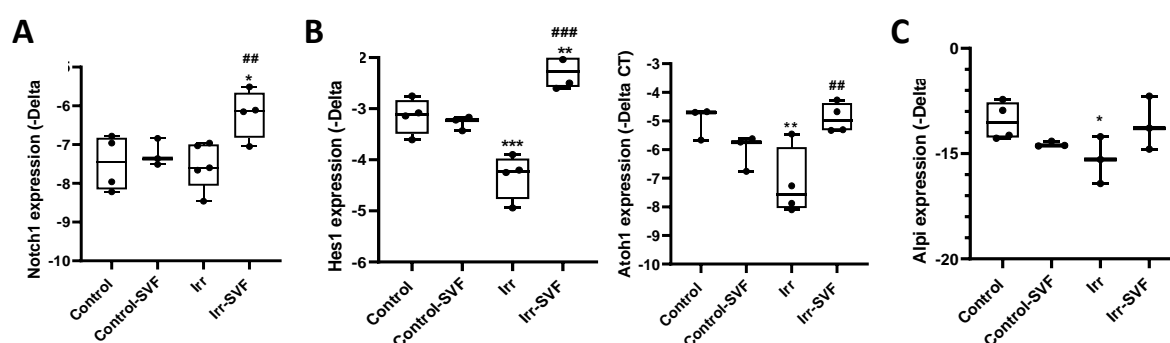
**Figure 4 :** Les gènes de la niche du compartiment souche sont surexprimés en présence de SVF. Quantification par PCR en temps réel du taux d'expression dans les organoïdes A) des gènes de marqueurs du compartiment cellule souche intestinale B) des gènes du compartiment de transition cellulaire à partir d'organoïdes issue de cryptes d'iléon murins témoins, 7 jours post-irradiation, 7 jours après le traitement SVF. L'expérience a été réalisée sur n=6 souris WT pour chaque condition. La valeur de P est déterminée par une analyse de variance Anova et un test de Tukey \*  $P < 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$  ; \*\*\*  $P < 0,001$  vs Tem; #  $P < 0,05$  ; ##  $P < 0,01$  ; ###  $P < 0,001$  vs Irr.

Au cours de la régénération épithéliale induite par un dommage, il a été montré que les cellules souches intestinales exprimaient un marqueur de type fœtal, Clu (Yui *et al.*, 2018). La présence de Clu est rare en condition d'homéostasie et est induit par des dommages intestinaux *via* la voie de signalisation YAP1 (Ayyaz *et al.*, 2019). Il en va de même pour le marqueur de reprogrammation Ly6a (Yui S *et al.*, 2018). Dans les organoïdes de souris irradiées, aucune modification significative de l'expression de Ly6a, Clu et Yap1 n'a été observée (Fig.5A). En revanche, en présence de SVF, une augmentation significativement de leurs expressions a été observée ( $p < 0,05$ ), en particulier pour Clu, une augmentation de l'expression de Clu de 19 fois ( $p < 0,001$ ) par rapport aux organoïdes des souris contrôles et irradiées a été observée (Fig.5A).



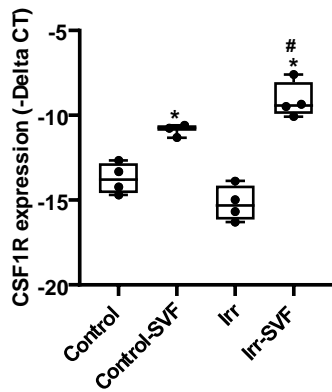
**Figure 5 :** Les gènes signature de régénération épithéliale sont surexprimés en présence de SVF. Quantification par PCR en temps réel du taux d'expression de Ly6a, YAP1 et Clu à partir d'organoïdes issus d'iléon murins avant irradiation, 7 jours post-irradiation, 7 jours après le traitement. L'expérience a été réalisée sur n=6 souris WT pour chaque condition. La valeur de P est déterminée par une analyse de variance Anova et un test de Tukey \*  $P < 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$  ; \*\*\*  $P < 0,001$  vs Tem; #  $P < 0,05$  ; ##  $P < 0,01$  ; ###  $P < 0,001$  vs Irr.

Outre la signalisation Yap, la voie Notch est également cruciale pour la prolifération et la différenciation. Une surexpression de Notch1 a été observée chez les organoïdes mis en coculture avec de la SVF (Fig.6A) associée à une augmentation de l'expression de Hes1 et Atoh1, des marqueurs de progéniteurs (Fig.6B) et à une normalisation du marqueur à la fois des progéniteurs précoces et de différenciation entérocytaire Alpi (Fig.6C) en présence de SVF en comparaison aux organoïdes de souris irradiées.



**Figure 6 :** Les gènes de différenciation épithéliale sont surexprimés en présence de SVF. Quantification par PCR en temps réel du taux d'expression de A) Notch1 B) Hes1 et Atoh1, marqueurs de progéniteurs et C) Alpi (différenciation entérocytaire) à partir d'organoïdes issus d'iléon murins avant irradiation, 7 jours post-irradiation, 7 jours après le traitement. L'expérience a été réalisée sur n=6 souris WT pour chaque condition. La valeur de P est déterminée par une analyse de variance Anova et un test de Tukey \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  Vs Tem; # $P < 0,05$ ; ## $P < 0,01$ ; ### $P < 0,001$  vs Irr.

Il a été montré que le développement des cellules de Paneth dépendait du Colony Stimulating Factor 1 (CSF1) (Hyun *et al.*, 2009) soulignant l'importance des cellules de Paneth dans l'homéostasie de la crypte intestinale et de leur interaction avec les macrophages (Sato *et al.*, 2011). La présence du récepteur CSF-1R de ce ligand exprimé par les cellules de Paneth est essentielle pour les interactions avec les macrophages (Chitu and Stanley, 2006). L'analyse de l'expression génique montre une augmentation significative de CSF-1R dans des organoïdes issus de cryptes provenant de souris irradiées et traitées à la SVF par rapport aux organoïdes issus de cryptes de souris irradiées (Fig.7). Ce résultat démontre que les organoïdes formés en présence de la SVF peuvent interagir avec des cellules du système immunitaire.



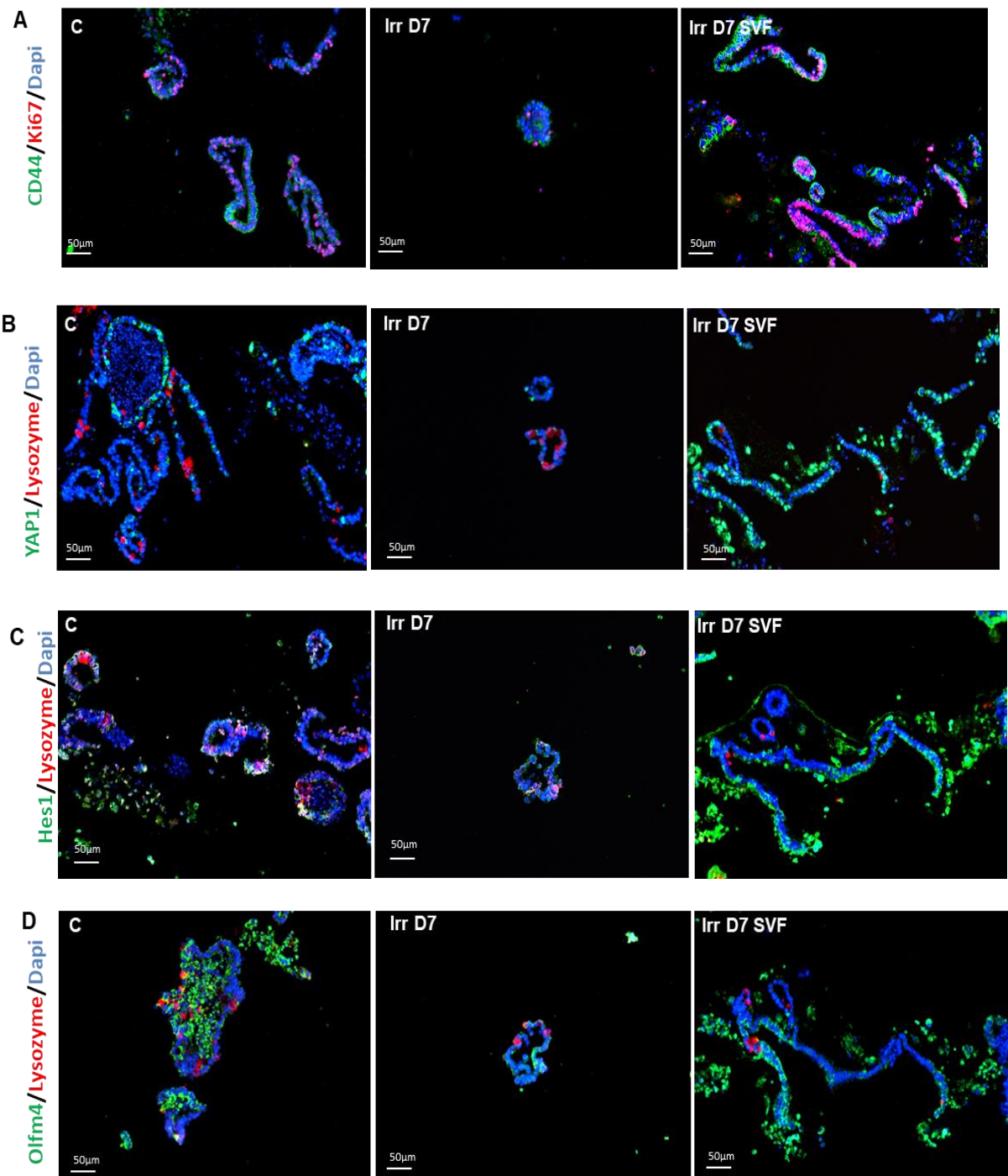
**Figure 7 :** Quantification par PCR en temps réel du taux d'expression de CSF1R à partir d'organoïdes issus d'iléon murins avant irradiation, 7 jours post-irradiation, 7 jours après le traitement. L'expérience a été réalisée sur n=6 souris WT pour chaque condition. La valeur de P est déterminée par une analyse de variance Anova et un test de Tukey \* $P < 0,001$  vs Tem; # $P < 0,001$  vs Irr.

Le CD44 est exprimé dans les cellules souches intestinales et est reconnu comme contribuant à la régénération de ces cellules souches (Liang *et al.*, 2020). Pour confirmer l'effet direct de la SVF sur la prolifération des cellules CD44 un co-marquage CD44/Ki67 a été réalisé sur les organoïdes. L'analyse de l'immunofluorescence a montré la faible présence de cellules CD44<sup>+</sup> Ki67<sup>+</sup> dans les organoïdes provenant de souris irradiées (Fig.8A). En revanche, la SVF a induit une augmentation du nombre de cellules Ki67<sup>+</sup> dans les organoïdes et la plupart des cellules étaient positives pour CD44. La faible présence de cellules possédant un double marquage CD44/Ki67 observé dans les organoïdes contrôles suggère que la SVF induit une forte activité proliférative dans le compartiment de la crypte.

YAP1 est impliqué dans la prolifération cellulaire et la rupture de symétrie dans les organoïdes permettant la formation des bourgeonnements (Serra *et al.*, 2019). L'immunomarquage des organoïdes contrôles a montré que YAP1 était largement cytoplasmique (Fig.8B). En revanche, une augmentation du nombre des cellules avec une accumulation nucléaire de YAP1 a été observée dans les organoïdes mis en co-culture avec la SVF par rapport aux organoïdes issus de cryptes de souris irradiées et de cryptes de souris contrôles, reflétant un état activé de YAP1 induit par la SVF.

Il a été montré que Hes1, un effecteur de la voie Notch contrôle à la fois l'auto-renouvellement des cellules souches intestinales et le destin cellulaire lors de la différenciation. Hes1 permet également de maintenir le microbiote afin de préserver l'homéostasie intestinale (Guo *et al.*, 2018). Dans les organoïdes provenant de souris contrôles, l'immunomarquage a montré que Hes1 est exprimé dans les cellules souches épithéliales à proximité des cellules de Paneth, le co-marquage avec le lysozyme permettant de localiser le compartiment des cellules souches (Fig.8C). Dans les organoïdes mis en co-culture avec la SVF, l'immunomarquage de Hes1 est

fortement augmenté et les cellules les plus positives pour Hes1 sont localisées au niveau supérieur de la crypte.



**Figure 8 :** Les organoïdes expriment les marqueurs de la crypte. Images représentatives A) de la prolifération cellulaire par les cellules souches de la crypte par le double marquage CD44 (vert), Ki67 (rouge) B) d'un marqueur de régénération YAP1 (vert) à proximité des cellules de Paneth visualisées par le lysozyme (rouge) C) d'un marqueur auto-renouvellement Hes1 (vert) et des cellules de Paneth par le lysozyme (rouge) et C) d'un marqueur du compartiment « transcient amplifying cells » Olfm4 (vert) et des cellules de Paneth par le lysozyme (rouge). Visualisation des noyaux par le Dapi (bleu) en microscopie à fluorescence x 100.



De manière générale, l'analyse immunohistologique conforté par l'expression génique a montré la présence de cellules en prolifération dans le compartiment cellule souche et que les marqueurs clés associés à la régénération lors de dommage, notamment Yap1 (Fig.8B), Hes1 (Fig.8C) étaient fortement exprimés dans les organoïdes en co-culture avec la SVF par rapport aux organoïdes issus de souris irradiées. L'ensemble de l'activation de ces marqueurs de régénération est associé à une augmentation de Olfm4 (Fig.8D), marqueur du compartiment « transient amplifying cells ».

**Conclusion :**

Cette étude a permis de confirmer que la SVF stimulait de façon directe le compartiment cellule souche notamment les cellules de Paneth ainsi que les cellules Lgr5<sup>+</sup>, en mettant en place des voies moléculaires maintenant l'homéostasie de la crypte. Cette stimulation a permis d'initier la différenciation des organoïdes *In vitro* et *In vivo* la régénération épithéliale de l'ensemble de l'intestin.

# Discussion

---

L'exposition à de fortes doses de rayonnements ionisants, lors d'un accident ou d'un acte de malveillance mais également dans le domaine médical pour la mise en aplasie en vue d'une transplantation de moelle osseuse pour le traitement de leucémie entraîne l'apparition d'un syndrome gastro-intestinal. Ce syndrome peut rapidement mettre en danger la vie des personnes exposées. Des contremesures médicales ont reçu l'autorisation de la FDA, cependant elles ne sont efficaces que pour le syndrome hématopoïétique radio-induit. Encore actuellement, la prise en charge du syndrome gastro-intestinal radio-induit (SGI) fait face à un mur thérapeutique. L'utilisation de cellules souches mésenchymateuses (CSMs) a montré avoir une efficacité dans un modèle d'irradiation large volume chez la souris en stimulant la régénération épithéliale intestinale et en inhibant l'apoptose (Sémont *et al.*,2010). Les CSMs ont également montré avoir une efficacité thérapeutique sur la régénération épithéliale en stimulant les cellules progénitrices de l'hôte dans un modèle d'irradiation colique localisée chez le rat (Sémont *et al.*,2013). Cependant, l'utilisation de CSMs implique une mise en culture préalable avant l'injection ; ce qui limite leur utilisation dans le syndrome gastro-intestinal radio-induit. En effet, la mortalité des victimes survient dans les 10 jours après l'exposition aux rayonnements ionisants, ainsi la SVF par son obtention rapide et sans une mise en culture permet de s'affranchir de cette limitation, elle peut être injectée en autologue le même jour suivant l'exposition.

La première étude menée sur l'utilisation de la SVF dans un modèle murin de syndrome gastro-intestinal a montré une amélioration significative de la survie des souris, en réduisant la perméabilité intestinale, limitant ainsi la perte de poids (Bensemmane *et al.*,2021). Les analyses histologiques ont montré une stimulation de la régénération épithéliale en promouvant de nombreux foyers d'hyperprolifération (Bensemmane *et al.*,2021). Ainsi, l'utilisation de la SVF a prouvé avoir un intérêt thérapeutique dans le SGI ; cependant, les mécanismes d'actions de la SVF sont encore peu connus. Une étude a mis en avant le fait que les composants de la SVF auraient des effets paracrines agissant avec l'hôte, conduisant à la réparation et à la cicatrisation, notamment et de façon inattendue en sécrétant des taux élevés d'IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-15 et de faible taux de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et l'IL-13 en comparaison aux CSMs dérivées du tissu adipeux, suggérant que la SVF peut posséder des propriétés immunomodulatrices différentes des CSMs (Blaber *et al.*,2012),

(Dykstra *et al.*,2017). En raison de sa composition hétérogène en cellules et des effets encore inconnus sur les interactions entre les différentes cellules composant la SVF et entre la SVF et le tissu hôte, il est important de mieux connaître le potentiel thérapeutique de chaque composant cellulaire de la SVF.

### **Axe 1 : Stimulation du compartiment cellules souches et initiation de la régénération du compartiment épithéliale**

La SVF a montré une efficacité thérapeutique sur la survie des souris dans le modèle de SGI ; cependant, l'identification des compartiments cibles du traitement est un élément important afin de comprendre les mécanismes d'action de la SVF dans la réparation tissulaire. Le premier compartiment clé mis en avant lors de nos travaux de recherche a été le compartiment cellule souche intestinal, qui va initier la différenciation des progéniteurs appartenant au compartiment de transition de l'axe crypte-villosité en cellules différenciées. La deuxième cible est le système immunitaire intestinal, ce point sera développé plus loin dans la discussion.

#### ***La SVF stimule le compartiment cellules souches par deux mécanismes possibles.***

Le compartiment cellule souche de l'intestin appelé également crypte de Lieberkühn, est un élément central dans la régénération épithéliale de l'intestin. Les résultats d'une première étude ont montré, après l'injection intraveineuse de SVF une restauration de la barrière intestinale qui se caractérise par une réduction significative de la perméabilité intestinale favorisée par la reconstitution d'un épithélium et de jonctions serrées ZO-1 (Bensemmane *et al.*,2021). L'analyse de la composition des cellules souches du compartiment de la crypte, par cytométrie en flux, a permis de mettre en avant le fait que les cellules de Paneth et les cellules Lgr5<sup>+</sup> étaient protégées et/ou stimulées par le traitement par la SVF des effets délétères de l'irradiation pouvant permettre d'initier la régénération épithéliale.

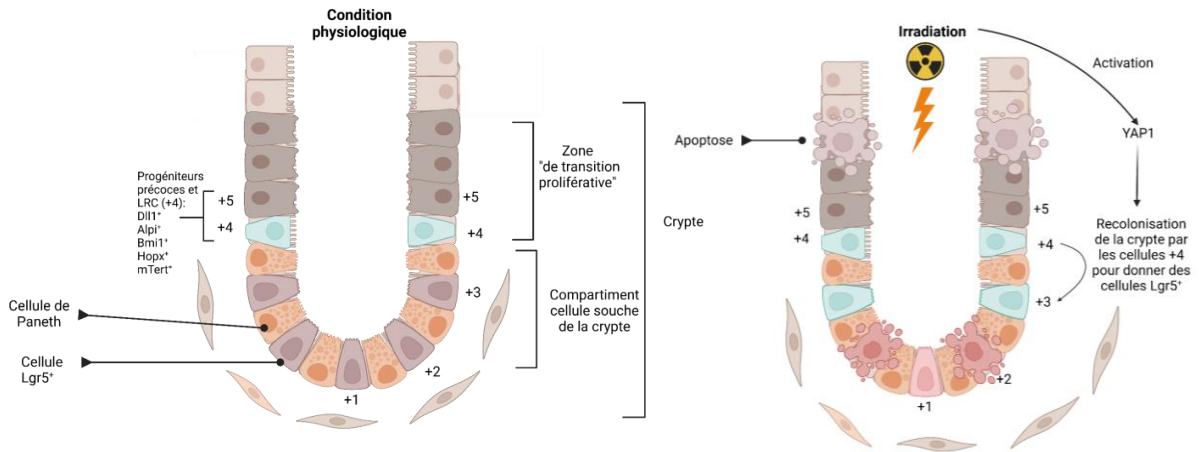
Cet effet pro-régénérant de la SVF pourrait aussi s'expliquer par un effet direct sur les cryptes mais également par un effet indirect sur les cryptes. Les cryptes sont soumises à un micro-environnement agissant sur les cellules souches déterminant leur destin cellulaire et permettant leur auto-renouvellement (Morisson and Spradling,2008).

Les deux voies de signalisation majeures de l'auto-renouvellement du compartiment cellules souches de la crypte sont les voies Wnt et Notch (Van Es *et al.*,2012), (Van Es *et al.*,2015). Les cellules de Paneth ont été décrites comme étant une source importante de ligands de Wnt et de facteurs de croissance (Sato *et al.*,2011). Mais contrairement à leur dépendance commune à la voie de signalisation Wnt pour maintenir l'homéostasie, les cellules souches de la crypte et les cellules de Paneth présentent une activation par la voie Notch1 différente. Les cellules de Paneth agiraient comme une « niche » pour les cellules Lgr5<sup>+</sup>. *In Vitro*, il a été montré que lors d'une déplétion en cellules de Paneth, une perte des cellules Lgr5<sup>+</sup> était observée (Sato *et al.*,2011). Une étude a montré qu'après irradiation, les cellules de Paneth présentaient une forte activité de la voie de signalisation Notch (Yu *et al.*,2018). Cette surexpression s'est traduite par l'activation de nombreux gènes cibles de la voie Notch notamment *Hes1*. La délétion de Notch1 ou l'inhibition chimique de la voie Notch réduit le nombre de cellules souches de la crypte, mais à l'inverse augmente le nombre de progéniteurs de cellules de Paneth. La voie Notch pourrait représenter le "changement" du destin cellulaire entre les cellules souches et les cellules de Paneth (Yu *et al.*,2018). *In vivo* et dans les modèles d'organoïdes, l'inhibition de la voie Notch augmente la différenciation des cellules sécrétrices.

Dans notre étude, une diminution à la fois du pourcentage de cellules de Paneth et des cellules du compartiment cellule souche (Lgr5<sup>+</sup>) a été observée après irradiation à 18Gy. Cependant, après traitement à la SVF ces cellules de Paneth sont plus nombreuses et semblent restaurées ou « préservées ». De manière intéressante, une augmentation significative du taux d'expression de Notch1 chez les souris traitées a été observée par rapport aux souris irradiées, ce qui pourrait permettre une stimulation des cellules à la base de la crypte. Une étude a montré qu'après irradiation les cellules de Paneth se dédiffénciaient induisant une augmentation des taux de Notch1 (Yu *et al.*,2018), une autre étude a montré que les cellules de Paneth se dédiffénciaient *via* l'activation de la voie Notch (Jones *et al.*,2019), ce qui conforterait le fait que Notch soit plus exprimé après traitement à la SVF par rapport au groupe irradié.

### ***La SVF permettrait la régénération tissulaire en agissant sur les voies de signalisation.***

Lors de dommages à l'intestin, la voie Hippo-YAP1 est la plus active sur l'inhibition de la voie Wnt et Notch (Gregorieff *et al.*,2015) (Imajo *et al.*,2015). Une étude a montré qu'un Knock-out de YAP en combinaison avec un traitement au DSS (Dextran sulfate sodium) entraînait une perte de poids plus importante et un niveau d'apoptose plus élevé (Cai *et al.*,2010). Il a également été montré dans un modèle d'organoïde que YAP1 agissait comme un « senseur » de la régénération tissulaire lorsque que les cellules sont dissociées. La formation de cystes (sphères symétriques) est pilotée par une activation transitoire de Yap1 qui est à la genèse de l'initiation du processus de régénération. C'est le taux d'expression nucléaire de Yap1 d'une cellule qui va initier une inhibition de Notch.Ce qui va créer le premier événement de rupture de symétrie dans la croissance des organoïdes permettant la différenciation et conduisant à la formation de la première cellule de Paneth (Serra *et al.*,2019). Les cellules de Paneth permettraient alors le retour à l'homéostasie en stimulant l'expression du Lgr5<sup>+</sup> par les cellules voisines et recréant une niche propice pour les cellules souches avec la production de Wnt (Serra *et al.*,2019). *In vivo*, une étude a montré qu'après irradiation chez la souris YAP1 avait la capacité de reprogrammer les cellules souches Lgr5<sup>+</sup> en inhibant la voie Wnt, permettant la stimulation de la régénération tissulaire (Gregorieff *et al.*,2015). Nos résultats sont en accord avec l'ensemble de ces études, où dans notre modèle *in vitro* d'organoïdes la co-culture de la SVF en présence de cryptes intestinales provenant de souris irradiées induit une augmentation significative de l'expression de YAP1. L'analyse immunohistologique montre que cette expression est présente sur une majorité de cellules formant l'organoïde. Afin de renforcer cette observation, l'utilisation de souris KO pour YAP1 dans le SGI pourrait apporter des réponses quant au rôle de YAP1 dans la stimulation de la régénération épithéliale après l'exposition à de fortes doses de rayonnement ionisant (*Figure 28*).



**Figure 28** : Schéma illustrant le rôle de YAP dans la crypte. Créé avec Biorender.com basé sur l'article Li, V. S. (2019). *Yap in regeneration and symmetry breaking. Nature cell biology, 21(6), 665-667.*

*Ascl2* est un facteur de transcription cible de la voie Wnt, il est exclusivement retrouvé au niveau des cellules situées au fond de la crypte ( $Lgr5^+$ ) chez la souris (Van der Flier *et al.*, 2009) et chez l'homme (Jubb *et al.*, 2006). Il a été notamment montré chez la souris que *Ascl2* était essentiel dans la régénération épithéliale dans un modèle d'irradiation corps entier à 10Gy. Une augmentation de la mortalité des souris déplétées en *Ascl2* a été observée dès 7 jours post-irradiation. L'analyse du compartiment cellule souche a révélé un déficit des cellules  $Lgr5^+$  ainsi qu'une diminution de la prolifération du compartiment cellule souche associée à une régénération épithéliale inefficace (Murata *et al.*, 2020). Ces résultats sont en accord avec nos travaux de recherche. En effet, une tendance à l'augmentation de l'expression génique de *Ascl2* a été observée après traitement à la SVF du SGI par rapport au groupe irradié. Ainsi, la SVF pourrait stimuler la restauration des cellules souches de la crypte *via Ascl2* et protéger ainsi l'intestin des effets délétères de l'irradiation à fortes doses. L'étude de Murata *et al.* a également montré qu'*Ascl2* serait impliqué dans la dédifférenciation des cellules de la crypte. Pour valider cette hypothèse, dans notre modèle de SGI chez la souris, dépléter le gène *Ascl2* permettrait de confirmer son rôle dans le maintien de l'intégrité des cryptes intestinales après irradiation et permettrait de conclure si la SVF peut contrebalancer l'absence d'*Ascl2* et ainsi protéger toujours les cryptes malgré la déplétion d'*Ascl2*. L'utilisation d'un modèle d'organoïde de souris KO pour le gène *Ascl2* pourrait également être utilisé. De plus, une étude a montré que lorsque Wnt était bloqué spécifiquement dans l'intestin, cela n'affectait pas les cellules  $Lgr5^+$  et les cellules de Paneth, indiquant qu'une autre voie se met en place afin de compenser la perte de Wnt (San Roman *et al.*, 2014). L'utilisation de souris génétiquement

modifiée pour abolir la sécrétion de Wnt dans notre modèle spécifique à l'irradiation pourrait répondre à ce dernier argument.

### ***La SVF stimulerait la régénération épithéliale via une action sur les cellules du compartiment cellules souches : les cellules Lgr5<sup>+</sup> et les cellules de Paneth.***

Dans cette thèse, il a été montré que l'irradiation diminuait significativement le pourcentage de cellules de Paneth et de cellules Lgr5<sup>+</sup> ainsi que le pourcentage de cellules épithéliales. Ces résultats sont en accord avec une étude qui a montré après une analyse par la technique single cell RNAseq de cryptes intestinales issues de souris irradiées corps entier à 12Gy, une diminution du nombre de cellules de Paneth ainsi qu'une disparition à 90% des cellules Lgr5<sup>+</sup> (Ayyaz *et al.*,2019). L'ablation des cellules Lgr5<sup>+</sup> a été associée à une diminution du nombre de cryptes régénérantes altérant la régénération épithéliale après irradiation à 14 Gy et 10 Gy (Metcalf *et al.*,2013). En revanche, l'ablation des cellules Lgr5<sup>+</sup> en combinaison avec une irradiation à plus faibles doses (1-2Gy) n'induisait pas de détérioration de l'architecture de l'axe crypte-villosité. L'homéostasie de l'intestin peut être conservée jusqu'à une certaine dose de rayonnement ionisant en corps entier équivalant à 6 Gy (Metcalf *et al.*,2013). Dans notre modèle, une augmentation à la fois de l'expression génique de LGR5 et du pourcentage de cellules CD44<sup>+</sup>CD24<sup>med</sup>CD166<sup>med</sup>cKit<sup>-</sup> pouvant correspondre aux cellules Lgr5<sup>+</sup> ainsi que le nombre de cellules de Paneth a été observée sur l'intestin après l'injection de SVF. L'effet direct de la SVF sur le compartiment cellule souche a été observé *in vitro* sur le modèle d'organoïde issu de cryptes murines irradiées. Nos résultats suggèrent que la SVF stimulerait ou protégerait à la fois les cellules Lgr5<sup>+</sup> et les cellules de Paneth après irradiation à forte dose.

### ***L'effet de la SVF sur le compartiment cellules souches utiliserait la dédifférenciation cellulaire.***

Le traitement au SVF a été associé à une prolifération des cellules de Paneth (cellules portant Ki67) ainsi qu'à leur nombre par crypte. Il a été intéressant de noter la présence de cellules de Paneth dans la "crypte supérieure" et que certaines de ces cellules étaient lysozyme<sup>+</sup>/Muc2<sup>+</sup>. Ces cellules exprimaient des biomarqueurs de Paneth et de gobelets ce qui est le reflet de progéniteurs bivalents de cellules sécrétoires ou de cellules intermédiaires pouvant suggérer un processus de dédifférenciation (Smith *et al.*,2017).



Il existe une population de cellules situées en position +4 quiescente et extrêmement peu représentée en condition d'homéostasie, mais lors de dommages à l'intestin, cette cellule est capable de se « dédifférencier » et d'entrer à nouveau en cycle cellulaire afin de fournir une réserve de cellules souches Lgr5<sup>+</sup> (Buczacki et al.,2013). Cette cellule nommée cellule souche de réserve (revSC) exprime fortement clusterin (Clu). Après irradiation, les épithéliums intestinaux déficients en revSC présentent une forte réduction de la prolifération, du nombre de cryptes et de la longueur des villosités (Ayyaz *et al.*,2019). Le traçage de la lignée cellule souche a montré que les cellules filles des revSCs CLU<sup>+</sup> étaient les principales contributrices à la régénération de l'épithélium intestinale dans les modèles d'inflammation aiguë et chronique. Ainsi les revSCs ont été identifiées comme un type de cellule à recyclage lent qui apparaît dans les intestins endommagés après une signalisation dépendante de YAP1 pour reconstituer les cellules souches Lgr5<sup>+</sup> et régénérer l'intestin (Ayyaz *et al.*,2019). Nos résultats montrent une augmentation drastique et significative de l'expression du marqueur Clu après le traitement à la SVF. Il a été montré que ces cellules pouvaient proliférer et pouvaient recoloniser l'épithélium intestinal (Ayyaz *et al.*,2019). Plutôt qu'une stimulation d'une cellule souche régénératrice résidente ou une plasticité cellulaire générale, l'expansion des revSCs pourrait être un mécanisme de régénération induit par la SVF. Cependant, de futures études sur le traçage de cette cellule sont nécessaires afin de valider cette hypothèse.

Une étude a montré que le marqueur Alpi (Alkaline phosphate intestinal) permettait d'identifier à la fois les entérocytes, mais également leurs précurseurs (Tetteh *et al.*,2016). Il a été montré que les cellules Alpi<sup>+</sup> ont la capacité de donner des cellules fonctionnelles Lgr5<sup>+</sup> lorsque ces dernières étaient déplétées. Les précurseurs entérocytaires qui sont hautement prolifératifs et ont une durée de vie courte servent de grand réservoir potentiel de cellules souches pendant la régénération de la crypte (Tetteh *et al.*,2016). La dédifférenciation de ces cellules dépendrait du mode d'induction des dommages à l'intestin. Le taux d'expression génique d'Alpi a une tendance à l'augmentation après traitement à la SVF comparé au groupe irradié ce qui peut sous-entendre que la SVF pourrait préserver l'épithélium intestinal en stimulant la dédifférenciation de progéniteurs en cellules souches de la crypte, régulant ainsi la perte des cellules souches consécutive à l'irradiation. D'autres études sont nécessaires afin d'explorer cette hypothèse dans le SGI, comme la réalisation de marquages en immunohistologie sur des organoïdes issus de cryptes d'intestin de souris traitées ou irradiées.

Une analyse par la technique de single cell RNA seq de cellules de la crypte provenant de souris irradiées et traitées à la SVF pourrait également apporter des informations intéressantes sur la signature de ces cellules Alpi.

Une injection de SVF issue de souris GFP a montré en immunohistologie la présence de cellules GFP<sup>+</sup> au niveau des plaques de Peyer à 24 heures post-irradiation puis localisées en bas des cryptes à 7 jours post-irradiation. Les cellules retrouvées semblent être des cellules souches mésenchymateuses. **Cette observation renforce l'hypothèse que la SVF n'agirait pas uniquement *via* la sécrétion de facteurs solubles mais également en ayant la capacité de migrer au site lésionnel.** La SVF est constituée de cellules immunitaires mais également de cellules souches mésenchymateuses (Morris *et al.*,2015) (Klar *et al.*,2016). Les cellules souches mésenchymateuses ont la capacité de migrer au site lésionnel en adhérant aux parois de l'endothélium (Schmidt *et al.*,2006), cependant la majorité des CSMs se retrouvent piégée au niveau de la microvascularisation du poumon (Suillaro *et al.*,2016) ce qui expliquerait le faible nombre de CSMs GFP<sup>+</sup> retrouvé dans les plaques de Peyer et à proximité des cryptes. En migrant au niveau de l'intestin, les CSMs peuvent relarguer leur sécrétome afin de créer un environnement favorable à la niche des cryptes. En effet, une étude soumise récemment pour publication (2023) par Honorine Dushime *et al.* a montré dans notre modèle de syndrome gastro-intestinal radio-induit, qu'après une injection de CSMs d'origine foétale ces cellules étaient présentes à proximité des cryptes 7 jours post-irradiation.

***La plasticité des voies de signalisation et des cellules intestinales tels que les progéniteurs ainsi que les cellules souches de la crypte permet à l'intestin de trouver des chemins favorisant la régénération épithéliale.***

Dans notre modèle de souris KO *Cx3Cr1* traitées à la SVF après irradiation à 18 Gy, des cellules de Paneth anormales ont été observées en immunohistologie. Ces cellules possédaient des gros granules par rapport aux cellules de Paneth de souris contrôle. Une étude a montré que des souris mutées pour le gène *Atg16L1*, gène responsable de l'autophagie et exprimé par les cellules de Paneth, possèdent des cellules de Paneth avec des granules anormaux (Cadwell *et al.*,2008). Cette mutation est également présente chez les patients atteints de maladie de Crohn et induirait un stress endoplasmique au sein des cellules de Paneth. Cette étude avance

que l'inflammation intestinale pourrait émerger directement des cellules de Paneth lorsque le gène *Atg16L1* est muté (Adolph *et al.*, 2013). Cette même étude a montré que, à l'inverse la présence du gène *Atg16L1* augmente l'autophagie dans les cellules épithéliales de l'intestin, permettant l'amélioration de l'inflammation intestinale en limitant l'activation de NF- $\kappa$ B. Cette étude souligne l'importance du rôle des cellules de Paneth dans l'inflammation. La mutation du gène *Atg16L1* n'est pas la seule responsable de l'apparition de cellules de Paneth anormales puisqu'une observation similaire a été faite sur notre modèle de souris KO *Cx3Cr1*. Notre étude dévoile la possibilité d'une étroite collaboration entre les cellules de Paneth et le compartiment immunitaire. Des analyses poussées de la signature génique des cellules de Paneth pourraient montrer des associations entre des cellules de Paneth anormales et la radiopathologie du SGI et valider si les cellules de Paneth sont une des cibles de l'efficacité du traitement par la SVF.

En résumé, la SVF permet d'initier la régénération épithéliale en passant par la stimulation du compartiment cellules souches à travers différents processus et faisant intervenir différents acteurs potentiels. D'après nos résultats la SVF semble agir directement sur les cellules souches du compartiment cellule souche (cellules Lgr5) et les cellules présentes dans le compartiment cellule souche (cellules de Paneth) en stimulant leur prolifération et différenciation mais également sur les précurseurs et cellules dites « de réserve » (RevSC) de la lignée épithéliale en induisant leur dédifférenciation. Le modèle d'organoïde montre que la SVF agit sur les cryptes en modulant les grandes voies de signalisation des cryptes telles que YAP, Wnt ou encore Notch.

Toutefois, le compartiment cellule souche n'est pas le seul compartiment cible de la SVF, lors de ces travaux de thèse, un autre compartiment a été identifié comme jouant un rôle majeur dans l'efficacité thérapeutique du traitement lors d'un SGI radio-induit. Il s'agit du compartiment immunitaire.

## Axe 2 : L'immunité dans la réponse d'immunomodulation du SGI radio-induit

Le micro-environnement de la crypte est notamment constitué de cellules immunitaires (Sehgal *et al.*,2018), et en particulier de macrophages. Il a été montré que le développement des cellules de Paneth dépendait du Colony Stimulating Factor 1 (CSF1) (Hyun *et al.*,2009), un régulateur de la survie, de la prolifération et de la différenciation des monocytes/macrophages. Dans l'intestin, le récepteur CSF-1R de ce ligand est exprimé par les cellules de Paneth et les macrophages (Chitu and Stanley,2006). Il a été montré que chez des souris déficientes pour CSF-1 ou pour CSF-1R, le nombre de cellules de Paneth matures diminuait au sein de la crypte, cette diminution est associée à une réduction du nombre de cellules Lgr5<sup>+</sup> (Hyun *et al.*,2009). Une étude a montré que le fait de bloquer le CSF-1R à l'aide d'anticorps entraînait la déplétion d'une majeure partie des macrophages dans tous les tissus et en particulier dans la *lamina propria* (MacDonald *et al.*,2010). L'ensemble de ces études souligne à nouveau l'importance des cellules de Paneth dans l'homéostasie de la crypte intestinal et de leur interaction avec les macrophages (Sato *et al.*,2011).

**Une hypothèse serait que la SVF participerait à la régénération épithéliale en modulant les macrophages de la lamina propria.**

### *L'axe CSF-1R/CSF-1 nécessaire pour des interactions cellulaires.*

La *lamina propria* de l'intestin contient d'une manière générale un pourcentage important de macrophages, ce pool est renouvelé continuellement en condition inflammatoire par les monocytes circulants (Zigmond *et al.*,2013), (Bain *et al.*,2014). Une étude a montré qu'après un dommage à l'intestin, les macrophages étaient fortement présents à la base de la crypte, et lorsque les souris sont déficientes pour le CSF-1, les dommages épithéliaux induits par le DSS étaient exacerbés contrairement au groupe de souris contrôle (Pull *et al.*,2005). Ces résultats soulignent le rôle majeur de l'activation des macrophages dans la région de la crypte pour la régénération épithéliale.

Nos travaux montrent une augmentation significative de l'expression génique de CSF-1R dans des organoïdes issus de cryptes provenant de souris irradiées et traitées à la SVF par rapport aux organoïdes issus de cryptes de souris irradiées. Ces résultats sont en accord avec les études précédentes démontrant l'importance de la présence de CSF-1R pour la stimulation du compartiment cellule souche. Ainsi, la SVF stimulerait l'expression de CSF-1R au niveau de la

crypte soit sur les cellules de Paneth soit sur les macrophages associés à la crypte. Sur notre modèle d'organoïde le blocage de CSF-1R au moyen d'anticorps anti-CSF-1R permettrait de discriminer l'importance de la signalisation de CSF-1R sur l'une ou l'autre de ces cellules dans la formation et la prolifération des organoïdes en dépit de la présence de SVF. Toutefois, une étude a montré ne pas retrouver d'expression de CSF-1R sur les cellules de Paneth mais uniquement au niveau des macrophages associés à la crypte (Sehgal *et al.*,2018). Dans cette même étude, la déplétion des macrophages par l'exposition aux anticorps anti-CSF-1R a montré induire une rupture de l'homéostasie de la crypte impactant la différenciation des cellules de Paneth et des cellules Lgr5<sup>+</sup> (Sehgal *et al.*,2018). Ces résultats suggèrent que les macrophages associés à la crypte sont absolument nécessaires afin d'assurer l'homéostasie de cette dernière. Selon Sehgal *et al.*, l'association étroite entre les macrophages et la crypte permettrait de contrebalancer les effets d'une éventuelle perte des cellules de Paneth en produisant des molécules favorables au maintien des cellules Lgr5<sup>+</sup>. De plus, toujours dans cette étude, l'observation d'une augmentation de l'expression des marqueurs des cellules en position +4 après une exposition aux anticorps anti-CSF-1R souligne que ces cellules tentent d'initier le réapprovisionnement des cellules Lgr5<sup>+</sup> malgré la déplétion en macrophages.

Toutefois, les facteurs produits par les macrophages associés à la crypte afin de maintenir un support aux cellules de Paneth et aux cellules Lgr5<sup>+</sup> ainsi que les mécanismes précis sont encore peu connus. Des études ont montré que les macrophages induisaient l'activation de la voie de signalisation Wnt ce qui permettait d'initier la cicatrisation de la muqueuse intestinale (Cosin-Roger *et al.*,2015), cette activation serait associée aux macrophages de type M2. Après irradiation, cette activation pourrait passer par la sécrétion de vésicules contenant Wnt libérées par les macrophages (Saha *et al.*,2016). En effet, le blocage de la sécrétion de Wnt a entraîné la déstructuration du tissu épithélial de l'intestin augmentant la mortalité (Saha *et al.*,2016). *A contrario*, l'utilisation de CSF1 en préclinique a été documentée comme permettant d'initier la régénération épithéliale après des lésions à l'organe notamment dans le rein et le foie (Menke *et al.*2009), (Alikhan *et al.*,2011, (Stutchfield *et al.*,2015).

Les macrophages intestinaux permettent de limiter l'inflammation excessive à travers différentes molécules et mécanismes cellulaires (Mowat,2018). Les macrophages pro-inflammatoires de type M1 induisent la rupture des jonctions serrées endommageant ainsi la barrière épithéliale (Cosin-Roger *et al.*,2013). La stimulation de la polarisation des

macrophages de type M1 en macrophages de type M2 est une stratégie thérapeutique innovante afin de réguler l'inflammation intestinale et de restaurer l'homéostasie du tissu (Du *et al.*,2021). A la fois l'immunohistologie sur l'iléon et l'expression génique de cellules immunitaires isolées de la *lamina propria* ont confirmé que le traitement par la SVF induit une augmentation du taux d'expression des marqueurs exprimés par les M2 (Arg1, CD206) dans l'iléon, signe de la présence de macrophage de type 2 (Bensemmane *et al.*,2021).

### **La conversion des macrophages**

**Une question fondamentale concerne la provenance de ces macrophages de type 2.** Est-ce une conversion des macrophages résidents ou une infiltration de précurseurs de ces macrophages ? Le pool intestinal de macrophage est renouvelé continuellement par les monocytes circulants (Zigmond *et al.*,2013), (Bain *et al.*,2014). Nous avons montré que la SVF augmentait le pourcentage de la population de monocytes CCR2<sup>+</sup> présents dans la *lamina propria* par rapport au groupe irradié, et que ces monocytes vont progressivement perdre CCR2 et Ly6C et exprimer Cx3Cr1<sup>+</sup>, jusqu'à donner des macrophages matures. Le pourcentage de monocytes/macrophages CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>CMHII<sup>+</sup>Cx3Cr1<sup>+</sup> à 7 jours post-irradiation est significativement augmenté après le traitement à la SVF par rapport au groupe irradié; ce qui signifie que la SVF en augmentant le pool de monocytes CCR2<sup>+</sup> permet l'augmentation du pool de monocytes/macrophages Cx3Cr1<sup>+</sup>. Une augmentation significative du taux d'expression d'IL-10 des cellules immunitaires isolées de la *lamina propria* a été observée en association à l'augmentation du pool de monocytes/macrophages CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>CMHII<sup>+</sup>Cx3Cr1<sup>+</sup>.

### **La réaction inflammatoire serait pro-régénérante**

**La SVF permettrait la protection de la muqueuse intestinale en immunomodulant la réponse inflammatoire par les macrophages d'une manière dépendante du Cx3Cr1 et la production d'IL-10.** L'axe Cx3Cr1/Cx3CL1 joue un rôle important au niveau de la *lamina propria*. Il a été montré que l'absence de Cx3Cr1 induisait la diminution de l'IL-10, entraînant un déficit d'activation des lymphocytes Tregs ce qui accentue les lésions de la muqueuse (Hadis *et al.*,2011). Il a été également mis en évidence chez les patients atteints de maladie de Crohn que la mutation du gène Cx3Cr1 accentue l'inflammation intestinale avec des manifestations extra-intestinales (Leonardi *et al.*,2018). De manière intéressante, une étude a montré que le Cx3Cr1 permettait d'augmenter le nombre de monocytes CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup>CCR2<sup>+</sup> adhérant à

l'endothélium (Chousterman *et al.*,2016). Cette dernière étude appuie nos résultats où la SVF maintiendrait un pool constant de monocytes patrouilleurs CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>CCR2<sup>-</sup>Cx3Cr1<sup>+</sup> permettant d'augmenter le pourcentage de monocytes CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup>CCR2<sup>+</sup> adhérant à l'endothélium. L'utilisation de souris KO pour le gène Cx3Cr1 a montré la présence d'un faible pourcentage de la population CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup>CCR2<sup>+</sup> dans la *lamina propria* après le traitement à la SVF ; cette observation vient étayer le rôle fondamental du récepteur Cx3Cr1 dans le recrutement des monocytes. Cette étude met en évidence que contrairement à toute attente le recrutement de monocytes de type inflammatoire CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup>CCR2<sup>+</sup> est nécessaire pour la réparation tissulaire. Les monocytes Ly6C<sup>high</sup> jouent un rôle « mitigateur » dépendant du récepteur Cx3Cr1 durant la phase aigüe de l'irradiation. L'utilisation de molécules activatrices du système immunitaire comme « mitigateur » de l'exposition aux rayonnements ionisants a été précédemment étudiée et a montré une efficacité. Plus spécifiquement, l'administration d'agonistes des Toll Like Receptors (TLRs), le LPS (pour le TLR4) ou la flagelline (pour le TLR5) après une irradiation colorectale accélère la réparation tissulaire associée à une augmentation de la présence des macrophages de type 2 (Lacavé-Lapalun *et al.*,2013). L'entolimod (un dérivé de la flagelline se fixant sur le TLR5) agit comme un puissant atténuateur des lésions radio-induites, capable de réduire de façon substantielle (2 à 3 fois) et significative le risque de décès lorsqu'il est administré en injection unique dans les 48 heures suivant une irradiation létale corps entier (DL50-75/40) et en l'absence de soins de soutien intensifs supplémentaires. La réduction de la mortalité due au syndrome aigüe d'irradiation induite par le traitement par l'entolimod était associée à une réduction des dommages causés à la fois par le syndrome hématopoïétique et le syndrome gastrointestinal et à une réparation tissulaire accélérée (Krivokrysenko *et al.*,2015). Dans le contexte d'un traitement par thérapie cellulaire le préconditionnement des CSMs avec de la flagelline augmente l'efficacité thérapeutique des CSMs dans un modèle d'irradiation colorectal (Linard *et al.*,2016).

La stimulation de la réaction inflammatoire contribue et accélère la réaction anti-inflammatoire notamment par la production d'IL-10 qui induit la polarisation du macrophage vers un type M2. Le blocage de l'IL-10 diminue la polarisation des macrophages en type M2 ainsi que l'efficacité thérapeutique (Koelink *et al.*,2020). **Nos résultats confortent la notion que l'influx de cellules immunitaires ayant un profil inflammatoire favorise l'accélération de la réparation tissulaire.**

### ***Possibilité d'une synergie cellulaire dans le traitement à la SVF***

La synergie entre plusieurs cellules immunitaires contribue également à l'accélération de la réparation tissulaire. Bien que les neutrophiles aient généralement été associés à l'exacerbation des lésions tissulaires par leur libération de ROS, des travaux récents ont révélé que la coopération neutrophile-monocyte remplit des fonctions de réparation essentielles, où les ROS déclenchent l'orientation des macrophages vers un phénotype réparateur (Yang *et al.*,2019).

Les neutrophiles recrutés au niveau tissulaire stimulent à leur tour le recrutement *via* leur sécrétion les monocytes inflammatoires CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup>CCR2<sup>+</sup> au site lésionnel (Soehnlein *et al.*,2008). Lors de nos travaux, une augmentation du pourcentage de neutrophiles a été observée après traitement à la SVF. Après déplétion des cellules CD11b<sup>+</sup> de la SVF une diminution à la fois du pourcentage de neutrophiles et des monocytes CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup>CCR2<sup>+</sup> a été observée diminuant l'efficacité thérapeutique de la SVF sur la régénération du compartiment cellule souche. Cette constatation souligne l'importance de la relation neutrophile-monocyte inflammatoire dans la réparation tissulaire. Le blocage du recrutement des neutrophiles pourrait confirmer le lien existant entre ces deux populations cellulaires dans l'efficacité de la SVF.

D'autres cellules immunitaires pourraient interagir avec le compartiment de la crypte, comme les Innates Lymphoid cells (ILCs). **La SVF permettrait la régénération épithéliale en immunomodulant l'IL-22, la cytokine signature des ILC3.** Les ILCs sont des cellules immunitaires résidentes de la *lamina propria* et sont également impliquées dans l'homéostasie du tissu intestinal (Artis and Spits,2015). Parmi les ILCs, les ILC3 se trouvent à proximité des cryptes (Kanamori *et al.*,1996), (Aparicio-Domingo *et al.*,2015) et ont la particularité d'exprimer le facteur de transcription ROR $\gamma$ T qui est corrélé à leur action sécrétrice d'IL-22 et d'IL-17 (Sawa *et al.*,2010). Une étude a montré que les ILC3 étaient activées à la suite de dommages à l'intestin, et qu'en absence de ROR $\gamma$ T, dans un modèle d'induction de dommage à l'intestin par le méthotrexate, les ILC3 induisaient des dommages au compartiment de la crypte alors que la présence de ROR $\gamma$ T permettait aux ILC3 de protéger les cryptes des dommages liés au méthotrexate (Aparicio-Domingo *et al.*,2015). Les ILC3 ont la capacité d'interagir avec les cellules souches intestinales, les protégeant de l'invasion des lymphocytes T (Hanash *et al.*,2012). Lors de nos travaux, l'évaluation de la présence d'ILC3 n'a



pas été effectuée cependant l'expression génique de la cytokine « signature » des ILC3, l'IL-22 permettant la communication entre les ILC3 et les cellules souches des cryptes (Hanash *et al.*,2012) a été évaluée. Le traitement à la SVF induit une augmentation significative du taux d'expression d'IL-22 à 7 jours post-irradiation suggérant que les ILC3 ont pu être stimulées par le traitement à la SVF. De manière intéressante, à 3 jours post-irradiation le taux d'expression est très élevé sans différence entre le groupe irradié et traité ce qui sous-entend que les dommages précoces liés à l'irradiation activent les ILC3. Uniquement à 7 jours post-irradiation la SVF maintient un taux d'expression d'IL-22 élevé permettant la préservation des cryptes des effets associés à l'irradiation.

L'étude d'Aparico-Domingo *et al.*, renforce ces résultats, en effet, le blocage de l'IL-22 par un anticorps induit la perte des cellules souches intestinales, soulignant le rôle d'IL-22 dans le maintien de l'homéostasie des cryptes (Aparicio-Domingo *et al.*,2015). Le mécanisme par lequel l'IL-22 agirait sur les cellules souches intestinales passerait par l'expression du récepteur de l'IL-22 sur les cellules de la crypte préservant la population des cellules Lgr5<sup>+</sup> et ainsi la régénération épithéliale, un effet induit par la phosphorylation de STAT3 (Lindemans *et al.*,2015). Il serait intéressant d'étudier par la technique de Western Blot l'expression de STAT3 après irradiation et traitement à la SVF afin de caractériser si cette voie de signalisation est induite par la SVF.

Dans notre modèle, les ILC3 pourraient également faciliter la réparation tissulaire par la modulation de la voie de signalisation YAP; en effet, il a été montré que chez des souris déplétées en ILC3 la signalisation YAP diminuait (Romera-Hernandez *et al.*,2020).

Le bénéfice de la présence de l'IL-22 sur la régénération de la crypte pourrait être validé sur le modèle d'organoïde irradié par des techniques d'immunohistologie sur l'induction de la phosphorylation de STAT3 et de l'expression de YAP. De même, des analyses par la technique de single cell RNAseq apporterait des informations sur la possibilité de relations entre les cellules Lgr5<sup>+</sup> et les ILC3 *via* le récepteur de l'IL-22

### **Nos résultats ont mis en évidence que l'efficacité du traitement par la SVF repose sur:**

- Un recrutement des monocytes inflammatoires afin de constituer un pool important de macrophages.
- Des interactions entre CCR2-Cx3CR1 afin de faciliter l'adhérence des monocytes inflammatoires à l'endothélium.
- Une accélération de la maturation des monocytes vers un monocyte-macrophage capable de promouvoir le processus anti-inflammatoire et la réparation du compartiment des cellules souches, probablement avec une implication de l'IL-10.
- La possibilité de synergies entre différentes cellules immunitaires (neutrophiles et ILC) et les monocytes.
- Des stimulations de voies de signalisation impliquées dans la régénération de la crypte différentes d'une régénération homéostatique.

L'ensemble de ces critères favorise le maintien de la niche des cryptes et protègent et/ou stimulent les cellules souches intestinales des effets génotoxiques de l'irradiation.

### **Axe 3 : Les Facteurs pouvant influencer l'efficacité thérapeutique de la SVF**

La SVF a montré une efficacité thérapeutique dans notre modèle de SGI, cependant des paramètres peuvent remettre en cause son efficacité. La fenêtre d'injection de la SVF est un paramètre important à connaître vu le délai extrêmement court pour le traitement. Des résultats préliminaires non présentés dans ces travaux montrent une perte de l'efficacité au-delà de 24h post-irradiation. Par conséquent, la fenêtre thérapeutique est un élément à prendre en considération dans le traitement du SGI radio induit.

Dans le cas d'exposition accidentelle aux rayonnements ionisants à forte dose sur un large volume la notion de fenêtre thérapeutique est depuis longtemps prise en considération. Une étude a montré qu'après irradiation corps entier de 7 à 10 Gy chez la souris, un traitement basé sur l'utilisation de thrombopoïétine dans le but de stimuler l'hématopoïèse était efficace en tant que radioprotectant (injecté avant l'irradiation) ou dans un délai très rapide après l'irradiation. A 24 heures post-irradiation, la thrombopoïétine perd son efficacité

thérapeutique (Mouthon *et al.*,2002). Une autre étude a également mis en évidence dans un modèle d'irradiation corps entier, que l'injection d'un agoniste du TLR5, la flagelline, agit en protégeant les tissus radiosensibles de l'apoptose. Cette efficacité thérapeutique a été observée lorsque la flagelline était injectée avant exposition et 24 heures post-irradiation (Brackett *et al.*,2021).

La fenêtre thérapeutique étroite observée dans un syndrome aigu d'irradiation peut s'expliquer par la vague d'apoptose qui intervient de façon précoce après l'irradiation. Une première vague apoptotique visant les cellules souches de l'intestin survient entre 3 heures à 6 heures post-irradiation puis une deuxième vague à 24 heures post- irradiation avec un effet 12 fois plus important (Potten and Grant,1998). Dans cette même étude de Potten *et al.* il a été mis en évidence qu'à 48 heures post-irradiation, l'apoptose était localisée dans les régions supérieures de la crypte vers la position +5. Le mécanisme de la mort cellulaire a été identifié avec 30% de la mortalité des cellules souches avant les 24 premières heures et 60% après 24 heures (Hua *et al.*,2012). Le SGI est en majorité la conséquence de la mort clonogénique des cellules de la crypte intestinale qui impacte la ré-épithélialisation normale des villosités intestinales. Le SGI est aussi caractérisé par une production excessive de cytokines pro-inflammatoires qui reste encore très élevée 7 jours post-irradiation (Bensemmane *et al.*,2021). Un lien étroit entre l'orage cytokinique et l'initiation de l'apoptose a été décrit pour certaines pathologies (Karki *et al.*,2021).

Nos études préliminaires semblent montrer que le traitement par la SVF n'est efficace que lorsque l'orage cytokinique et l'apoptose ne sont pas exacerbés. Une des mesures serait de combiner le traitement par la SVF à des agents ayant des propriétés anti-apoptotiques et anti-inflammatoires afin de limiter l'amplification de ces effets.

### ***Possibilité d'une combinaison thérapeutique***

La plasticité des cellules joue un rôle central dans la régénération et ainsi peut fournir de nouvelles voies pour contrôler les dommages. Les ligands de la voie Wnt/ $\beta$ -catenin sont des facteurs critiques de la plasticité particulièrement pour stimuler les signaux contribuant à l'auto-renouvellement des CSI, à la prolifération et la différenciation. La voie Wnt est fortement impliquée dans la régénération épithéliale après irradiation (Ashton *et al.*,2010).

L'inhibition de la voie Wnt réduit la prolifération et altère l'homéostasie épithéliale (Valenta *et al.*,2016) et inversement sa stimulation *in vitro* et *in vivo* induit la prolifération de l'épithélium (Farin *et al.*,2012). La glycogène synthase kinase 3 (GSK3), une protéine kinase constitutivement active, est le principal régulateur de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Hedgepeth *et al.*,1997). Il a été démontré que l'inhibition de la GSK3 augmente la niche de cellules souches en stimulant la signalisation des cellules de Paneth et des cellules souches (Farin *et al.*,2012). L'inhibition de la GSK3 par le lithium favorise la transcription médiée par la  $\beta$ -caténine, la voie effectrice nucléaire de la signalisation Wnt (Snitow *et al.*,2021). Le lithium possède la particularité d'être déjà prescrit chez l'homme avec des effets secondaires minimes (fatigue, sensoriel émoussé, diminution de la capacité de concentration urinaire). Une étude pilote montre que le traitement par le lithium induit chez 67% des patients une rémission complète de la GVHD (avec restauration de la muqueuse) et une survie à plus d'1 an lorsque l'administration de lithium commence dans les 3 jours consécutifs au diagnostic endoscopique de la dénudation de la muqueuse épithéliale (Steinbach *et al.*, 2017). Une étude récente a montré l'efficacité du lithium dans la régénération intestinale dans un modèle de GVHD chez la souris. Le traitement par le lithium a permis de stimuler les cellules Lgr5<sup>+</sup> ainsi que les cellules de Paneth limitant la perte des cryptes intestinales (Koyama *et al.*,2023). Ces résultats font que le ciblage de l'inhibition de la voie GSK3 est potentiellement une stratégie anti-apoptotique pour potentialiser les effets de la SVF dans le SGI radio-induit.

#### ***L'efficacité thérapeutique pourrait dépendre de sa composition cellulaire.***

D'autres paramètres peuvent influencer l'efficacité thérapeutique de la SVF comme sa composition cellulaire. Une étude a montré que selon l'endroit du prélèvement de la SVF, sa composition pouvait varier. La SVF préparée à partir du tissu adipeux blanc possédait plus de progéniteurs hématopoïétiques et de macrophages lui conférant plus de plasticité par rapport à la SVF préparée à partir du tissu adipeux brun (Prunet-Marcassus *et al.*2006). Soulignant que pour un modèle de pathologie donnée, les sites de prélèvement de la SVF doivent être homogénéisés entre les études.

Les résultats de cette thèse ont montré que lorsque la SVF était déplétée en cellules CD11b<sup>+</sup>, celle-ci perdait son efficacité thérapeutique sur la réparation du compartiment cellule souche

limitant la survie (30% de survie contre 70% avant déplétion). Une étude a montré chez la souris, que les cellules CD11b<sup>+</sup> présentes dans la SVF sont nécessaires à la fonction vasculaire de la SVF dans des conditions inflammatoires (Morris *et al.*,2015). Ainsi pour définir le véritable potentiel thérapeutique de la SVF il est important d'évaluer séparément le potentiel de chaque composant cellulaire qui a été identifié dans la SVF à ce jour. En effet, la composition cellulaire de la SVF varie entre les études. Une étude avait montré que la SVF humaine était composée de progéniteurs endothéliaux et de cellules souches mésenchymateuses (Bourin *et al.*,2013). Dans une autre étude, le phénotypage montre 4 groupes de populations cellulaires : les cellules souches mésenchymateuses, les cellules endothéliales, les cellules souches ainsi que les cellules souches hématopoïétiques (Klar *et al.*,2016). Récemment, l'analyse phénotypique révèle qu'elle était composée en majorité de cellules souches mésenchymateuses (43,9%), de cellules endothéliales (6,1%), de leucocytes comprenant majoritairement des monocytes/macrophages (16,4%) et des lymphocytes (13,6%) (Magalon *et al.*,2019). Chez la souris, la composition de la SVF ne varie pas significativement de celle de l'homme. Elle est composée de cellules endothéliales (25%), de cellules myéloïdes (22%), les cellules CD45<sup>+</sup> représentant environ 20% de la population totale cellulaire (Morris *et al.*,2015).

La variabilité observée entre les différentes études s'explique par la diversité des marqueurs portés par les cellules ; il n'existe pas de marqueurs uniques par catégorie de cellule, cela souligne le besoin de standardiser un set de marqueur afin de pouvoir comparer les efficacités thérapeutiques de la SVF entre les études (Ramakrishnan and Boyd ;2018). Plusieurs études se concentrent sur le développement d'un isolement de la SVF automatisé ou semi-automatisé pour standardiser l'utilisation de la SVF (Hanke *et al.*,2016).

**Dans le contexte du SGI, la graisse prélevée pourrait se localiser dans un territoire irradié ;** ce qui pourrait modifier potentiellement sa composition cellulaire. Le maintien de l'efficacité thérapeutique devra être validé dans cette condition.

**Une autre problématique pourrait émerger et influencer l'efficacité thérapeutique de la SVF, il s'agit de la SVF provenant de patients obèses ou immunodéficients.** En effet, il est admis que l'obésité induit une accumulation de macrophages dans le tissu adipeux. Ces macrophages de type M1 sont associés à une inflammation chronique en produisant des molécules pro-inflammatoires (Subramanian and Ferrante,2009). Une étude a montré que la

SVF isolée de patients obèses a un ratio monocytes/macrophages faussé avec un taux de macrophages M1 élevé par rapport aux sujets non obèses (Silva *et al.*,2015). Cette modification de la composition pourrait exercer une influence sur l'efficacité thérapeutique de la SVF. Expérimentalement, l'efficacité thérapeutique de la SVF isolée de souris obèses pourrait être évaluée sur notre modèle de SGI. L'utilisation de souris NOD/SCID pourrait également être intéressante pour évaluer l'efficacité thérapeutique de la SVF issue de sujets immunodéficients.

**La conservation de la SVF pouvant diminuer sa qualité est un paramètre non négligeable.**

Peu d'études ont rapporté le phénotype de la SVF lorsqu'elle est conservée dans le temps avant l'injection. Les études se sont principalement concentrées sur le rendement d'obtention de la SVF ainsi que sur l'expansion des CSMs issues du tissu adipeux (Matsumoto *et al.*,2007), (Carvalho *et al.*,2011). Une étude de Svalgaard *et al.* s'est intéressée à comparer la composition cellulaire de la SVF lorsqu'elle est stockée de 2 à 48 heures après son prélèvement à température ambiante et à 4°C. A la température ambiante, la conservation des monocytes est le plus impacté avec la présence d'un pourcentage d'environ 18% à 2 heures après le prélèvement qui chute à 6% à 8 heures après le prélèvement. Lorsque l'on compare le pourcentage de monocytes à 4°C celui-ci ne varie pas drastiquement dans le temps, passant de 6% à 8 heures à 4% à 24 heures post-prélèvement. Cependant, de manière surprenante les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ne sont pas affectés dans le temps. La population des cellules souches dérivant de la SVF diminue également dans le temps passant de 66% à 2 heures à 48% à 48 heures post-prélèvement. Le stockage de la SVF impacte également la capacité proliférative des CSMs du tissu adipeux après leur mise en culture (Svalgaard *et al.*,2020). Cette étude met en avant à la fois l'effet de la température et du stockage sur la qualité de la SVF qui impactent son efficacité thérapeutique. Ces deux conditions limites de conservation de la SVF (température et délai de stockage) pourront être évaluées sur notre modèle de SGI dans le contexte d'assurer une logistique pour un traitement d'un nombre important de patients.

**La technique d'isolement peut impacter le rendement d'obtention de la SVF.**

Il existe deux techniques d'isolement de la SVF : mécanique et/ou enzymatique. La technique mécanique consiste en des vibrations du tissu adipeux, centrifugation et des lavages du lipoaspirat dans un automate fermé (Aronowitz *et al.*,2015). La technique enzymatique qui utilise de la collagénase est considérée comme le « gold standard » afin d'isoler la SVF

(Ramakrishnan and Boyd,2018). Une étude a montré en comparant les deux techniques, que lorsque la SVF est digérée enzymatiquement, la population de macrophages/monocytes représente 23% comparée à 7% lorsque la SVF est isolée mécaniquement. Cependant, le pourcentage de cellules CD45<sup>-</sup> par l'isolement mécanique est de 42% contrairement à la digestion enzymatique où le pourcentage n'est plus que de 20% (Tiryaki *et al.*,2020). Aucune différence de viabilité cellulaire entre les deux techniques n'a été observée. En revanche, le rendement d'obtention par la technique mécanique reste moins bon que celui par la technique enzymatique. Les auteurs proposent d'associer les deux techniques (Tiryaki *et al.*,2020). Pour notre étude, la technique enzymatique couplée à une dissociation mécanique a été utilisée nous permettant d'obtenir un produit de thérapie cellulaire avec des populations cellulaires proches des populations obtenues de la SVF humaine (François *et al.*, 2021) et des modèles murins (Morris *et al.*,2015).

**Le rendement et la qualité de la SVF pourrait diminuer en fonction de l'âge et en fonction du genre de l'individu.**

Une étude a comparé la SVF de souris âgées de 6-8 semaines représentant le groupe jeune et des souris âgées de 8-12 semaines représentant le groupe adulte. L'âge des souris de 6-8 semaines correspondrait chez l'homme à un âge situé entre 20-30 ans tandis que l'âge des souris de 8-12 semaines correspondrait chez l'homme à un âge situé entre environ 38-47ans. Il a été montré que la SVF provenant de souris jeunes était composée d'un pourcentage significativement plus haut de leucocytes, de cellules B, de cellules Tregs et de mastocytes en comparaison aux souris adultes (Frazier *et al.*,2018). A âge égal des souris (8-12 semaines) la SVF des souris mâles contenait significativement plus de leucocytes et de progéniteurs endothéliaux en comparaison aux souris femelles (Frazier *et al.*,2018). Ainsi, la composition de la SVF semble être modifiée en fonction de l'âge et du genre de la souris. D'autres études seront nécessaires afin de confirmer ces résultats, dans notre modèle seulement des souris mâles ont été utilisées.

# Conclusion Générale

---

Le syndrome gastro-intestinal est en majorité la conséquence de la mort clonogénique des cellules de la crypte intestinales. Le taux élevé d'auto-renouvellement des cellules souches intestinales rend l'épithélium intestinal très sensible aux fortes doses d'irradiation. Il est alors essentiel d'atténuer les lésions associées à l'irradiation pour surmonter ce syndrome aigu. Le traitement à la SVF a montré avoir une efficacité thérapeutique dans notre modèle de syndrome gastro-intestinal radio-induit, en stimulant les cellules souches du compartiment de la crypte et en immunomodulant la réponse immunitaire associée aux effets liés à l'irradiation. Deux compartiments cibles de la SVF ont été identifiés : le compartiment cellule souche et le compartiment immunitaire.

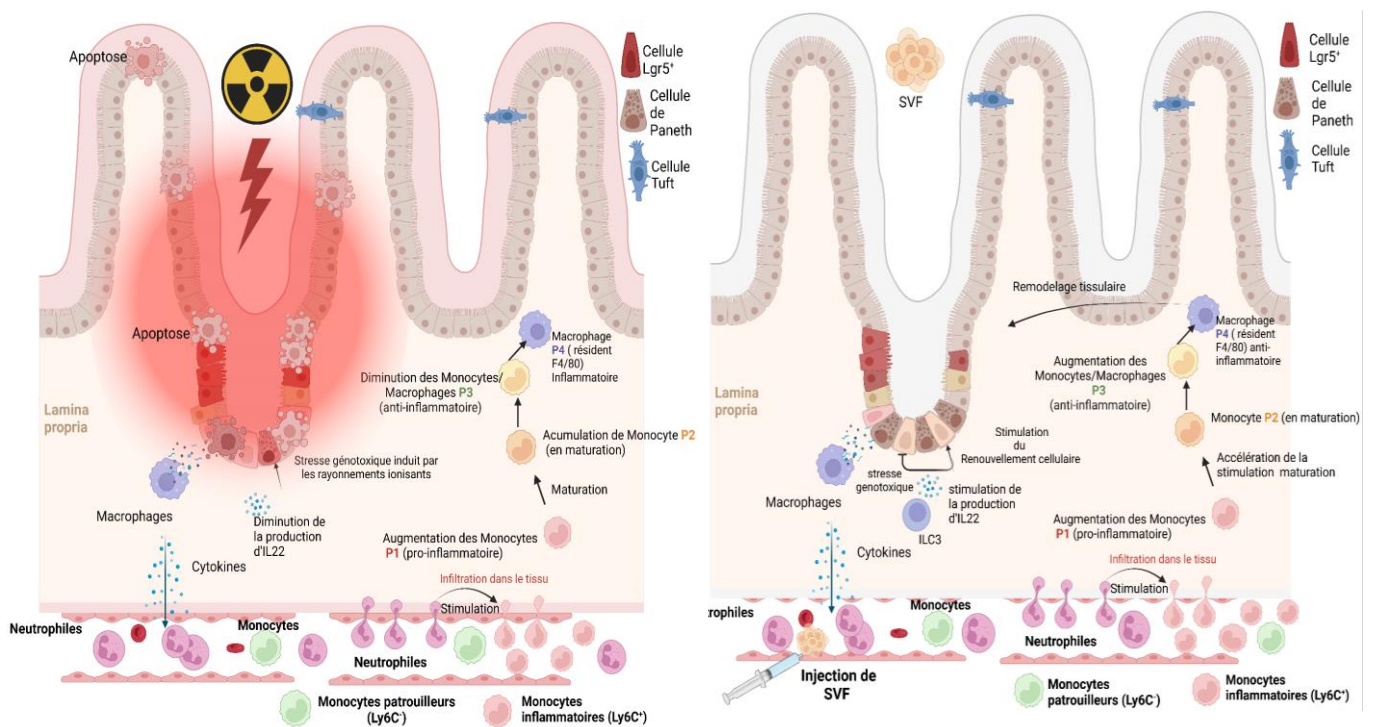
La SVF permet d'initier la régénération épithéliale en stimulant le compartiment cellule souche à travers différents processus et acteurs. Les mécanismes précis de la régénération épithéliale par la SVF restent encore à être clarifiés. Cependant, nous avons montré que la SVF a une forte activité proliférative sur le compartiment cellule souche en augmentant les populations de cellules souches et de cellules de Paneth favorisant la régénération épithéliale avec un maintien de la barrière intestinale et de sa fonction. La régénération de la crypte est associée à une stimulation des voies de signalisation YAP, Notch et Wnt de la crypte.

Il existe un lien étroit entre les cellules immunitaires et la régénération tissulaire. Nous avons montré que la SVF agit à plusieurs niveaux. Elle induit une augmentation du pool de monocyte et accélère leur maturation à acquérir le Cx3Cr1 pour finalement restaurer une population de macrophage avec un phénotype anti-inflammatoire de type M2. Chez les souris dépourvues de Cx3Cr1, le traitement par la SVF n'induit pas de recrutement de monocyte ce qui entraîne un déficit de la population de macrophages qui est associé à un maintien de l'environnement pro-inflammatoire et un défaut de réparation du compartiment cellule souche altérant la survie. De plus, la SVF stimule l'axe CSF1/CSF-1R permettant le maintien de l'homéostasie de la crypte par les macrophages associés à la crypte. La SVF module également les populations de cellules de l'immunité innée et permet la réduction de la réponse immunitaire de type Th1 induite par l'irradiation.



Nous avons montré que les modifications cellulaires de la SVF impactaient l'efficacité thérapeutique. La SVF déplétée en cellules CD11b<sup>+</sup> perd ses propriétés immunomodulatrices, abrogeant la restauration du compartiment des cellules souches ce qui impacte la survie.

**La coopération entre les monocytes présents dans le SVF et le monocyte hôte définit les propriétés thérapeutiques de la SVF nécessaires à son efficacité pour le syndrome gastro-intestinal.** L'utilisation de la SVF comme contremesure médicale dans le syndrome gastro-intestinal radio-induit ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques encourageantes. Ce traitement pourrait être utilisé dans d'autres modèles de pathologies comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.



**Figure 29 :** Schéma illustrant les effets de la SVF sur le compartiment immunitaire. Après injection de la SVF les macrophages résidents dans le tissu vont stimuler le recrutement des neutrophiles au site lésionnel, qui vont entrer dans le tissu et stimuler les monocytes pro-inflammatoires Ly6C<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup>. Les monocytes vont entrer dans le tissu et maturer afin d'exprimer le Cx3Cr1 et donner des macrophages permettant de stimuler le remodelage tissulaire. Les ILCs vont agir également sur le compartiment cellules souches en sécrétant de l'IL-22. *Crée avec Biorender.com*

# Bibliographie

---

- Abrams, H. L. ,1951. Influence of age, body weight, and sex on susceptibility of mice to the lethal effects of X-radiation. *Proc Soc Exp Biol Med*, 76(4), 729-732
- Abt, M. C., Buffie, C. G., Sušac, B., Becattini, S., Carter, R. A., Leiner, I., ... & Pamer, E. G. ,2016. TLR-7 activation enhances IL-22–mediated colonization resistance against vancomycin-resistant enterococcus. *Science transl Med*, 8(327), 327ra25-327ra25.
- Adolph, T. E., Tomczak, M. F., Niederreiter, L., Ko, H. J., Böck, J., Martinez-Naves, E., ... & Blumberg, R. S. ,2013. Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature*, 503(7475), 272-276.
- Aggarwal, S., & Pittenger, M. F. ,2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105(4), 1815-1822.
- Ahluwalia, B., Magnusson, M. K., & Öhman, L. ,2017. Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. *Scand J Gastroenterol*, 52(11), 1185-1193.
- Aihara, E., Engevik, K. A., & Montrose, M. H. ,2017. Trefoil factor peptides and gastrointestinal function. *Annu rev physiol*, 79, 357.
- Alikhan, M. A., Jones, C. V., Williams, T. M., Beckhouse, A. G., Fletcher, A. L., Kett, M. M., ... & Ricardo, S. D. ,2011. Colony-stimulating factor-1 promotes kidney growth and repair via alteration of macrophage responses. *Am J Pathol*, 179(3), 1243-1256.
- Alligier, M., Seyssel, K., Disse, E., & Laville, M. ,2013. Le tissu adipeux: couleur, localisation, fonctions et autres données nouvelles. *Paris: LES ÉDITIONS DE MÉDECINE PRATIQUE*.
- Alt, E. U., Senst, C., Murthy, S. N., Slakey, D. P., Dupin, C. L., Chaffin, A. E., ... & Izadpanah, R. ,2012. Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties. *Stem Cell Res*, 8(2), 215-225.
- Altman, K.I., Okada, S., 1970. *Radiation Biochemistry: Cells*, by S. Okada. Academic Press.
- Alves da Silva, M. L., Costa-Pinto, A. R., Martins, A., Correlo, V. M., Sol, P., Bhattacharya, M., ... & Neves, N. M. ,2015. Conditioned medium as a strategy for human stem cells chondrogenic differentiation. *J Tissue Eng Regen Med*, 9(6), 714-723.
- Andersson, S., Rosell, S., Hjelmquist, U., Chang, D., & Folkers, K. ,1977. Inhibition of gastric and intestinal motor activity in dogs by (Gln4) neurotensin. *Acta physiol Scand*, 100(2), 231-235.
- Andreyev, H. J. N., Wotherspoon, A., Denham, J. W., & Hauer-Jensen, M. ,2010. Defining pelvic-radiation disease for the survivorship era. *Lancet Oncol*, 11(4), 310-312.
- Anno, G. H., Baum, S. J., Withers, H. R., & Young, R. W. ,1989. Symptomatology of acute radiation effects in humans after exposure to doses of 0.5-30 Gy. *Health physics*, 56(6), 821-838.
- Arend, W. P., Malyak, M., Guthridge, C. J., & Gabay, C. ,1998. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol*, 16, 27.

- Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., Van Rooijen, N., Plonquet, A., ... & Chazaud, B. ,2007. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *Journal Exp Med*, 204(5), 1057-1069.
- Aronowitz, J. A., Lockhart, R. A., & Hakakian, C. S. ,2015. Mechanical versus enzymatic isolation of stromal vascular fraction cells from adipose tissue. *Springerplus*, 4, 1-9.
- Arora, S., Dev, K., Agarwal, B., Das, P., & Syed, M. A. ,2018. Macrophages: their role, activation and polarization in pulmonary diseases. *Immunobiol*, 223(4-5), 383-396.
- Artis, D., & Spits, H. ,2015. The biology of innate lymphoid cells. *Nature*, 517(7534), 293-301.
- Ashton, G. H., Morton, J. P., Myant, K., Pheese, T. J., Ridgway, R. A., Marsh, V., ... & Sansom, O. J. ,2010. Focal adhesion kinase is required for intestinal regeneration and tumorigenesis downstream of Wnt/c-Myc signaling. *Dev Cell*, 19(2), 259-269.
- Atreya, R., & Neurath, M. F. ,2010. Factors affecting mucosal homeostasis: a fine balance. *Inflammatory bowel disease: translating basic science into clinical practice*, 52-63.
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., ... & Geissmann, F. ,2007. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*, 317(5838), 666-670.
- Ayyaz, A., Kumar, S., Sangiorgi, B., Ghoshal, B., Gosio, J., Ouladan, S., ... & Gregorieff, A. ,2019. Single-cell transcriptomes of the regenerating intestine reveal a revival stem cell. *Nature*, 569(7754), 121-125.
- Bain, C. C., Montgomery, J., Scott, C. L., Kel, J. M., Girard-Madoux, M. J. H., Martens, L., ... & Mowat, A. M. ,2017. TGF $\beta$  signalling controls CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> dendritic cell development in the intestine. *Nat Commun* 8: 620.
- Bain, C. C., Bravo-Blas, A., Scott, C. L., Gomez Perdiguero, E., Geissmann, F., Henri, S., ... & Mowat, A. M. 2014. Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol*, 15(10), 929-937.
- Bain, C. C., & Mowat, A. M. ,2014. Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunol Rev*, 260(1), 102-117.
- Bain, C. C., Scott, C. L., Uronen-Hansson, H., Gudjonsson, S., Jansson, O., Grip, O., ... & Mowat, A. 2013. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol*, 6(3), 498-510.
- Bajor, A., Gillberg, P. G., & Abrahamsson, H. ,2010. Bile acids: short and long term effects in the intestine. *Scand J. gastrgastroenterol*, 45(6), 645-664.
- Bandekar, M., Maurya, D. K., Sharma, D., & Sandur, S. K. ,,2021. Preclinical Studies and Clinical Prospects of Wharton's Jelly-Derived MSC for Treatment of Acute Radiation Syndrome. *Curr Stem Cell Rep*, 7(2), 85-94.
- Bandekar, M., Maurya, D. K., Sharma, D., Checker, R., Gota, V., Mishra, N., & Sandur, S. K. ,2020. Xenogeneic transplantation of human WJ-MSCs rescues mice from acute radiation syndrome via Nrf-2-dependent regeneration of damaged tissues. *Am J Transplant*, 20(8), 2044-2057.
- Barker, N. ,2014. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(1), 19-33.

- Barker, N., Van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., Van Den Born, M., Cozijnsen, M., ... & Clevers, H. ,2007. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*, 449(7165), 1003-1007.
- Basak, O., van de Born, M., Korving, J., Beumer, J., van der Elst, S., van Es, J. H., & Clevers, H. ,2014. Mapping early fate determination in *Lgr5+* crypt stem cells using a novel *Ki67-RFP* allele. *EMBO J*, 33(18), 2057-2068.
- Becker, M., Güttler, S., Bachem, A., Hartung, E., Mora, A., Jäkel, A., ... & Kroczek, R. A. ,2014. Ontogenic, phenotypic, and functional characterization of *XCR1+* dendritic cells leads to a consistent classification of intestinal dendritic cells based on the expression of *XCR1* and *SIRP $\alpha$* . *Front in Immunol*, 5, 326.
- Bensemmane, L., Squiban, C., Demarquay, C., Mathieu, N., Benderitter, M., Le Guen, B., ... & Linard, C. ,2021. The stromal vascular fraction mitigates radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice. *Stem cell res ther*, 12(1), 1-14.
- Berebichez-Fridman, R., & Montero-Olvera, P. R. ,2018. Sources and clinical applications of mesenchymal stem cells: state-of-the-art review. *Sultan Qaboos Univ Med J*, 18(3), e264.
- Berger, M. E., Christensen, D. M., Lowry, P. C., Jones, O. W., & Wiley, A. L. ,2006. Medical management of radiation injuries: current approaches. *Occupational Medicine*, 56(3), 162-172.
- Bernardo, D., Marin, A. C., Fernández-Tomé, S., Montalban-Arques, A., Carrasco, A., Tristán, E., ... & Gisbert, J. P. ,2018. Human intestinal pro-inflammatory *CD11c<sup>high</sup>CCR2<sup>+</sup> CX3CR1<sup>+</sup>* macrophages, but not their tolerogenic *CD11c<sup>-</sup> CCR2<sup>-</sup> CX3CR1<sup>-</sup>* counterparts, are expanded in inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol*, 11(4), 1114-1126.
- Bevins, C. L., & Salzman, N. H. ,2011. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol*, 9(5), 356-368.
- Bhat, K., Duhachek-Muggy, S., Ramanathan, R., Saki, M., Alli, C., Medina, P., ... & Pajonk, F. ,2019. 1-[(4-Nitrophenyl) sulfonyl]-4-phenylpiperazine increases the number of Peyer's patch-associated regenerating crypts in the small intestines after radiation injury. *Radiother Oncol*, 132, 8-15.
- Bi, H., Li, H., Zhang, C., Mao, Y., Nie, F., Xing, Y., ... & Tan, H. ,2019. Stromal vascular fraction promotes migration of fibroblasts and angiogenesis through regulation of extracellular matrix in the skin wound healing process. *Stem Cell Res Ther*, 10(1), 1-21.
- Bienenstock, J., Macqueen, G., Sestini, P., Marshall, J. S., Stead, R. H., & Perdue, M. H. 1991. Mast cell/nerve interactions in vitro and in vivo. *Am Rev Resp Dis*, 143(3\_pt\_2), S55-S58.
- Biffi, W. L., Moore, E. E., Zallen, G., Johnson, J. L., Gabriel, J., Offner, P. J., & Silliman, C. C. 1999. Neutrophils are primed for cytotoxicity and resist apoptosis in injured patients at risk for multiple organ failure. *Surgery*, 126(2), 198-202.
- Biju, P. G., Garg, S., Wang, W., Choudhry, M. A., Kovacs, E. J., Fink, L. M., & Hauer-Jensen, M. ,2012. Procalcitonin as a predictive biomarker for total body irradiation induced bacterial load and lethality in mice. *Shock (Augusta, Ga.)*, 38(2), 170.
- Bijvelds, M. J., Jorna, H., Verkade, H. J., Bot, A. G., Hofmann, F., Agellon, L. B., ... & de Jonge, H. R. ,2005. Activation of CFTR by ASBT-mediated bile salt absorption. *Am J Physiol*, 289(5), G870-G879.

- Billiard, F., Buard, V., Benderitter, M., & Linard, C. ,2011. Abdominal  $\gamma$ -radiation induces an accumulation of function-impaired regulatory T cells in the small intestine. *Int J Radiation Oncol Biol Phy*, 80(3), 869-876.
- Biswas, S., Davis, H., Irshad, S., Sandberg, T., Worthley, D., & Leedham, S. ,2015. Microenvironmental control of stem cell fate in intestinal homeostasis and disease. *J Pathol*, 237(2), 135-145.
- Biton, M., Haber, A. L., Rogel, N., Burgin, G., Beyaz, S., Schnell, A., ... & Xavier, R. J. ,2018. T helper cell cytokines modulate intestinal stem cell renewal and differentiation. *Cell*, 175(5), 1307-1320.
- Bjerknes, M., & Cheng, H. ,2001. Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons. *Proc Natl Acad Sci*, 98(22), 12497-12502.
- Bjerknes, M., & Cheng, H. ,1999. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterol*, 116(1), 7-14.
- Blaber, S. P., Webster, R. A., Hill, C. J., Breen, E. J., Kuah, D., Vesey, G., & Herbert, B. R. ,2012. Analysis of in vitro secretion profiles from adipose-derived cell populations. *Journal of translational medicine*, 10(1), 1-16.
- Blirando, K., Milliat, F., Martelly, I., Sabourin, J. C., Benderitter, M., & François, A. ,2011. Mast cells are an essential component of human radiation proctitis and contribute to experimental colorectal damage in mice. *Am J Pathol*, 178(2), 640-651.
- Boerma, M., Wang, J., Richter, K. K., & Hauer-Jensen, M. ,2006. Orazipone, a locally acting immunomodulator, ameliorates intestinal radiation injury: a preclinical study in a novel rat model. *Int J Radiat Oncol Biol Phy*, 66(2), 552-559.
- Booth, C., Booth, D., Williamson, S., Demchyshyn, L. L., & Potten, C. S. ,2004. Teduglutide ([Gly2] GLP-2) protects small intestinal stem cells from radiation damage. *Cell Prolif*, 37(6), 385-400.
- Botha, A. J., Moore, F. A., Moore, E. E., Sauaia, A., Banerjee, A., & Peterson, V. M. ,1995. Early neutrophil sequestration after injury: a pathogenic mechanism for multiple organ failure. *J Trauma*, 39(3), 411-417.
- Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., ... & Gimble, J. M. ,2013. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 15(6), 641-648.
- Bowles, A. C., Wise, R. M., Gerstein, B. Y., Thomas, R. C., Ogelman, R., Febbo, I., & Bunnell, B. A. ,2017. Immunomodulatory effects of adipose stromal vascular fraction cells promote alternative activation macrophages to repair tissue damage. *Stem Cells*, 35(10), 2198-2207.
- Brackett, C. M., Greene, K. F., Aldrich, A. R., Trageser, N. H., Pal, S., Molodtsov, I., ... & Gudkov, A. V. ,2021. Signaling through TLR5 mitigates lethal radiation damage by neutrophil-dependent release of MMP-9. *Cell Death Discov*, 7(1), 1-10.
- Brinkmann, V. ,2018. Neutrophil extracellular traps in the second decade. *J Innate Immun*, 10(5-6), 414-421.

- Buczacki, S. J., Zecchini, H. I., Nicholson, A. M., Russell, R., Vermeulen, L., Kemp, R., & Winton, D. J. ,2013. Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature*, 495(7439), 65-69.
- Buela, K. A. G., Omenetti, S., & Pizarro, T. T. (2015). Crosstalk between type 3 innate lymphoid cells and the gut microbiota in inflammatory bowel disease. *Cur Opin Gastroenterol*, 31(6), 449.
- Buell, M. G., & Harding, R. K. ,1989. Proinflammatory effects of local abdominal irradiation on rat gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci*, 34(3), 390-399.
- Butterworth, K. T., & Williams, J. P. ,2021. Animal models for radiotherapy research: all (animal) models are wrong but some are useful. *Cancers*, 13(6), 1319.
- Cadwell, K., Liu, J. Y., Brown, S. L., Miyoshi, H., Loh, J., Lennerz, J. K., ... & Virgin Iv, H. W. ,2008. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*, 456(7219), 259-263.
- Cagliani, J., Grande, D., Molmenti, E. P., Miller, E. J., & Rilo, H. L. ,2017. Immunomodulation by mesenchymal stromal cells and their clinical applications. *J Stem Cell Regenerative biology*, 3(2).
- Cai, J., Zhang, N., Zheng, Y., De Wilde, R. F., Maitra, A., & Pan, D. ,2010. The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program. *Genes Dev*, 24(21), 2383-2388.
- Cailhier, J. F., Partolina, M., Vuthoori, S., Wu, S., Ko, K., Watson, S., ... & Lang, R. A. ,2005. Conditional macrophage ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. *J Immunol*, 174(4), 2336-2342.
- Cao, X., Duan, L., Hou, H., Liu, Y., Chen, S., Zhang, S., ... & Li, Z. ,2020. IGF-1C hydrogel improves the therapeutic effects of MSCs on colitis in mice through PGE2-mediated M2 macrophage polarization. *Theranostics*, 10(17), 7697.
- Caplan, A. I. ,1991. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9(5), 641-650.
- Cario, E., Gerken, G., & Podolsky, D. K. ,2007. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterol*, 132(4), 1359-1374.
- Carnell, L. S. ,2021. Spaceflight medical countermeasures: A strategic approach for mitigating effects from solar particle events. *Int J Radiat Biol*, 97(sup1), S125-S131.
- Carnell, L., Blattnig, S., Hu, S., Huff, J., Kim, M. H., Norman, R., ... & Wu, H. ,2016. Evidence report: risk of acute radiation syndromes due to solar particle events (No. JSC-CN-35747).
- Carol, M., Lambrechts, A., Van Gossum, A., Libin, M., Goldman, M., & Mascart-Lemone, F. ,1998. Spontaneous secretion of interferon  $\gamma$  and interleukin 4 by human intraepithelial and lamina propria gut lymphocytes. *Gut*, 42(5), 643-649.
- Carulli, A. J., Keeley, T. M., Demitrack, E. S., Chung, J., Maillard, I., & Samuelson, L. C. ,2015. Notch receptor regulation of intestinal stem cell homeostasis and crypt regeneration. *Dev Biol*, 402(1), 98-108.
- Carvalho, P. P., Wu, X., Yu, G., Dias, I. R., Gomes, M. E., Reis, R. L., & Gimble, J. M. ,2011. The effect of storage time on adipose-derived stem cell recovery from human lipoaspirates. *Cells Tissues Organs*, 194(6), 494-500.

- Casteilla, L., Pénicaud, L., Cousin, B., & Calise, D. ,2008. Choosing an adipose tissue depot for sampling. In *Adipose tissue protocols* (pp. 23-38). Humana Press.
- Casteilla, L., & Dani, C. ,2006. Adipose tissue-derived cells: from physiology to regenerative medicine. *Diabetes Metab*, 32(5), 393-401.
- Cerri, M., Tinganelli, W., Negrini, M., Helm, A., Scifoni, E., Tommasino, F., ... & Durante, M. ,2016. Hibernation for space travel: Impact on radioprotection. *Life Sci in Space Res*, 11, 1-9.
- Chahal, J., Gómez-Aristizábal, A., Shestopaloff, K., Bhatt, S., Chaboureau, A., Fazio, A., ... & Viswanathan, S. ,2019. Bone marrow mesenchymal stromal cell treatment in patients with osteoarthritis results in overall improvement in pain and symptoms and reduces synovial inflammation. *Stem Cells Transl Med*, 8(8), 746-757.
- Chapman, J.D., Gillespie, C.J., 1981. Radiation-Induced Events and Their Time Scale in Mammalian Cells, in: Lett, J.T., Adler, H. (Eds.), *Advances in Radiation Biology*, *Advances in Radiation Biology*. Elsevier, pp. 143–198.
- Chapman, J.R., Taylor, M.R.G., Boulton, S.J., 2012. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol. Cell* 47, 497–510.
- Chary, S., & Thomson, D. H. ,1984. A clinical trial evaluating cholestyramine to prevent diarrhea in patients maintained on low-fat diets during pelvic radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 10(10), 1885-1890.
- Chen, D., Tang, T. X., Deng, H., Yang, X. P., & Tang, Z. H. ,2021. Interleukin-7 biology and its effects on immune cells: mediator of generation, differentiation, survival, and homeostasis. *Front Immunol*, 5156.
- Chen, L. B., Jiang, X. B., & Yang, L. ,2004. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol: WJG*, 10(20), 3016.
- Chen, Y., Chou, K., Fuchs, E., Havran, W. L., & Boismenu, R. ,2002. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial  $\gamma\delta$  T cells. *Proc Natl Acad Sci*, 99(22), 14338-14343.
- Cheng, L. K., O'Grady, G., Du, P., Egbuji, J. U., Windsor, J. A., & Pullan, A. J. ,2010. Gastrointestinal system. *Wiley Interdiscip Rev: Syst Biol Med*, 2(1), 65-79.
- Cheng, H., & Leblond, C. P. ,1974. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat*, 141(4), 537-561.
- Cheroutre, H., Lambolez, F., & Mucida, D. ,2011. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat Rev Immunol*, 11(7), 445-456.
- Chitu, V., & Stanley, E. R. ,2006. Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr Opin Immunol*, 18(1), 39-48.
- Chng, S. H., Kundu, P., Dominguez-Brauer, C., Teo, W. L., Kawajiri, K., Fujii-Kuriyama, Y., ... & Pettersson, S. 2016. Ablating the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in CD11c+ cells perturbs intestinal epithelium development and intestinal immunity. *Sci Rep*, 6(1), 1-14.
- Choi, J. S., Chae, D. S., Ryu, H. A., & Kim, S. W. ,2019. Transplantation of human adipose tissue derived-SVF enhance liver function through high anti-inflammatory property. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1864(12), 158526.

- Choudhery, M. S., Badowski, M., Muise, A., Pierce, J., & Harris, D. T. ,2014. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med*, 12(1), 1-14.
- Chousterman, B. G., Boissonnas, A., Poupel, L., de Chanville, C. B., Adam, J., Tabibzadeh, N., ... & Combadière, C. ,2016. Ly6Chigh monocytes protect against kidney damage during sepsis via a CX3CR1-dependent adhesion mechanism. *J Am Soc Nephrol*, 27(3), 792-803.
- Ciorba, M. A., Riehl, T. E., Rao, M. S., Moon, C., Ee, X., Nava, G. M., ... & Stenson, W. F. ,2012. Lactobacillus probiotic protects intestinal epithelium from radiation injury in a TLR-2/cyclooxygenase-2-dependent manner. *Gut*, 61(6), 829-838.
- Clevers, H., Loh, K. M., & Nusse, R. ,2014. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science*, 346(6205), 1248012.
- Clevers, H. C., & Bevins, C. L. ,2013. Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. *Annual review of physiology*, 75, 289-311.
- Cohn, S. M., Schloemann, S., Tessner, T., Seibert, K., & Stenson, W. F. ,1997. Crypt stem cell survival in the mouse intestinal epithelium is regulated by prostaglandins synthesized through cyclooxygenase-1. *J clin invest*, 99(6), 1367-1379.
- Comella, K., Parlo, M., Daly, R., & Dominessy, K. ,2018. First-in-man intravenous implantation of stromal vascular fraction in psoriasis: a case study. *Int Med Case Rep J*, 11, 59.
- Conklin, J. J., & Walker, R. I. ,1987. Diagnosis, triage and treatment of casualties. *Military radiobiology*, 1, 231-240.
- Conte, F. P., Melville Jr, G. S., & Upton, A. C. ,1956. Effects of graded doses of whole-body X-irradiation on mast cells in the rat mesentery. *American J. Physio. Leg. Co.* , 187(1), 160-162.
- Coombes, J. L., Siddiqui, K. R., Arancibia-Cárcamo, C. V., Hall, J., Sun, C. M., Belkaid, Y., & Powrie, F. ,2007. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- $\beta$ -and retinoic acid-dependent mechanism. *Journal Expl Med*, 204(8), 1757-1764.
- Coombes, J. L., & Maloy, K. J. ,2007. Control of intestinal homeostasis by regulatory T cells and dendritic cells. In *Seminars in immunology* (Vol. 19, No. 2, pp. 116-126). Academic Press.
- Corpron, R. E. ,1966. The ultrastructure of the gastric mucosa in normal and hypophysectomized rats. *Am J Anat*, 118(1), 53-89.
- Cosin-Roger, J., Ortiz-Masia, D., Calatayud, S., Hernandez, C., Esplugues, J. V., & Barrachina, M. D. ,2016. The activation of Wnt signaling by a STAT6-dependent macrophage phenotype promotes mucosal repair in murine IBD. *Mucosal Immunol*, 9(4), 986-998.
- Cousin, B., Caspar-Bauguil, S., Planat-Bénard, V., Laharrague, P., Pénicaud, L., & Casteilla, L. ,2006. Adipose tissue: a subtle and complex cell system. *Journal de la Societe de biologie*, 200(1), 51-57.
- Cowland, J. B., & Borregaard, N. ,2016. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol Rev*, 273(1), 11-28.



- Dai, X. M., Zong, X. H., Sylvestre, V., & Stanley, E. R. ,2004. Incomplete restoration of colony-stimulating factor 1 (CSF-1) function in CSF-1-deficient *Csf1 op/Csf1 op* mice by transgenic expression of cell surface CSF-1. *Blood*, 103(3), 1114-1123.
- Dainiak, N., & Albanese, J. ,2022. Medical management of acute radiation syndrome. *J. Radio Pro*, 42(3), 031002.
- Deans, R. J., & Moseley, A. B. ,2000. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp hematol*, 28(8), 875-884.
- Deitch, E. A., Ma, L., Ma, J. W., & Berg, R. D. ,1989. Lethal burn-induced bacterial translocation: role of genetic resistance. *J. trauma*, 29(11), 1480-1487.
- DelaRosa, O., Lombardo, E., Beraza, A., Mancheno-Corvo, P., Ramirez, C., Menta, R., ... & Büscher, D. ,2009. Requirement of IFN- $\gamma$ -mediated indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. *Tissue Engineering Part A*, 15(10), 2795-2806.
- De Oliveira, S., Reyes-Aldasoro, C. C., Candel, S., Renshaw, S. A., Mulero, V., & Calado, Â. ,2013. *Cxcl8* (IL-8) mediates neutrophil recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory response. *J Immunol*, 190(8), 4349-4359.
- Desalegn, G., & Pabst, O. 2019. Inflammation triggers immediate rather than progressive changes in monocyte differentiation in the small intestine. *Nat Commun*, 10(1), 1-14.
- De Schepper, S., Stakenborg, N., Matteoli, G., Verheijden, S., & Boeckxstaens, G. E. 2018. Muscularis macrophages: Key players in intestinal homeostasis and disease. *Cell Immunol*, 330, 142-150.
- Dias, V. C., Shaffer, E. A., Wallace, J. L., & Parsons, H. G. ,1994. Bile salts determine leukotriene B4 synthesis in a human intestinal cell line (CaCo-2). *Dig dis sci*, 39(4), 802-808.
- DiCarlo, A. L., Perez Horta, Z., Rios, C. I., Satyamitra, M. M., Taliaferro, L. P., & Cassatt, D. R. ,2021. Study logistics that can impact medical countermeasure efficacy testing in mouse models of radiation injury. *Int J Radiat Biol* 97(sup1), S151-S167.
- Dignass, A. U., Tsunekawa, S., & Podolsky, D. K. ,1994. Fibroblast growth factors modulate intestinal epithelial cell growth and migration. *Gastroenterol*, 106(5), 1254-1262.
- Dinareello, C. A. ,2005. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med*, 201(9), 1355-1359.
- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., ... & Gianni, A. M. ,2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99(10), 3838-3843.
- Di Taranto, G., Cicione, C., Visconti, G., Isgrò, M. A., Barba, M., Di Stasio, E., ... & Lattanzi, W. ,2015. Qualitative and quantitative differences of adipose-derived stromal cells from superficial and deep subcutaneous lipoaspirates: a matter of fat. *Cytotherapy*, 17(8), 1076-1089.
- Dominici, M. L. B. K., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... & Horwitz, E. M. ,2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.
- Doyle-Eisele, M., Brower, J., Aiello, K., Ferranti, E., Yaeger, M., Wu, G., & Weber, W. ,2021. Developing and comparing models of hematopoietic-acute radiation syndrome in Göttingen and Sinclair minipigs. *Int J Radiation Biol*, 97(sup1), S73-S87.

- Drucker, D. J., Deforest, L., & Brubaker, P. L. ,1997. Intestinal response to growth factors administered alone or in combination with human [Gly<sup>2</sup>] glucagon-like peptide 2. *Am J Physiol*, 273(6), G1252-G1262.
- Du, Y., Rong, L., Cong, Y., Shen, L., Zhang, N., & Wang, B. 2021. Macrophage polarization: an effective approach to targeted therapy of inflammatory bowel disease. *Expert Opin Ther Targets*, 25(3), 191-209.
- Dubey, N. K., Mishra, V. K., Dubey, R., Deng, Y. H., Tsai, F. C., & Deng, W. P. ,2018. Revisiting the advances in isolation, characterization and secretome of adipose-derived stromal/stem cells. *Int J Mol Sci*, 19(8), 2200.
- Dublineau, I., Ksas, B., Aigueperse, J., Gourmelon, P., & Griffiths, N. M. ,1998. In vivo alterations of fluid and electrolyte fluxes in rat colon by gamma irradiation. *Digestive diseases and sciences*, 43(3), 652-662.
- Duffy, M. M., Ritter, T., Ceredig, R., & Griffin, M. D. ,2011. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther*, 2(4), 1-9.
- Duijvestein, M., Vos, A. C. W., Roelofs, H., Wildenberg, M. E., Wendrich, B. B., Verspaget, H. W., ... & Hommes, D. W. ,2010. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut*, 59(12), 1662-1669.
- Du Plessis, J., Vanheel, H., Janssen, C. E., Roos, L., Slavik, T., Stivaktas, P. I., ... & Van der Merwe, S. W. ,2013. Activated intestinal macrophages in patients with cirrhosis release NO and IL-6 that may disrupt intestinal barrier function. *J Hepatol*, 58(6), 1125-1132.
- Dykstra, J. A., Facile, T., Patrick, R. J., Francis, K. R., Milanovich, S., Weimer, J. M., & Kota, D. J. ,2017. Concise review: fat and furious: harnessing the full potential of adipose-derived stromal vascular fraction. *Stem Cells Transl Med*, 6(4), 1096-1108
- Eash, K. J., Greenbaum, A. M., Gopalan, P. K., & Link, D. C. ,2010. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest*, 120(7), 2423-2431.
- Elewaut, D., DiDonato, J. A., Kim, J. M., Truong, F., Eckmann, L., & Kagnoff, M. F. ,1999. NF- $\kappa$ B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria. *J Immunol*, 163(3), 1457-1466.
- Engevik, A. C., & Goldenring, J. R. 2018. Trafficking ion transporters to the apical membrane of polarized intestinal enterocytes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10(1), a027979.
- Ermund, A., Schuette, A., Johansson, M. E., Gustafsson, J. K., & Hansson, G. C. ,2013. Gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location-1. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, Peyer's patches and colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.
- Evrard, M., Kwok, I. W., Chong, S. Z., Teng, K. W., Becht, E., Chen, J., ... & Ng, L. G. ,2018. Developmental analysis of bone marrow neutrophils reveals populations specialized in expansion, trafficking, and effector functions. *Immunity*, 48(2), 364-379.
- Fahr, E., 1970. *Strahlen-Biochemie*. Von C. Streffer. Band 59/60 der „Heidelberger Taschenbücher“. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1969. 1. Aufl., XI, 196 S., 69 Abb., geh. DM 14.80. *Angew. Chem.* 82, 452–452.

- Farin, H. F., Van Es, J. H., & Clevers, H. ,2012. Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of Paneth cells. *Gastroenterology*, 143(6), 1518-1529.
- Fatima, A., Malick, T. S., Khan, I., Ishaque, A., & Salim, A. ,2021. Effect of glycyrrhizic acid and 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid on the differentiation of human umbilical cord-mesenchymal stem cells into hepatocytes. *World J Stem Cells*, 13(10), 1580.
- Fliedner, T. M., Friesecke, I., & Beyrer, K. (Eds.) ,2001. Medical management of radiation accidents: manual on the acute radiation syndrome. *Brit Inst Radiol*.
- Forkel, M., van Tol, S., Höög, C., Michaëlsson, J., Almer, S., & Mjösberg, J. ,2019. Distinct alterations in the composition of mucosal innate lymphoid cells in newly diagnosed and established Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Crohn's Colitis*, 13(1), 67-78.
- Förster, C. ,2008. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem cell Biol*, 130(1), 55-70.
- Forte, A., Finicelli, M., Mattia, M., Berrino, L., Rossi, F., De Feo, M., ... & Galderisi, U. ,2008. Mesenchymal stem cells effectively reduce surgically induced stenosis in rat carotids. *J Cell Physiol*, 217(3), 789-799.
- François, P., Rusconi, G., Arnaud, L., Mariotta, L., Giraud, L., Minonzio, G., ... & Soldati, G. ,2021. Inter-center comparison of good manufacturing practices-compliant stromal vascular fraction and proposal for release acceptance criteria: a review of 364 productions. *Stem Cell Res Ther*, 12, 1-11.
- François, A., Milliat, F., Guipaud, O., & Benderitter, M. ,2013. Inflammation and immunity in radiation damage to the gut mucosa. *BioMed Res Int*.
- François, A., Aigueperse, J., Gourmelon, P., MacNaughton, W. K., & Griffiths, N. M. 1998. Exposure to ionizing radiation modifies neurally-evoked electrolyte transport and some inflammatory responses in rat colon in vitro. *Int J Radiat Biol*, 73(1), 93-101.
- Frazier, T., Lee, S., Bowles, A., Semon, J., Bunnell, B., Wu, X., & Gimble, J. ,2018. Gender and age-related cell compositional differences in C57BL/6 murine adipose tissue stromal vascular fraction. *Adipocyte*, 7(3), 183-189.
- Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., & Artavanis-Tsakonas, S. 2005. Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature*, 435(7044), 964-968.
- Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F., & Kulagina, N. ,1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 4(5), 267-274.
- Freytes, C. O., Ratanatharathorn, V., Taylor, C., Abboud, C., Chesser, N., Restrepo, A., ... & Odenheimer, D. ,2004. Phase I/II randomized trial evaluating the safety and clinical effects of repifermin administered to reduce mucositis in patients undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Clini Cancer Res*, 10(24), 8318-8324.
- Geissmann, F., Jung, S., & Littman, D. R. ,2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, 19(1), 71-82.
- Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D. J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., ... & Jay, P. ,2016. Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature*, 529(7585), 226-230.

- Gewirtz, A. T., Rao, A. S., Simon, P. O., Merlin, D., Carnes, D., Madara, J. L., & Neish, A. S. ,2000. Salmonella typhimurium induces epithelial IL-8 expression via Ca<sup>2+</sup>-mediated activation of the NF- $\kappa$ B pathway. *J Clin invest* 105(1), 79-92.
- González, M. A., Gonzalez-Rey, E., Rico, L., Büscher, D., & Delgado, M. ,2009. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum*, 60(4), 1006-1019.
- Gonzales, E., Déficiés héréditaires de synthèse des acides biliaires primaires : effets à long terme d'un traitement par l'acide cholique, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie 2006, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6). p. 161.
- Goujon, E. ,1869. Recherches expérimentales sur les propriétés physiologiques de la moelle des os. *J de l'Anatomie et de la Physiologie Normales et Pathologiques de l'Homme et des Animaux*, 6, 399.
- Gregorieff, A., Liu, Y., Inanlou, M. R., Khomchuk, Y., & Wrana, J. L. ,2015. Yap-dependent reprogramming of Lgr5<sup>+</sup> stem cells drives intestinal regeneration and cancer. *Nature*, 526(7575), 715-718.
- Gregorieff, A., Pinto, D., Begthel, H., Destrée, O., Kielman, M., & Clevers, H. ,2005. Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterol*, 129(2), 626-638.
- Lindemans, C. A., Calafiore, M., Mertelsmann, A. M., O'connor, M. H., Dudakov, J. A., Jenq, R. R., ... & Hanash, A. M. ,2015. Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. *Nature*, 528(7583), 560-564.
- Girolamo, L. D., Lopa, S., Arrigoni, E., Sartori, M. F., Baruffaldi Preis, F. W., & Brini, A. T. ,2009. Human adipose-derived stem cells isolated from young and elderly women: their differentiation potential and scaffold interaction during in vitro osteoblastic differentiation. *Cytotherapy*, 793-803.
- Goto, Y., & Ivanov, I. I. ,2013. Intestinal epithelial cells as mediators of the commensal–host immune crosstalk. *Immunol cell biol*, 91(3), 204-214.
- Grémy, O., Benderitter, M., & Linard, C. ,2008. Acute and persisting Th2-like immune response after fractionated colorectal  $\gamma$ -irradiation. *World J Gastroenterol*, 14(46), 7075-7085.
- Griffin, R.J., 2006. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 66, 627.
- Griffiths, N. M., Dublineau, I., Lebrun, F., Linard, C., Monti, P., Picard, C., & Aigueperse, J. ,2002. Syndrome aigu d'irradiation : les atteintes du système gastro-intestinal. *Radiopro.* , 37(2), 161-171.
- Griffiths, N. M. ,1996. Exposure to either gamma or a mixed neutron/gamma field irradiation modifies vasoactive intestinal peptide receptor characteristics in membranes isolated from pig jejunum. *Int J radiat biol*, 70(3), 361-370.
- Guilliams, M., Mildner, A., & Yona, S. ,2018. Developmental and functional heterogeneity of monocytes. *Immunity*, 49(4), 595-613.

- Guillo, L., Grimaud, F., Houser, F., Prost, C., Jouve, E., Philandrianos, C., ... & Magalon, J. ,2022. Three-year outcome of local injection of autologous stromal vascular fraction cells and microfat in refractory perianal fistulas of Crohn's disease. *Stem Cell Res Ther*, 13(1), 1-6.
- Gunter-Smith, P. J. ,1986. Gamma radiation affects active electrolyte transport by rabbit ileum: basal Na and Cl transport. *Am J Physiol*, 250(4), G540-G545.
- Guo XK, Ou J, Liang S, Zhou X, Hu X. Epithelial Hes1 maintains gut homeostasis by preventing microbial dysbiosis. *Mucosal Immunol*. 2018 May;11(3):716-726.
- Guo, S., Al-Sadi, R., Said, H. M., & Ma, T. Y. ,2013. Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14. *American J Pathol*, 182(2), 375-387.
- Guide National d'intervention médicale en cas d'événement nucléaire ou radiologique, ASN,2008
- Guskova, A. K., Nadezhina, N. M., & Moiseev, A. A. ,1996. Medical assistance given to personnel of the Chernobyl nuclear power plant after the 1986 accident. *Hematol Rev*, 7, 27-100.
- Hadis, U., Wahl, B., Schulz, O., Hardtke-Wolenski, M., Schippers, A., Wagner, N., ... & Pabst, O. ,2011. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity*, 34(2), 237-246.
- Cowland, J. B., & Borregaard, N. ,2016. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol Rev*, 273(1), 11-28.
- Hadis, U., Wahl, B., Schulz, O., Hardtke-Wolenski, M., Schippers, A., Wagner, N., ... & Pabst, O. ,2011. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity*, 34(2), 237-246.
- Häger, M., Cowland, J. B., & Borregaard, N. ,2010. Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med*, 268(1), 25-34.
- Hall, P. A., Coates, P. J., Ansari, B., & Hopwood, D. ,1994. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci*, 107(12), 3569-3577.
- Han, X., Yang, Q., Lin, L., Xu, C., Zheng, C., Chen, X., ... & Shi, Y. ,2014. Interleukin-17 enhances immunosuppression by mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*, 21(11), 1758-1768.
- Hanash, A. M., Dudakov, J. A., Hua, G., O'Connor, M. H., Young, L. F., Singer, N. V., ... & van den Brink, M. R. ,2012. Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity*, 37(2), 339-350.
- Hanke, A., Prantl, L., Wenzel, C., Nerlich, M., Brockhoff, G., Loibl, M., & Gehmert, S. ,2016. Semi-automated extraction and characterization of Stromal Vascular Fraction using a new medical device. *Clin Hemorheol Microcirculation*, 64(3), 403-412.
- Hansson, G. C., & Johansson, M. E. ,2010. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Gut microbes*, 1(1), 51-54.
- Hao, J., Sun, L., Huang, H., Xiong, G., Liu, X., Qiu, L., ... & Luo, Q. ,2004. Effects of recombinant human interleukin 11 on thrombocytopenia and neutropenia in irradiated rhesus monkeys. *Radiat Res*, 162(2), 157-163.

- Haramis, A. P. G., Begthel, H., Van Den Born, M., Van Es, J., Jonkheer, S., Offerhaus, G. J. A., & Clevers, H. 2004. De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science*, 303(5664), 1684-1686.
- Hardwick, J. C. H., Brink, G. R. V. D., Bleuming, S. A., Ballester, I., Brande, J. M. H. V. D., Keller, J. J., Offerhaus, G. J. A., Deventer, S. J. H. V., & Peppelenbosch, M. P. ,2004. Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon. *Gastroenterol*, 126(1), 111-121.
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. ,2011. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*, 9(1), 1-14.
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M. B., Leboeuf, M., ... & Merad, M. ,2013. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*, 38(4), 792-804.
- Hedgepeth, C. M., Conrad, L. J., Zhang, J., Huang, H. C., Lee, V. M., & Klein, P. S. ,1997. Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action. *Dev Biol*, 185(1), 82-91.
- Hendry, J. H., Potten, C. S., & Roberts, N. P. ,1983. The gastrointestinal syndrome and mucosal clonogenic cells: relationships between target cell sensitivities, LD50 and cell survival, and their modification by antibiotics. *Radiat res*, 96(1), 100-112.
- Hérodin, F., Roy, L., Grenier, N., Delaunay, C., Baugé, S., Vaurijoux, A., ... & Drouet, M. ,2007. Antiapoptotic cytokines in combination with pegfilgrastim soon after irradiation mitigates myelosuppression in nonhuman primates exposed to high irradiation dose. *Exp hematol*, 35(8), 1172-1181.
- Herold, S., Tabar, T. S., Janßen, H., Hoegner, K., Cabanski, M., Lewe-Schlosser, P., ... & Lohmeyer, J. ,2011. Exudate macrophages attenuate lung injury by the release of IL-1 receptor antagonist in gram-negative pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 183(10), 1380-1390.
- Herskind, C., Westergaard, O., 1988. Variable protection by OH scavengers against radiation-induced inactivation of isolated transcriptionally active chromatin: the influence of secondary radicals. *Radiat. Res.* 114, 28–41.
- Heubi, J. E., Setchell, K. D., & Bove, K. E. ,2018. Inborn errors of bile acid metabolism. *Clin Liv Dis*, 22(4), 671-687.
- Horwitz, E. M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., ... & Keating, A. ,2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7(5), 393-395.
- Horwitz, E. M., Gordon, P. L., Koo, W. K., Marx, J. C., Neel, M. D., McNall, R. Y., ... & Hofmann, T. ,2002. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci*, 99(13), 8932-8937.
- Hou, Q., Huang, J., Ayansola, H., Masatoshi, H., & Zhang, B. ,2021. Intestinal stem cells and immune cell relationships: potential therapeutic targets for inflammatory bowel diseases. *Front Immunol*, 11, 623691.

- Houchen, C. W., George, R. J., Sturmoski, M. A., & Cohn, S. M. ,1999. FGF-2 enhances intestinal stem cell survival and its expression is induced after radiation injury. *Am J Physiol*, 276(1), G249-G258.
- Housley, R. M., Morris, C. F., Boyle, W., Ring, B., Biltz, R., Tarpley, J. E., ... & Pierce, G. ,1994. Keratinocyte growth factor induces proliferation of hepatocytes and epithelial cells throughout the rat gastrointestinal tract. *J Clin invest*, 94(5), 1764-1777.
- Houtgraaf, J. H., den Dekker, W. K., van Dalen, B. M., Springeling, T., de Jong, R., van Geuns, R. J., ... & Duckers, H. J. ,2012. First experience in humans using adipose tissue-derived regenerative cells in the treatment of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 59(5), 539-540.
- Hovdenak, N., Wang, J., Sung, C. C., Kelly, T., Fajardo, L. F., & Hauer-Jensen, M. ,2002. Clinical significance of increased gelatinolytic activity in the rectal mucosa during external beam radiation therapy of prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 53(4), 919-927.
- Howarth, G. S., Fraser, R., Frisby, C. L., Schirmer, M. B., & Yeoh, E. K. ,1997. Effects of insulin-like growth factor-I administration on radiation enteritis in rats. *Scand J gastroenterol*, 32(11), 1118-1124.
- Hua, G., Thin, T. H., Feldman, R., Haimovitz-Friedman, A., Clevers, H., Fuks, Z., & Kolesnick, R. ,2012. Crypt base columnar stem cells in small intestines of mice are radioresistant. *Gastroenterology*, 143(5), 1266-1276.
- Huang, D., Wang, J., Kivisakk, P., Rollins, B. J., & Ransohoff, R. M. ,2001. Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*, 193(6), 713-726.
- Hunter, K. S., Carnell, L. S., DiCarlo, A. L., Hoffman, C. M., Loelius, S. G., & Homer, M. ,2021. Interagency approaches to animal models for acute radiation exposure. *Int J Radiat Biol*, 97(sup1), S2-S5.
- Huynh, D., Akçora, D., Malaterre, J., Chan, C. K., Dai, X. M., Bertocello, I., ... & Ramsay, R. G. 2013. CSF-1 receptor-dependent colon development, homeostasis and inflammatory stress response. *PLoS one*, 8(2), e56951.
- Huynh, D., Dai, X. M., Nandi, S., Lightowler, S., Trivett, M., Chan, C. K., ... & Stanley, E. R. ,2009. Colony stimulating factor-1 dependence of paneth cell development in the mouse small intestine. *Gastroenterol*, 137(1), 136-144.
- Ijiri, K., & Potten, C. S. ,1990. The circadian rhythm for the number and sensitivity of radiation-induced apoptosis in the crypts of mouse small intestine. *Int J Radiat Biol*, 58(1), 165-175.
- Imajo, M., Ebisuya, M., & Nishida, E. ,2015. Dual role of YAP and TAZ in renewal of the intestinal epithelium. *Nat Cell Biol*, 17(1), 7-19.
- Ireland, H., Houghton, C., Howard, L., & Winton, D. J. ,2005. Cellular inheritance of a Cre-activated reporter gene to determine paneth cell longevity in the murine small intestine. *Dev Dyn*, 233(4), 1332-1336.
- Ireland, H., Kemp, R., Houghton, C., Howard, L., Clarke, A. R., Sansom, O. J., & Winton, D. J. ,2004. Inducible Cre-mediated control of gene expression in the murine gastrointestinal tract: effect of loss of  $\beta$ -catenin. *Gastroenterol*, 126(5), 1236-1246.

- Iyyanki, T., Hubenak, J., Liu, J., Chang, E. I., Beahm, E. K., & Zhang, Q. ,2015. Harvesting technique affects adipose-derived stem cell yield. *Aesthet Surg*, 35(4), 467-476.
- Jackson, I. L., Gurung, G., Poirier, Y., Gopalakrishnan, M., Cohen, E. P., Donohue, T. S., ... & Vujaskovic, Z. ,2021. A New Zealand White rabbit model of thrombocytopenia and coagulopathy following total body irradiation across the dose range to induce the hematopoietic-subsyndrome of acute radiation syndrome. *Int J Radiation Biol*, 97(sup1), S19-S31.
- Jin, H. J., Bae, Y. K., Kim, M., Kwon, S. J., Jeon, H. B., Choi, S. J., ... & Chang, J. W. ,2013. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *Int J Mol Sci*, 14(9), 17986-18001.
- Joeris, T., Müller-Luda, K., Agace, W. W., & Mowat, A. ,2017. Diversity and functions of intestinal mononuclear phagocytes. *Mucosal Immunol*, 10(4), 845-864.
- Johansson, M. E., & Hansson, G. C. ,2016. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat Rev Immunol*, 16(10), 639-649.
- Jones, J. C., Brindley, C. D., Elder, N. H., Myers Jr, M. G., Rajala, M. W., Dekaney, C. M., ... & Dempsey, P. J. ,2019. Cellular plasticity of Defa4Cre-expressing Paneth cells in response to notch activation and intestinal injury. *Cellular Mol Gastroenterol Hepatol*, 7(3), 533-554.
- Jones, J. C., & Dempsey, P. J. ,2016. Enterocyte progenitors can dedifferentiate to replace lost Lgr5+ intestinal stem cells revealing that many different progenitor populations can regain stemness. *Stem cell Investig*, 3.
- Jubb, A. M., Chalasani, S., Frantz, G. D., Smits, R., Grabsch, H. I., Kavi, V., ... & Koeppen, H. ,2006. Achaete-scute like 2 (ascl2) is a target of Wnt signalling and is upregulated in intestinal neoplasia. *Oncogene*, 25(24), 3445-3457.
- Kanamori, Y., Ishimaru, K., Nanno, M., Maki, K., Ikuta, K., Nariuchi, H., & Ishikawa, H. ,1996. Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit+ IL-7R+ Thy1+ lympho-hemopoietic progenitors develop. *J Exp Med*, 184(4), 1449-1459.
- Kanu, N., Behrens, A., 2007. ATMIN defines an NBS1-independent pathway of ATM signalling. *EMBO J*. 26, 2933–2941.
- Karki, R., Sharma, B. R., Tuladhar, S., Williams, E. P., Zalduondo, L., Samir, P., ... & Kanneganti, T. D. ,2021. Synergism of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  triggers inflammatory cell death, tissue damage, and mortality in SARS-CoV-2 infection and cytokine shock syndromes. *Cell*, 184(1), 149-168.
- Kavanagh, H., & Mahon, B. P. ,2011. Allogeneic mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation by inducing murine regulatory T cells. *Allergy*, 66(4), 523-531.
- Kawasaki, T., Hubbard, W. J., Choudhry, M. A., Schwacha, M. G., Bland, K. I., & Chaudry, I. H. ,2006. Trauma-hemorrhage induces depressed splenic dendritic cell functions in mice. *J Immunol*, 177(7), 4514-4520.
- Kelsall, B. L., & Strober, W. ,1996. Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *J Exp Med*, 183(1), 237-247.
- Khan, W. B., Shui, C., Ning, S., & Knox, S. J. ,1997. Enhancement of murine intestinal stem cell survival after irradiation by keratinocyte growth factor. *Radiat res*, 148(3), 248-253.



- Kim, J. E., Fei, L., Yin, W. C., Coquenlorge, S., Rao-Bhatia, A., Zhang, X., ... & Kim, T. H. ,2020. Single cell and genetic analyses reveal conserved populations and signaling mechanisms of gastrointestinal stromal niches. *Nat commun*, 11(1), 1-15.
- Kim, N. D., & Luster, A. D. 2015. The role of tissue resident cells in neutrophil recruitment. *Trends Immunol*, 36(9), 547-555.
- Kim, K. W., Vallon-Eberhard, A., Zigmond, E., Farache, J., Shezen, E., Shakhar, G., ... & Jung, S. ,2011. In vivo structure/function and expression analysis of the CX3C chemokine fractalkine. *Blood* 118(22), e156-e167.
- Kim, K. A., Kakitani, M., Zhao, J., Oshima, T., Tang, T., Binnerts, M., ... & Tomizuka, K. 2005. Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science*, 309(5738), 1256-1259.
- Kinnebrew, M. A., Buffie, C. G., Diehl, G. E., Zenewicz, L. A., Leiner, I., Hohl, T. M., ... & Pamer, E. G. ,2012. Interleukin 23 production by intestinal CD103+ CD11b+ dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense. *Immunity*, 36(2), 276-287.
- Klar, A. S., Güven, S., Zimoch, J., Zapiórkowska, N. A., Biedermann, T., Böttcher-Haberzeth, S., ... & Meuli, M. ,2016. Characterization of vasculogenic potential of human adipose-derived endothelial cells in a three-dimensional vascularized skin substitute. *Pediatr Surg Int*, 32(1), 17-27.
- Koelink, P. J., Bloemendaal, F. M., Li, B., Westera, L., Vogels, E. W., van Roest, M., ... & van den Brink, G. R. ,2020. Anti-TNF therapy in IBD exerts its therapeutic effect through macrophage IL-10 signalling. *Gut*, 69(6), 1053-1063.
- Koh, Y. J., Koh, B. I., Kim, H., Joo, H. J., Jin, H. K., Jeon, J., ... & Koh, G. Y. ,2011. Stromal vascular fraction from adipose tissue forms profound vascular network through the dynamic reassembly of blood endothelial cells. *Arterioscler, Thromb, Vasc Biol*, 31(5), 1141-1150.
- Kolaczowska, E., & Kubes, P. ,2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13(3), 159-175.
- Kopan, R., & Ilagan, M. X. G. ,2009. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*, 137(2), 216-233.
- Kornicka, K., Marycz, K., Tomaszewski, K. A., Marędzia, M., & Śmieszek, A. ,2015. The effect of age on osteogenic and adipogenic differentiation potential of human adipose derived stromal stem cells (hASCs) and the impact of stress factors in the course of the differentiation process. *Oxid Med Cell Longev*.
- Kosinski, C., Li, V. S., Chan, A. S., Zhang, J., Ho, C., Tsui, W. Y., ... & Chen, X. ,2007. Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proc Natl Acad oSciences*, 104(39), 15418-15423.
- Kouri, M., Skapinakis, P., & Damigos, D. ,2012. Effects of the drugs and interventions, used for the management of cancer treatment-related oral mucositis, on the induced oral pain. *The internet journal of Pain, Symptom Control and Palliative Care*, 9(1).
- Koyama, M., Samson, L., Ensbey, K. S., Takahashi, S., Clouston, A. D., Martin, P. J., & Hill, G. R. ,2023. Lithium attenuates graft-versus-host disease via effects on the intestinal stem cell niche. *Blood*, 141(3), 315-319.

- Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., ... & Annunziato, F. ,2006. Role for interferon- $\gamma$  in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24(2), 386-398.
- Krivokrysenko, V. I., Toshkov, I. A., Gleiberman, A. S., Krasnov, P., Shyshynova, I., Bespalov, I., ... & Feinstein, E. 2015. The toll-like receptor 5 agonist entolimod mitigates lethal acute radiation syndrome in non-human primates. *PLoS One*, 10(9), e0135388.
- Kühl, A. A., Erben, U., Kredel, L. I., & Siegmund, B. ,2015. Diversity of intestinal macrophages in inflammatory bowel diseases. *Front Immunol*, 6, 613.
- Kuhnert, F., Davis, C. R., Wang, H. T., Chu, P., Lee, M., Yuan, J., ... & Kuo, C. J. ,2004. Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc Natl Acad Sci*, 101(1), 266-271.
- Kurihara, T., Warr, G., Loy, J., & Bravo, R. ,1997. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med*, 186(10), 1757-1762.
- Lacavé-Lapalun, J. V., Benderitter, M., & Linard, C. ,2013. Flagellin or lipopolysaccharide treatment modified macrophage populations after colorectal radiation of rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 346(1), 75-85.
- Lane, D.P., 1992. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15–16.
- Lee, R. H., Pulin, A. A., Seo, M. J., Kota, D. J., Ylostalo, J., Larson, B. L., ... & Prockop, D. J. ,2009. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell*, 5(1), 54-63.
- Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Götherström, C., Hassan, M., Uzunel, M., & Ringdén, O. ,2004. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*, 363(9419), 1439-1441.
- LeBon, L., Lee, T. V., Sprinzak, D., Jafar-Nejad, H., & Elowitz, M. B. ,2014. Fringe proteins modulate Notch-ligand cis and trans interactions to specify signaling states. *elife*, 3, e02950.
- Leonardi, I., Li, X., Semon, A., Li, D., Doron, I., Putzel, G., ... & Iliev, I. D. 2018. CX3CR1+ mononuclear phagocytes control immunity to intestinal fungi. *Science*, 359(6372), 232-236.
- Li, K., Han, Q., Yan, X., Liao, L., & Zhao, R. C. ,2010. Not a process of simple vicariousness, the differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells to renal tubular epithelial cells plays an important role in acute kidney injury repairing. *Stem Cells Dev*, 19(8), 1267-1275.
- Liang L, Shen L, Fu G, Yao Y, Li G, Deng Y, Zhang H, Zhou M, Yang W, Hua G, Zhang Z. Regulation of the regeneration of intestinal stem cells after irradiation. *Ann Transl Med*. 2020 Sep;8(17):1063.
- Lin, C. S., Ning, H., Lin, G., & Lue, T. F. ,2012. Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells ?. *Cytotherapy*, 14(10), 1159-1163.
- Lin, C. S., Xin, Z. C., Deng, C. H., Ning, H., Lin, G., & Lue, T. F. ,2010. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol Histopathol*, Vol. 25, nº 6 (2010).
- Linard, C., Brachet, M., Strup-Perrot, C., L'homme, B., Busson, E., Squiban, C., ... & Benderitter, M. ,2018. Autologous bone marrow mesenchymal stem cells improve the quality and stability of vascularized flap surgery of irradiated skin in pigs. *Stem Cells Transl Med*, 7(8), 569-582.

- Linard, C., Strup-Perrot, C., Lacave-Lapalun, J. V., & Benderitter, M. ,2016. Flagellin preconditioning enhances the efficacy of mesenchymal stem cells in an irradiation-induced proctitis model. *J Leukoc Biol*, 100(3), 569-580.
- Linard, C., Marquette, C., Mathieu, J., Pennequin, A., Clarençon, D., & Mathé, D. ,2004. Acute induction of inflammatory cytokine expression after  $\gamma$ -irradiation in the rat: effect of an NF- $\kappa$ B inhibitor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 58(2), 427-434.
- Linard, NM GRIFFITHS, V. ESPOSITO, J. AIGUEPERSE and P. GOURMELON, C. ,1997. Changes in gut neurotensin and modified colonic motility following whole-body irradiation in rat. *Int J radiat biol*, 71(5), 581-588.
- Lindemans, C. A., Calafiore, M., Mertelsmann, A. M., O'connor, M. H., Dudakov, J. A., Jenq, R. R., ... & Hanash, A. M. ,2015. Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. *Nature*, 528(7583), 560-564.
- Lindop, P. J., & Rotblat, J. ,1959. Shortening of lifespan of mice as a function of age at irradiation. *Gerontol*, 3(3), 122-127.
- Liu, Q., Du, X. X., Schindel, D. T., Yang, Z. X., Rescorla, F. J., Williams, D. A., & Grosfeld, J. L. ,1996. Trophic effects of interleukin-11 in rats with experimental short bowel syndrome. *J Pediatr Surg*, 31(8), 1047-1051.
- MacDonald, K. P., Palmer, J. S., Cronau, S., Seppanen, E., Olver, S., Raffelt, N. C., ... & Hume, D. A. ,2010. An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue-and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation. *Blood*, 116(19), 3955-3963.
- MacNaughton, W. K., Leach, K. E., Prud'homme-Lalonde, L., Ho, W., & Sharkey, K. A. ,1994. Ionizing radiation reduces neurally evoked electrolyte transport in rat ileum through a mast cell-dependent mechanism. *Gastro* ,106(2), 324-335.
- Madec, A. M., Mallone, R., Afonso, G., Abou Mrad, E., Mesnier, A., Eljaafari, A., & Thivolet, C. ,2009. Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. *Diabetologia*, 52(7), 1391-1399.
- Maejima, K., Deitch, E., & Berg, R. ,1984. Promotion by burn stress of the translocation of bacteria from the gastrointestinal tracts of mice. *Archives of surgery*, 119(2), 166-172.
- Magalhaes, J. G., Tattoli, I., & Girardin, S. E. ,2007. The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin immunol* (Vol. 19, No. 2, pp. 106-115).
- Magalon, J., Velier, M., Simoncini, S., François, P., Bertrand, B., Dumas, A., ... & Sabatier, F. ,2019. Molecular profile and proangiogenic activity of the adipose-derived stromal vascular fraction used as an autologous innovative medicinal product in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*, 78(3), 391-398.
- Mahmood, A., Lu, D., Lu, M., & Chopp, M. ,2003. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery*, 53(3), 697-703.
- Maier, P., Hartmann, L., Wenz, F., Herskind, C., 2016. Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 102.

- Maj, J. G., Paris, F., Haimovitz-Friedman, A., Venkatraman, E., Kolesnick, R., & Fuks, Z. ,2003. Microvascular function regulates intestinal crypt response to radiation. *Cancer Res*, 63(15), 4338-4341.
- Malipatlolla, D. K., Patel, P., Sjöberg, F., Devarakonda, S., Kalm, M., Angenete, E., ... & Bull, C. ,2019. Long-term mucosal injury and repair in a murine model of pelvic radiotherapy. *Sci Rep*, 9(1), 1-10.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. ,2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 25(12), 677-686.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., & Sica, A. ,2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*, 23(11), 549-555.
- Marelli, G., Belgiovine, C., Mantovani, A., Erreni, M., & Allavena, P. ,2017. Non-redundant role of the chemokine receptor CX3CR1 in the anti-inflammatory function of gut macrophages. *Immunobiology*, 222(2), 463-472.
- Marieb, E. N., & Hoehn, K. ,2012. *Human Anatomy & Physiology* (p. 1264).
- Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A., & Locati, M. ,2008. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*, 13(2), 453-461.
- Mass, E., Ballesteros, I., Farlik, M., Halbritter, F., Günther, P., Crozet, L., ... & Geissmann, F. ,2016. Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science*, 353(6304), aaf4238.
- Mason, K. A., Withers, H. R., McBride, W. H., Davis, C. A., & Smathers, J. B. ,1989. Comparison of the gastrointestinal syndrome after total-body or total-abdominal irradiation. *Radiat Res*, 117(3), 480-488.
- Maunda, K. K. Y., & Moore, J. V. ,1987. Radiobiology and stathmokinetics of intestinal crypts associated with patches of Peyer. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 51(2), 255-264.
- Marteau P. 2012, Physiopathologie des diarrhées chroniques. *Hépatogastro* ;19 :580-5
- Martinaud, C., Thepenier, C., Trouillas, M., Peltzer, J., Uzan, G., Kerdilès, M. C. L. B., ... & Lataillade, J. J. ,2010. Les cellules souches mésenchymateuses: des cellules pour la médecine régénérative du futur?. *Revue francophone des laboratoires*, 2010(427), 47-59.
- Matsumoto, D., Shigeura, T., Sato, K., Inoue, K., Suga, H., Kato, H., ... & Yoshimura, K. ,2007. Influences of preservation at various temperatures on liposuction aspirates. *Plast Reconstr Surg*, 120(6), 1510-1517.
- May, R., Qu, D., Weygant, N., Chandrakesan, P., Ali, N., Lightfoot, S. A., ... & Houchen, C. W. (2014). Brief report: Dclk1 deletion in tuft cells results in impaired epithelial repair after radiation injury. *Stem Cells*, 32(3), 822-827.
- Medina, C. B., Mehrotra, P., Arandjelovic, S., Perry, J. S., Guo, Y., Morioka, S., ... & Ravichandran, K. S. ,2020. Metabolites released from apoptotic cells act as tissue messengers. *Nature*, 580(7801), 130-135.
- Mei, X., Gu, M., & Li, M. 2020. Plasticity of Paneth cells and their ability to regulate intestinal stem cells. *Stem Cell Res ther*, 11(1), 1-13.

- Meineke, V., & Fliedner, T. M. ,2005. Radiation-induced multi-organ involvement and failure: challenges for radiation accident medical management and future research. *Brit J Radiol*, (1), 196-200.
- Menke, J., Iwata, Y., Rabacal, W. A., Basu, R., Yeung, Y. G., Humphreys, B. D., ... & Kelley, V. R. ,2009. CSF-1 signals directly to renal tubular epithelial cells to mediate repair in mice. *J Clin Invest*, 119(8), 2330-2342.
- Meng, D., Zhu, W., Ganguli, K., Shi, H. N., & Walker, W. A. ,2016. Anti-inflammatory effects of *Bifidobacterium longum* subsp *infantis* secretions on fetal human enterocytes are mediated by TLR-4 receptors. *Am J Physiology Gastrointest Liver Physiol*, 311(4), G744-G753.
- Mionnet, C., Buatois, V., Kanda, A., Milcent, V., Fleury, S., Lair, D., ... & Julia, V. ,2010. CX3CR1 is required for airway inflammation by promoting T helper cell survival and maintenance in inflamed lung. *Nat Med*, 16(11), 1305-1312.
- Mirzayans, R., Andrais, B., Scott, A., Murray, D., 2012. New Insights into p53 Signaling and Cancer Cell Response to DNA Damage: Implications for Cancer Therapy. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, e170325.
- Miyoshi, H., Ajima, R., Luo, C. T., Yamaguchi, T. P., & Stappenbeck, T. S. ,2012. Wnt5a potentiates TGF- $\beta$  signaling to promote colonic crypt regeneration after tissue injury. *Science*, 338(6103), 108-113.
- Montgomery, R. K., Carlone, D. L., Richmond, C. A., Farilla, L., Kranendonk, M. E., Henderson, D. E., ... & Breault, D. T. ,2011. Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci*, 108(1), 179-184.
- Mollà, M., Gironella, M., Miquel, R., Tovar, V., Engel, P., Biete, A., ... & Panés, J. ,2003. Relative roles of ICAM-1 and VCAM-1 in the pathogenesis of experimental radiation-induced intestinal inflammation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 57(1), 264-273.
- Monte, M. J., Marin, J. J., Antelo, A., & Vazquez-Tato, J. ,2009. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J gastroenterol: WJG*, 15(7), 804.
- Mörbe, U. M., Jørgensen, P. B., Fenton, T. M., von Burg, N., Riis, L. B., Spencer, J., & Agace, W. W. ,2021. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal Immunol*, 14(4), 793-802.
- Morris, M. E., Beare, J. E., Reed, R. M., Dale, J. R., LeBlanc, A. J., Kaufman, C. L., ... & Hoying, J. B. ,2015. Systemically delivered adipose stromal vascular fraction cells disseminate to peripheral artery walls and reduce vasomotor tone through a CD11b+ cell-dependent mechanism. *Stem Cells Transl Med*, 4(4), 369-380.
- Morrison, S. J., & Spradling, A. C. ,2008. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*, 132(4), 598-611.
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Rev Immunol*, 8(12), 958-969.
- Motta, J. P., Denadai-Souza, A., Sagnat, D., Guiraud, L., Edir, A., Bonnart, C., ... & Vergnolle, N. ,2019. Active thrombin produced by the intestinal epithelium controls mucosal biofilms. *Nat Commun*, 10(1), 1-12.

- Motwani, M. P., Flint, J. D., De Maeyer, R. P., Fullerton, J. N., Smith, A. M., Marks, D. J., & Gilroy, D. W. (2016). Novel translational model of resolving inflammation triggered by UV-killed *E. coli*. *Journal Pathol Clinical Res*, 2(3), 154-165.
- Mouthon, M. A., Van der Meeren, A., Vandamme, M., Squiban, C., & Gaugler, M. H. ,2002. Thrombopoietin protects mice from mortality and myelosuppression following high-dose irradiation: importance of time scheduling. *Can J Physiol Pharmacol*, 80(7), 717-721.
- Mowat, A. M. ,2018. To respond or not to respond—a personal perspective of intestinal tolerance. *Nature Rev Immunol*, 18, 405-415.
- Mowat, A. M., & Agace, W. W. 2014. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol*, 14(10), 667-685.
- Mueller, T., Terada, T., Rosenberg, I. M., Shibolet, O., & Podolsky, D. K. ,2006. Th2 cytokines down-regulate TLR expression and function in human intestinal epithelial cells. *J Immunol*, 176(10), 5805-5814.
- Muñoz, M., Eidenschenk, C., Ota, N., Wong, K., Lohmann, U., Kühl, A. A., ... & Ouyang, W. ,2015. Interleukin-22 induces interleukin-18 expression from epithelial cells during intestinal infection. *Immunity*, 42(2), 321-331.
- Murata, K., Jadhav, U., Madha, S., van Es, J., Dean, J., Cavazza, A., ... & Shivdasani, R. A. ,2020. Ascl2-dependent cell dedifferentiation drives regeneration of ablated intestinal stem cells. *Cell Stem Cell*, 26(3), 377-390
- Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., ... & Wynn, T. A. 2014. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 14-20.
- Mylonas, P. G., Matsouka, P. T., Papandoniou, E. V., Vagianos, C., Kalfarentzos, F., & Alexandrides, T. K. ,2000. Growth hormone and insulin-like growth factor I protect intestinal cells from radiation induced apoptosis. *Mol cell endocrinol*, 160(1-2), 115-122.
- Na, Y. R., Stakenborg, M., Seok, S. H., & Matteoli, G. ,2019. Macrophages in intestinal inflammation and resolution: a potential therapeutic target in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 16(9), 531-543.
- Nagamura-Inoue, T., & He, H. ,2014. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: their advantages and potential clinical utility. *World J Stem cell*, 6(2), 195.
- Naji, A., Eitoku, M., Favier, B., Deschaseaux, F., Rouas-Freiss, N., & Suganuma, N. ,2019. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cell Mol Life Sci*, 76(17), 3323-3348.
- Naumenko, V., Turk, M., Jenne, C. N., & Kim, S. J. 2018. Neutrophils in viral infection. *Cell Tissue Res*, 371(3), 505-516.
- Nauta, A. J., Kruisselbrink, A. B., Lurvink, E., Willemze, R., & Fibbe, W. E. ,2006. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 177(4), 2080-2087.
- Nedergaard, J., Connolly, E., & Cannon, B. ,1986. Brown adipose tissue in the mammalian neonate. *Brown adipose tissue*/edited by Paul Trayhurn and David G. Nicholls.

- Nelson, R. F. ,1966. Variation in radiosensitivity of mice with time of day. *Acta Radiol: Ther Phys Biol* 4(2), 91-96.
- Neuss, S., Becher, E., Wöltje, M., Tietze, L., & Jahnen-Dechent, W. ,2004. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. *Stem Cells*, 22(3), 405-414.
- Niess, J. H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B. A., ... & Reinecker, H. C. ,2005. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*, 307(5707), 254-258.
- Nieto-Nicolau, N., Martínez-Conesa, E. M., Fuentes-Julián, S., Arnalich-Montiel, F., García-Tuñón, I., De Miguel, M. P., & Casaroli-Marano, R. P. ,2021. Priming human adipose-derived mesenchymal stem cells for corneal surface regeneration. *J Cell Mol Med*, 25(11), 5124-5137.
- Novak, M. L., & Koh, T. J. ,2013. Macrophage phenotypes during tissue repair. *J Leukoc Biol*, 93(6), 875-881.
- Oberbauer, E., Steffenhagen, C., Wurzer, C., Gabriel, C., Redl, H., & Wolbank, S. ,2015. Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells: current state of the art. *Cell Regen*, 4(1), 1-14.
- Oedayrajsingh-Varma, M. J., Van Ham, S. M., Knippenberg, M., Helder, M. N., Klein-Nulend, J., Schouten, T. E., ... & Van Milligen, F. J. ,2006. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy*, 8(2), 166-177.
- Okunieff, P., Mester, M., Wang, J., Maddox, T., Gong, X., Tang, D., ... & Ding, I. 1998. In vivo radioprotective effects of angiogenic growth factors on the small bowel of C3H mice. *Radiat Res*, 150(2), 204-211.
- Ong, Z. Y., Gibson, R. J., Bowen, J. M., Stringer, A. M., Darby, J. M., Logan, R. M., ... & Keefe, D. M. ,2010. Pro-inflammatory cytokines play a key role in the development of radiotherapy-induced gastrointestinal mucositis. *Radiat Oncol*, 5(1), 1-8.
- Ortholan, C., Estivalet, S., Barillot, I., Costa, A., & Gérard, J. P. ,2007. Guide des procédures de radiothérapie externe 2007 Guide for External Beam Radiotherapy. *Procedures 2007. Cancer/Radiothérapie*, 11, 329-330.
- Ortiz-Masia, D., Cosin-Roger, J., Calatayud, S., Hernandez, C., Alos, R., Hinojosa, J., ... & Barrachina, M. D. ,2014. Hypoxic macrophages impair autophagy in epithelial cells through Wnt1: relevance in IBD. *Mucosal Immunol*, 7(4), 929-938.
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., & Walsh, K. ,2011. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*, 11(2), 85-97.
- Owen, M., & Friedenstein, A. J. 2007, September. Stromal stem cells: Marrow-derived osteogenic precursors. In *Ciba Foundation Symposium 136-Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissues: Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissues: Ciba Foundation Symposium 136* (pp. 42-60). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd..
- Özsoy, Z., Kul, Z., & Bilir, A. ,2006. The role of cannula diameter in improved adipocyte viability: a quantitative analysis. *Aesth Surg*, 26(3), 287-289.

- Pan, G. H., Chen, Z., Xu, L., Zhu, J. H., Xiang, P., Ma, J. J., ... & Liu, L. S. ,2016. Low-dose tacrolimus combined with donor-derived mesenchymal stem cells after renal transplantation: a prospective, non-randomized study. *Oncotarget*, 7(11), 12089.
- Pappo, J., & Mahlman, R. T. ,1993. Follicle epithelial M cells are a source of interleukin-1 in Peyer's patches. *Immunology*, 78(3), 505.
- Paredes, A., Lindeblad, M., Patil, R., Neal, M. D., Hong, Y., Smith, B., ... & Bartholomew, A. ,2021. The New Zealand white rabbit animal model of acute radiation syndrome: hematopoietic and coagulation-based parameters by radiation dose following supportive care. *Int J Radiat Biol* 97(sup1), S45-S62.
- Paris, F., Fuks, Z., Kang, A., Capodiceci, P., Juan, G., Ehleiter, D., ... & Kolesnick, R. ,2001. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Sci*, 293(5528), 293-297.
- Patel, A. A., Ginhoux, F., & Yona, S. 2021. Monocytes, macrophages, dendritic cells and neutrophils: an update on lifespan kinetics in health and disease. *Immunology*, 163(3), 250-261.
- Pellegrinet, L., Rodilla, V., Liu, Z., Chen, S., Koch, U., Espinosa, L., ... & Radtke, F. ,2011. Dll1-and dll4-mediated notch signaling are required for homeostasis of intestinal stem cells. *Gastroenterol*, 140(4), 1230-1240.
- Peng, Y., Ke, M., Xu, L. U., Liu, L., Chen, X., Xia, W., ... & Xiang, A. P. ,2013. Donor-derived mesenchymal stem cells combined with low-dose tacrolimus prevent acute rejection after renal transplantation: a clinical pilot study. *Transplantation*, 95(1), 161-168.
- Perico, N., Casiraghi, F., Inrona, M., Gotti, E., Todeschini, M., Cavinato, R. A., ... & Remuzzi, G. (2011). Autologous mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: a pilot study of safety and clinical feasibility. *Clin J Am Soc Nephrol*, 6(2), 412-422.
- Peterson, L. W., & Artis, D. ,2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 14(3), 141-153.
- Philandrianos, C., Serrero, M., Grimaud, F., Magalon, J., Visée, C., Velier, M., ... & Sabatier, F. ,2018. First clinical case report of local microinjection of autologous fat and adipose-derived stromal vascular fraction for perianal fistula in Crohn's disease. *Stem Cell Res Ther*, 9(1), 1-6.
- Picard, C., Wysocki, J., Fioramonti, J., & Griffiths, N. M. ,2001. Intestinal and colonic motor alterations associated with irradiation-induced diarrhoea in rats. *Neurogastroenterol Motil*, 13(1), 19-26.
- Pillay, J., Ramakers, B. P., Kamp, V. M., Loi, A. L. T., Lam, S. W., Hietbrink, F., ... & Koenderman, L. ,2010. Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human experimental endotoxemia. *Journal Leukoc Biol*, 88(1), 211-220.
- Pitulescu, M. E., Schmidt, I., Giaimo, B. D., Antoine, T., Berkenfeld, F., Ferrante, F., ... & Adams, R. H. ,2017. Dll4 and Notch signalling couples sprouting angiogenesis and artery formation. *Nature cell biol*, 19(8), 915-927.
- Pizzarello, D. J., Isaak, D., Chua, K. E., & Rhyne, A. L. ,1964. Circadian rhythmicity in the sensitivity of two strains of mice to whole-body radiation. *Science*, 145(3629), 286-291.



- Plett, P. A., Sampson, C. H., Chua, H. L., Joshi, M., Booth, C., Gough, A., ... & Orschell, C. M. ,2012. Establishing a murine model of the hematopoietic syndrome of the acute radiation syndrome. *Health phys*, 103(4), 343.
- Polistena, A., Johnson, L. B., Ohiami-Masseron, S., Wittgren, L., Bäck, S., Thornberg, C., ... & Jeppsson, B. ,2008. Local radiotherapy of exposed murine small bowel: apoptosis and inflammation. *BMC Surg*, 8(1), 1-7.
- Pope, J. L., Bhat, A. A., Sharma, A., Ahmad, R., Krishnan, M., Washington, M. K., ... & Dhawan, P. ,2014. Claudin-1 regulates intestinal epithelial homeostasis through the modulation of Notch-signalling. *Gut*, 63(4), 622-634.
- Porvaznik, M. ,1979. Tight junction disruption and recovery after sublethal  $\gamma$  irradiation. *Radiat res*, 78(2), 233-250.
- Potten, C. S., O'Shea, J. A., Farrell, C. L., Rex, K., & Booth, C. ,2001. The effects of repeated doses of keratinocyte growth factor on cell proliferation in the cellular hierarchy of the crypts of the murine small intestine. *Cell Growth Differ*, 265-75.
- Potten, C. S., & Grant, H. K. ,1998. The relationship between ionizing radiation-induced apoptosis and stem cells in the small and large intestine. *Br J Cancer*, 78(8), 993-1003.
- Potten, C. S., Booth, D., & Haley, J. D. ,1997. Pretreatment with transforming growth factor beta-3 protects small intestinal stem cells against radiation damage in vivo. *Brit J Cancer*, 75(10), 1454-1459.
- Potten, C. S. ,1995. Interleukin-11 protects the clonogenic stem cells in murine small-intestinal crypts from impairment of their reproductive capacity by radiation. *Int J Cancer*, 62(3), 356-361.
- Potten, C. S., & Hendry, J. H. ,1995. Radiation and gut.
- Potten, C. S. ,1990. A comprehensive study of the radiobiological response of the murine (BDF1) small intestine. *Int J rad biol* 58(6), 925-973.
- Potten, C. S., Hume, W. J., Reid, P., & Cairns, J. ,1978. The segregation of DNA in epithelial stem cells. *Cell*, 15(3), 899-906.
- Prockop, D. J. ,2009. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Mol Ther*, 17(6), 939-946.
- Poussier, P., Ning, T., Banerjee, D., & Julius, M. ,2002. A unique subset of self-specific inraintestinal T cells maintains gut integrity. *J Expl Med*, 195(11), 1491-1497.
- Powell, A. E., Wang, Y., Li, Y., Poulin, E. J., Means, A. L., Washington, M. K., ... & Coffey, R. J. ,2012. The pan-ErbB negative regulator Lrig1 is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor. *Cell*, 149(1), 146-158.
- Powrie, F. ,1995. T cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles. *Immunity*, 3(2), 171-174.
- 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(6), 727-736.

- Pull, S. L., Doherty, J. M., Mills, J. C., Gordon, J. I., & Stappenbeck, T. S. ,2005. Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci*, 102(1), 99-104.
- Pumbwe, L., Skilbeck, C. A., Nakano, V., Avila-Campos, M. J., Piazza, R. M., & Wexler, H. M. ,2007. Bile salts enhance bacterial co-aggregation, bacterial-intestinal epithelial cell adhesion, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*. *Microb pathog*, 43(2-3), 78-87.
- Qi, Z., Li, Y., Zhao, B., Xu, C., Liu, Y., Li, H., ... & Chen, Y. G. ,2017. BMP restricts stemness of intestinal Lgr5+ stem cells by directly suppressing their signature genes. *Nat commun*, 8(1), 1-14.
- Qu M, Xiong L, Lyu Y, Zhang X, Shen J, Guan J, Chai P, Lin Z, Nie B, Li C, Xu J, Deng H. Establishment of intestinal organoid cultures modeling injury-associated epithelial regeneration. *Cell Res*. 2021 Mar;31(3):259-271.
- Quastler, H. ,1956. The nature of intestinal radiation death. *Radiation research*, 4(4), 303-320.
- Quist, R. G., Ton-Nu, H. T., Lillienau, J., Hofmann, A. F., & Barrett, K. E. ,1991. Bile salts cause histamine release from mast cells. *Gastroenterol*, 101, 1-11.
- Ramakrishnan, V. M., & Boyd, N. L. ,2018. The adipose stromal vascular fraction as a complex cellular source for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B: Rev*, 24(4), 289-299.
- Ren, G., Zhao, X., Zhang, L., Zhang, J., L'Huillier, A., Ling, W., ... & Shi, Y. ,2010. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol*, 184(5), 2321-2328.
- Reinecke, M. ,1985. Neurotensin: immunohistochemical localization in central and peripheral nervous system and in endocrine cells and its functional role as neurotransmitter and endocrine hormone. *Prog histochem cytochem*, 16(1), III-172.
- Resnick, I. B., & Slavin, S. ,2005. Lessons from bone marrow transplantation for a victim of a radiological accident with acute radiation syndrome. *Brit J Radiol*, (1), 21-25.
- Rezaei Rad, M., Bohlooli, M., Akhavan Rahnama, M., Anbarlou, A., Nazeman, P., & Khojasteh, A. ,2017. Impact of tissue harvesting sites on the cellular behaviors of adipose-derived stem cells: implication for bone tissue engineering. *Stem Cells Int*.
- Ringdén, O., Labopin, M., Gorin, N. C., Le Blanc, K., Rocha, V., Gluckman, E., ... & Frassoni, F. ,2004. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor after allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia increases the risk of graft-versus-host disease and death. *Biol Blood and Marrow Transplantation*, 10, 17.
- Rivollier, A., He, J., Kole, A., Valatas, V., & Kelsall, B. L. ,2012. Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *J Exp Med*, 209(1), 139-155.
- Rock, S. A., Jiang, K., Wu, Y., Liu, Y., Li, J., Weiss, H. L., ... & Evers, B. M. ,2022. Neurotensin regulates proliferation and stem cell function in the small intestine in a nutrient-dependent manner. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 13(2), 501-516.
- Roderick, T. H. ,1963. The response of twenty-seven inbred strains of mice to daily doses of whole-body X-irradiation. *Radiat Res*, 20(4), 631-639.

- Romagnani, S. ,2000. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol*, 85(1), 9-21.
- Romera-Hernández, M., Aparicio-Domingo, P., Papazian, N., Karrich, J. J., Cornelissen, F., Hoogenboezem, R. M., ... & Cupedo, T. ,2020. Yap1-driven intestinal repair is controlled by group 3 innate lymphoid cells. *Cell Rep*, 30(1), 37-45.
- Rosales, C. ,2020. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Leukoc Biol*, 108(1), 377-396.
- Rószter, T. (2015). Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators Inflamm*, 2015.
- Rotolo, J. A., Kolesnick, R., & Fuks, Z. ,2009. Timing of lethality from gastrointestinal syndrome in mice revisited. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 73(1), 6-8.
- Rubin, J. S., Osada, H., Finch, P. W., Taylor, W. G., Rudikoff, S., & Aaronson, S. A. ,1989. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci*, 86(3), 802-806.
- Rubin, W., Ross, L. L., Sleisenger, M. H., & Jefries, G. H. 1968. The normal human gastric epithelia. A fine structural study. *Lab Invest*, 19(6), 598-626.
- Rüster, B., Göttig, S., Ludwig, R. J., Bistran, R., Müller, S., Seifried, E., ... & Henschler, R. ,2006. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*, 108(12), 3938-3944.
- Ryan, J. M., Barry, F., Murphy, J. M., & Mahon, B. P. ,2007. Interferon- $\gamma$  does not break but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*, 149(2), 353-363.
- Saederup, N., Cardona, A. E., Croft, K., Mizutani, M., Cotleur, A. C., Tsou, C. L., ... & Charo, I. F. ,2010. Selective chemokine receptor usage by central nervous system myeloid cells in CCR2-red fluorescent protein knock-in mice. *PloS one*, 5(10), e13693.
- Saha, S., Aranda, E., Hayakawa, Y., Bhanja, P., Atay, S., Brodin, N. P., ... & Pollard, J. W. ,2016. Macrophage-derived extracellular vesicle-packaged WNTs rescue intestinal stem cells and enhance survival after radiation injury. *Nature Commun*, 7(1), 1-16.
- Sancho, R., Cremona, C. A., & Behrens, A. ,2015. Stem cell and progenitor fate in the mammalian intestine: Notch and lateral inhibition in homeostasis and disease. *EMBO reports*, 16(5), 571-581.
- Sangiorgi, E., & Capecchi, M. R. 2008. *Bmi1* is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nature Genet*, 40(7), 915-920.
- San Roman, A. K., Jayewickreme, C. D., Murtaugh, L. C., & Shivdasani, R. A. ,2014. Wnt secretion from epithelial cells and subepithelial myofibroblasts is not required in the mouse intestinal stem cell niche in vivo. *Stem Cell Reports*, 2(2), 127-134.
- Santaolalla, R., & Abreu, M. T. ,2012. Innate immunity in the small intestine. *Cur Opin Gastroenterol*, 28(2), 124.
- Sasaki, N., Sachs, N., Wiebrands, K., Ellenbroek, S. I., Fumagalli, A., Lyubimova, A., ... & Clevers, H. ,2016. Reg4+ deep crypt secretory cells function as epithelial niche for Lgr5+ stem cells in colon. *Proc Natl Acad Sci*, 113(37), E5399-E5407.

- Sasaki, M., Abe, R., Fujita, Y., Ando, S., Inokuma, D., & Shimizu, H. ,2008. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol*, 180(4), 2581-2587.
- Sasaki, H., Hirai, K., Yamamoto, H., Tanooka, H., Sakamoto, H., Iwamoto, T., ... & Ochiya, T. ,2004. HST-1/FGF-4 plays a critical role in crypt cell survival and facilitates epithelial cell restitution and proliferation. *Oncogene*, 23(20), 3681-3688.
- Sato, T., Van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., Van Den Born, M., ... & Clevers, H. ,2011. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*, 469(7330), 415-418.
- Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., Van De Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., ... & Clevers, H. ,2009. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459(7244), 262-265.
- Sauter, K. A., Pridans, C., Sehgal, A., Tsai, Y. T., Bradford, B. M., Raza, S., ... & Hume, D. A. ,2014. Pleiotropic effects of extended blockade of CSF1R signaling in adult mice. *J Leuk Biol*, 96(2), 265-274.
- Sawa, S., Cherrier, M., Lochner, M., Satoh-Takayama, N., Fehling, H. J., Langa, F., ... & Eberl, G. ,2010. Lineage relationship analysis of ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> innate lymphoid cells. *Science*, 330(6004), 665-669.
- Scanff, P. ,1999. Modified bile acid profiles in mixed neutron and gamma-irradiated pigs. *Int J radiat biol*, 75(2), 209-216.
- Scanff, P., Grison, S., Monti, P., Joubert, C., Griffiths, N. M., & Gourmelon, P. ,1997. Whole-body gamma irradiation modifies bile composition in the pig. *Radiat res*, 148(2), 175-180.
- Schneeberger, E. E., & Lynch, R. D. ,1992. Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol*, 262(6), L647-L661.
- Schneider, C., O'Leary, C. E., & Locksley, R. M. ,2019. Regulation of immune responses by tuft cells. *Nat Rev Immunol*, 19(9), 584-593.
- Sehgal, A., Donaldson, D. S., Pridans, C., Sauter, K. A., Hume, D. A., & Mabbott, N. A. ,2018. The role of CSF1R-dependent macrophages in control of the intestinal stem-cell niche. *Nat Commun*, 9(1), 1-17.
- Seifert, M., Stolk, M., Polenz, D., & Volk, H. D. ,2012. Detrimental effects of rat mesenchymal stromal cell pre-treatment in a model of acute kidney rejection. *Front Immunol*, 3, 202.
- Semenova, E., Grudniak, M. P., Bocian, K., Chroscinska-Krawczyk, M., Trochonowicz, M., Stepaniec, I. M., ... & Machaj, E. K. ,2021. Banking of AT-MSc and its Influence on Their Application to Clinical Procedures. *Front Bioeng Biotechnol*, 1205.
- Sémont, A., Demarquay, C., Bessout, R., Durand, C., Benderitter, M., & Mathieu, N. ,2013. Mesenchymal stem cell therapy stimulates endogenous host progenitor cells to improve colonic epithelial regeneration. *PLoS one*, 8(7), e70170.
- Sémont, A., Mouiseddine, M., Francois, A., Demarquay, C., Mathieu, N., Chapel, A., ... & Gourmelon, P. ,2010. Mesenchymal stem cells improve small intestinal integrity through regulation of endogenous epithelial cell homeostasis. *Cell Death Differ*, 17(6), 952-961.

- Serbina, N. V., & Pamer, E. G. ,2006. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol*, 7(3), 311-317.
- Serra, D., Mayr, U., Boni, A., Lukonin, I., Rempfler, M., Challet Meylan, L., ... & Liberali, P. ,2019. Self-organization and symmetry breaking in intestinal organoid development. *Nature*, 569(7754), 66-72.
- Serrero, M., Grimaud, F., Philandrianos, C., Visée, C., Sabatier, F., & Grimaud, J. C. ,2019. Long-term safety and efficacy of local microinjection combining autologous microfat and adipose-derived stromal vascular fraction for the treatment of refractory perianal fistula in Crohn's disease. *Gastroenterol*, 156(8), 2335-2337.
- Schaefer, A., Zwadlo, C., Fuchs, M., Meyer, G. P., Lippolt, P., Wollert, K. C., & Drexler, H. ,2010. Long-term effects of intracoronary bone marrow cell transfer on diastolic function in patients after acute myocardial infarction: 5-year results from the randomized-controlled BOOST trial—an echocardiographic study. *Eur J Echocardiogr*, 11(2), 165-171.
- Schäffler, A., & Schölmerich, J. ,2010. Innate immunity and adipose tissue biology. *Trends Immunol*, 31(6), 228-235.
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaili, S. A., Mardani, F., ... & Sahebkar, A. ,2018. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*, 233(9), 6425-6440.
- Shi, M., Li, J., Liao, L., Chen, B., Li, B., Chen, L., ... & Zhao, R. C. ,2007. Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice. *Haematologica*, 92(7), 897-904.
- Schmidt, A., Ladage, D., Steingen, C., Brixius, K., Schinköthe, T., Klinz, F. J., ... & Bloch, W. ,2006. Mesenchymal stem cells transmigrate over the endothelial barrier. *Eur J Cell Biol*, 85(11), 1179-1188.
- Shroyer, N. F., Helmrath, M. A., Wang, V. Y. C., Antalffy, B., Henning, S. J., & Zoghbi, H. Y. ,2007. Intestine-specific ablation of mouse atonal homolog 1 (*Math1*) reveals a role in cellular homeostasis. *Gastroenterol*, 132(7), 2478-2488.
- Silva, K. R., Liechocki, S., Carneiro, J. R., Claudio-da-Silva, C., Maya-Monteiro, C. M., Borojevic, R., & Baptista, L. S. ,2015. Stromal-vascular fraction content and adipose stem cell behavior are altered in morbid obese and post bariatric surgery ex-obese women. *Stem Cell Res Ther*, 6, 1-13
- Singh, V. K., Romaine, P. L., Newman, V. L., & Seed, T. M. ,2016. Medical countermeasures for unwanted CBRN exposures: part II radiological and nuclear threats with review of recent countermeasure patents. *Expert opinion on therapeutic patents*, 26(12), 1399-1408.
- Singh, V. K., Newman, V. L., Berg, A. N., & MacVittie, T. J. ,2015. Animal models for acute radiation syndrome drug discovery. *Expert opin Drug Discov*, 10(5), 497-517.
- Sjöblom, M. ,2011. Duodenal epithelial sensing of luminal acid: role of carbonic anhydrases. *Acta Physiol*, 201(1), 85-95.
- Slack, E., Hapfelmeier, S., Stecher, B., Velykoredko, Y., Stoel, M., Lawson, M. A., ... & Macpherson, A. J. ,2009. Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism. *Science*, 325(5940), 617-620.

- Smith, N. R., Davies, P. S., Levin, T. G., Gallagher, A. C., Keene, D. R., Sengupta, S. K., ... & Wong, M. H. 2017. Cell adhesion molecule CD166/ALCAM functions within the crypt to orchestrate murine intestinal stem cell homeostasis. *Cell Molecular Gastroenterol Hepatol*, 3(3), 389-409.
- Sneddon, J. B., Zhen, H. H., Montgomery, K., van de Rijn, M., Tward, A. D., West, R., ... & Brown, P. O. ,2006. Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci*, 103(40), 14842-14847.
- Snippert, H. J., Van Der Flier, L. G., Sato, T., Van Es, J. H., Van Den Born, M., Kroon-Veenboer, C., ... & Clevers, H. ,2010. Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell*, 143(1), 134-144.
- Snitow, M. E., Bhansali, R. S., & Klein, P. S. ,2021. Lithium and therapeutic targeting of GSK-3. *Cells*, 10(2), 255.
- Soehnlein, O., & Lindbom, L. ,2010. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*, 10(6), 427-439.
- Soehnlein, O., Zerneck, A., Eriksson, E. E., Rothfuchs, A. G., Pham, C. T., Herwald, H., ... & Lindbom, L. ,2008. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood*, 112(4), 1461-1471.
- Sohni, A., & Verfaillie, C. M. ,2013. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem cells Int*, 2013.
- Son, B. R., Marquez-Curtis, L. A., Kucia, M., Wysoczynski, M., Turner, A. R., Ratajczak, J., ... & Janowska-Wieczorek, A. ,2006. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells*, 24(5), 1254-1264.
- Sonnenberg, G. F., & Artis, D. ,2015. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat Med*, 21(7), 698-708.
- Song, N., Gao, L., Qiu, H., Huang, C., Cheng, H., Zhou, H., ... & Wang, J. ,2015. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibit leukemia/lymphoma cell proliferation in vitro and in a mouse model of allogeneic bone marrow transplant. *Int J Mol Med*, 36(1), 139-149.
- Sonis, S. T., O'donnell, K. E., Papat, R., Bragdon, C., Phelan, S., Cocks, D., & Epstein, J. B. ,2004. The relationship between mucosal cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and experimental radiation-induced mucositis. *Oral Oncol*, 40(2), 170-176.
- Sonis, S. T., Elting, L. S., Keefe, D., Peterson, D. E., Schubert, M., Hauer-Jensen, M., ... & Rubenstein, E. B. ,2004. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer*, 100(S9), 1995-2025.
- Sonis, S. T., Peterson, R. L., Edwards, L. J., Lucey, C. A., Wang, L., Mason, L., ... & Dorner, A. J. ,2000. Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. *Oral Oncol*, 36(4), 373-381.

- Souidi, M., Scanff, P., Grison, S., Gourmelon, P., & Aigueperse, J. ,2007. Effects of ionizing radiation on the activity of the major hepatic enzymes implicated in bile acid biosynthesis in the rat. *Comptes Rendus Biologies*, 330(12), 861-870.
- Spatola, G. J., Ostrander, E. A., & Mousseau, T. A. ,2021. The effects of ionizing radiation on domestic dogs: a review of the atomic bomb testing era. *Biol Rev*, 96(5), 1799-1815.
- Specian, R. D., & Oliver, M. G. ,1991. Functional biology of intestinal goblet cells. *Am J Physiol*, 260(2), C183-C193.
- Spielberger, R., Stiff, P., Bensinger, W., Gentile, T., Weisdorf, D., Kewalramani, T., ... & Emmanouilides, C. (2004). Palifermin for oral mucositis after intensive therapy for hematologic cancers. *N Engl J Med*, 351(25), 2590-2598.
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., ... & Vivier, E. ,2013. Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol*, 13(2), 145-149.
- Squillaro, T., Peluso, G., & Galderisi, U. ,2016. Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update. *Cell Transplant*, 25(5), 829-848.
- Stamatakis, D., Holder, M., Hodgetts, C., Jeffery, R., Nye, E., Spencer-Dene, B., ... & Lewis, J. ,2011. Delta1 expression, cell cycle exit, and commitment to a specific secretory fate coincide within a few hours in the mouse intestinal stem cell system. *PLoS One*, 6(9), e24484.
- Stanko, P., Kaiserova, K., Altanerova, V., & Altaner, C. ,2014. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 158(3), 373-377
- Stokman, M. A., Spijkervet, F. K. L., Burlage, F. R., Dijkstra, P. U., Manson, W. L., De Vries, E. G. E., & Roodenburg, J. L. N. ,2003. Oral mucositis and selective elimination of oral flora in head and neck cancer patients receiving radiotherapy: a double-blind randomised clinical trial. *Brit J Cancer*, 88(7), 1012-1016.
- Storek, J., Dawson, M. A., Storer, B., Stevens-Ayers, T., Maloney, D. G., Marr, K. A., ... & Boeckh, M. ,2001. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood*, 97(11), 3380-3389.
- Storer, J. B. ,1966. Acute responses to ionizing radiation. *Biol lab mouse*, 2.
- Stutchfield, B. M., Antoine, D. J., Mackinnon, A. C., Gow, D. J., Bain, C. C., Hawley, C. A., ... & Forbes, S. J. ,2015. CSF1 restores innate immunity after liver injury in mice and serum levels indicate outcomes of patients with acute liver failure. *Gastroenterol*, 149(7), 1896-1909.
- Subramanian, V., & Ferrante Jr, A. W. ,2009. Obesity, inflammation, and macrophages. In *Emerging Societies-Coexistence of Childhood Malnutrition and Obesity* (Vol. 63, pp. 151-162). Karger Publishers.
- Sun, J., Zhang, Y., Song, X., Zhu, J., & Zhu, Q. ,2019. The healing effects of conditioned medium derived from mesenchymal stem cells on radiation-induced skin wounds in rats. *Cell Transplant*, 28(1), 105-115.
- Sunderkötter, C., Nikolic, T., Dillon, M. J., Van Rooijen, N., Stehling, M., Drevets, D. A., & Leenen, P. J. 2004. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol*, 172(7), 4410-4417.

- Svalgaard, J. D., Juul, S., Vester-Glovinski, P. V., Haastrup, E. K., Ballesteros, O. R., Lynggaard, C. D., ... & Munthe-Fog, L. ,2020. Lipoaspirate storage time and temperature: effects on stromal vascular fraction quality and cell composition. *Cells Tissues Organs*, 209(1), 54-63.
- Takashima, S., Martin, M. L., Jansen, S. A., Fu, Y., Bos, J., Chandra, D., ... & Hanash, A. M. ,2019. T cell–derived interferon- $\gamma$  programs stem cell death in immune-mediated intestinal damage. *Sci Immunol*, 4(42), eaay8556.
- Takeda, N., Jain, R., LeBoeuf, M. R., Wang, Q., Lu, M. M., & Epstein, J. A. ,2011. Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. *Science*, 334(6061), 1420-1424.
- Tamoutounour, S., Henri, S., Lelouard, H., de Bovis, B., de Haar, C., van der Woude, C. J., ... & Guilliams, M. ,2012. CD 64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the T h1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis. *Eur J Immunol*, 42(12), 3150-3166.
- Tanoue, T., Atarashi, K., & Honda, K. ,2016. Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*, 16(5), 295-309.
- Tavassoli, M., & Crosby, W. H. ,1968. Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science*, 161(3836), 54-56.
- Terry, N. H., & Travis, E. L. ,1989. The influence of bone marrow depletion on intestinal radiation damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 17(3), 569-573.
- Tetteh, P. W., Basak, O., Farin, H. F., Wiebrands, K., Kretzschmar, K., Begthel, H., ... & Clevers, H. ,2016. Replacement of lost Lgr5-positive stem cells through plasticity of their enterocyte-lineage daughters. *Cell stem cell*, 18(2), 203-213.
- Tinganelli, W., Hitrec, T., Romani, F., Simoniello, P., Squarcio, F., Stanzani, A., ... & Cerri, M. ,2019. Hibernation and radioprotection: gene expression in the liver and testicle of rats irradiated under synthetic torpor. *Int J Mol Sci*, 20(2), 352.
- Tiryaki, T., Condé-Green, A., Cohen, S. R., Canikyan, S., & Kocak, P. ,2020. A 3-step Mechanical Digestion Method to Harvest Adipose-derived Stromal Vascular Fraction. *Plast Reconstr Surg Glob Open*, 8(2).
- Trottier, M. D., Irwin, R., Li, Y., McCabe, L. R., & Fraker, P. J. ,2012. Enhanced production of early lineages of monocytic and granulocytic cells in mice with colitis. *Proc Natl Acad Sci*, 109(41), 16594-16599.
- Trzebanski, S., & Jung, S. ,2020. Plasticity of monocyte development and monocyte fates. *Immunol Lett*, 227, 66-78.
- Valenta, T., Degirmenci, B., Moor, A. E., Herr, P., Zimmerli, D., Moor, M. B., ... & Basler, K. ,2016. Wnt ligands secreted by subepithelial mesenchymal cells are essential for the survival of intestinal stem cells and gut homeostasis. *Cell reports*, 15(5), 911-918.
- Valla, D. C. ,2013. Cholestase. *Hépatogastro & oncologie digestive*, 20(8), 618-627.
- Van Bekkum, D. W., & Schotman, E. ,1974. Protection from haemopoietic death by shielding versus grafting of bone-marrow. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 25(4), 361-372.



- Van der Flier, L. G., van Gijn, M. E., Hatzis, P., Kujala, P., Haegebarth, A., Stange, D. E., ... & Clevers, H. ,2009. Transcription factor achaete scute-like 2 controls intestinal stem cell fate. *Cell*, 136(5), 903-912.
- Van Der Flier, L. G., & Clevers, H. ,2009. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu rev physiol*, 71, 241-260.
- VanDussen, K. L., Carulli, A. J., Keeley, T. M., Patel, S. R., Puthoff, B. J., Magness, S. T., ... & Samuelson, L. C. 2012. Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development*, 139(3), 488-497.
- Van Es, J. H., Haegebarth, A., Kujala, P., Itzkovitz, S., Koo, B. K., Boj, S. F., ... & Clevers, H. ,2012. A critical role for the Wnt effector Tcf4 in adult intestinal homeostatic self-renewal. *Mol Cell Biol*, 32(10), 1918-1927.
- Van Es, J. H., Van Gijn, M. E., Riccio, O., Van Den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., ... & Clevers, H. ,2005. Notch/ $\gamma$ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature*, 435(7044), 959-963.
- Van Wijk, F., & Cheroutre, H. ,2010. Mucosal T cells in gut homeostasis and inflammation. *Exp Rev Clin Immunol*, 6(4), 559-566.
- Viswanathan, S., Shi, Y., Galipeau, J., Krampera, M., Leblanc, K., Martin, I., ... & Sensebe, L. ,2019. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy*, 21(10), 1019-1024.
- Von Moltke, J., Ji, M., Liang, H. E., & Locksley, R. M. ,2016. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2–epithelial response circuit. *Nature*, 529(7585), 221-225.
- Voswinkel, J., Francois, S., Simon, J. M., Benderitter, M., Gorin, N. C., Mohty, M., ... & Chapel, A. ,2013. Use of mesenchymal stem cells (MSC) in chronic inflammatory fistulizing and fibrotic diseases: a comprehensive review. *Clin Rev in Allergy Immunol*, 45, 180-192.
- Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., ... & Ho, A. D. ,2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp hematol*, 33(11), 1402-1416.
- Wang, N., Liang, H., & Zen, K. ,2014. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1–M2 polarization balance. *Front Immunol*, 5, 614.
- Wang, D., Zhang, H., Liang, J., Li, X., Feng, X., Wang, H., ... & Sun, L. ,2013. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus: 4 years of experience. *Cell Transplant*, 22(12), 2267-2277.
- Wang, J., Boerma, M., Fu, Q., & Hauer-Jensen, M. ,2007. Significance of endothelial dysfunction in the pathogenesis of early and delayed radiation enteropathy. *WorldJ Gastroenterol*, 13(22), 3047.
- Wang, J., Zheng, H., Kulkarni, A., Ou, X., & Hauer-Jensen, M. ,2006. Regulation of early and delayed radiation responses in rat small intestine by capsaicin-sensitive nerves. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 64(5), 1528-1536.

- Wang, J., Albertson, C. M., Zheng, H., Fink, L. M., Herbert, J. M., & Hauer-Jensen, M. ,2002. Short-term inhibition of ADP-induced platelet aggregation by clopidogrel ameliorates radiation-induced toxicity in rat small intestine. *Thromb haemost*, 87(01), 122-128.
- Watchmaker, P. B., Lahl, K., Lee, M., Baumjohann, D., Morton, J., Kim, S. J., ... & Butcher, E. C. (2014). Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat Immunol*, 15(1), 98-108.
- Wechsler, M. E., Rao, V. V., Borelli, A. N., & Anseth, K. S. ,2021. Engineering the MSC secretome: a hydrogel focused approach. *Adv Healthc Mater*, 10(7), 2001948.
- Wei, X., Yang, X., Han, Z. P., Qu, F. F., Shao, L., & Shi, Y. F. ,2013. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin*, 34(6), 747-754.
- Welniak, L. A., Khaled, A. R., Anver, M. R., Komschlies, K. L., Wiltrott, R. H., Durum, S., ... & Murphy, W. J. ,2001. Gastrointestinal cells of IL-7 receptor null mice exhibit increased sensitivity to irradiation. *J immunol*, 166(5), 2923-2928.
- Wershil, B. K., & Furuta, G. T. ,2008. 4. Gastrointestinal mucosal immunity. *J Allergy Clin Immunol*, 121(2), S380-S383.
- Wiernik, G., & Perrins, D. ,1975. The radiosensitivity of a mesenchymal tissue. The pericryptal fibroblast sheath in the human rectal mucosa. *Br J Radiol* , 48(569), 382-389.
- Williams, J. P., Brown, S. L., Georges, G. E., Hauer-Jensen, M., Hill, R. P., Huser, A. K., ... & McBride, W. H. ,2010. Animal models for medical countermeasures to radiation exposure. *Radiat Res*, 173(4), 557-578.
- Williams, R. M., Berthoud, H. R., & Stead, R. H. ,1997. Vagal afferent nerve fibres contact mast cells in rat small intestinal mucosa. *Neuroimmunomodulation*, 4(5-6), 266-270.
- Withers, H. R. ,1971. Regeneration of intestinal mucosa after irradiation. *Cancer*, 28(1), 75-81.
- Wynn, T. A., & Vannella, K. M. ,2016. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity*, 44(3), 450-462.
- Wynn, R. F., Hart, C. A., Corradi-Perini, C., O'Neill, L., Evans, C. A., Wraith, J. E., ... & Bellantuono, I. ,2004. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*, 104(9), 2643-2645.
- Xiao, Q., Boushey, R. P., Drucker, D. J., & Brubaker, P. L. ,1999. Secretion of the intestinotropic hormone glucagon-like peptide 2 is differentially regulated by nutrients in humans. *Gastroenterol*, 117(1), 99-105.
- Yang, W., Tao, Y., Wu, Y., Zhao, X., Ye, W., Zhao, D., ... & Tang, L. ,2019. Neutrophils promote the development of reparative macrophages mediated by ROS to orchestrate liver repair. *Nature commun*, 10(1), 1076.
- Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X. F., & Wang, H. ,2014. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res*, 2(1), 1-9.
- Yang, Q., Bermingham, N. A., Finegold, M. J., & Zoghbi, H. Y. ,2001. Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science*, 294(5549), 2155-2158.

- Yeoh, E., Horowitz, M., Russo, A., Muecke, T., Robb, T., Maddox, A., & Chatterton, B. ,1993. Effect of pelvic irradiation on gastrointestinal function: a prospective longitudinal study. *American J. medicine*, 95(4), 397-406.
- Yin, J. Q., Zhu, J., & Ankrum, J. A. ,2019. Manufacturing of primed mesenchymal stromal cells for therapy. *Nat Biomed Eng*, 3(2), 90-104.
- Yona, S., Kim, K. W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., ... & Jung, S. ,2013. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, 38(1), 79-91.
- Yu, S., Tong, K., Zhao, Y., Balasubramanian, I., Yap, G. S., Ferraris, R. P., ... & Gao, N. ,2018. Paneth cell multipotency induced by notch activation following injury. *Cell stem cell*, 23(1), 46-59.
- Yui S, Azzolin L, Maimets M, Pedersen MT, Fordham RP, Hansen SL, Larsen HL, Guiu J, Alves MRP, Rundsten CF, Johansen JV, Li Y, Madsen CD, Nakamura T, Watanabe M, Nielsen OH, Schweiger PJ, Piccolo S, Jensen KB. YAP/TAZ-Dependent Reprogramming of Colonic Epithelium Links ECM Remodeling to Tissue Regeneration. *Cell Stem Cell*. 2018 Jan 4;22(1):35-49.e7.
- Zeng, B., Shi, S., Ashworth, G., Dong, C., Liu, J., & Xing, F. ,2019. ILC3 function as a double-edged sword in inflammatory bowel diseases. *Cell death Dis*, 10(4), 1-12.
- Zhong, Y., Pouliot, M., Downey, A. M., Mockbee, C., Roychowdhury, D., Wierzbicki, W., & Authier, S. ,2021. Efficacy of delayed administration of sargramostim up to 120 hours post exposure in a nonhuman primate total body radiation model. *Int J Radiat Biol* 97(sup1), S100-S116.
- Zhu, G., Hu, J., & Xi, R. ,2021. The cellular niche for intestinal stem cells: a team effort. *Cell Regen*, 10(1), 1-16.
- Zhu, P., Zhu, X., Wu, J., He, L., Lu, T., Wang, Y., ... & Fan, Z. ,2019. IL-13 secreted by ILC2s promotes the self-renewal of intestinal stem cells through circular RNA circPan3. *Nat Immunol*, 20(2), 183-194.
- Zigmond, E., & Jung, S. ,2013. Intestinal macrophages: well educated exceptions from the rule. *Trends Immunol*, 34(4), 162-168.
- Zigmond, E., Varol, C., Farache, J., Elmaliah, E., Satpathy, A. T., Friedlander, G., ... & Jung, S. ,2012. Ly6Chi monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen-presenting cells. *Immunity*, 37(6), 1076-1090.

# Annexes

---



## Matériels et Méthodes d'obtention des organoïdes

### Isolation des cryptes intestinales :

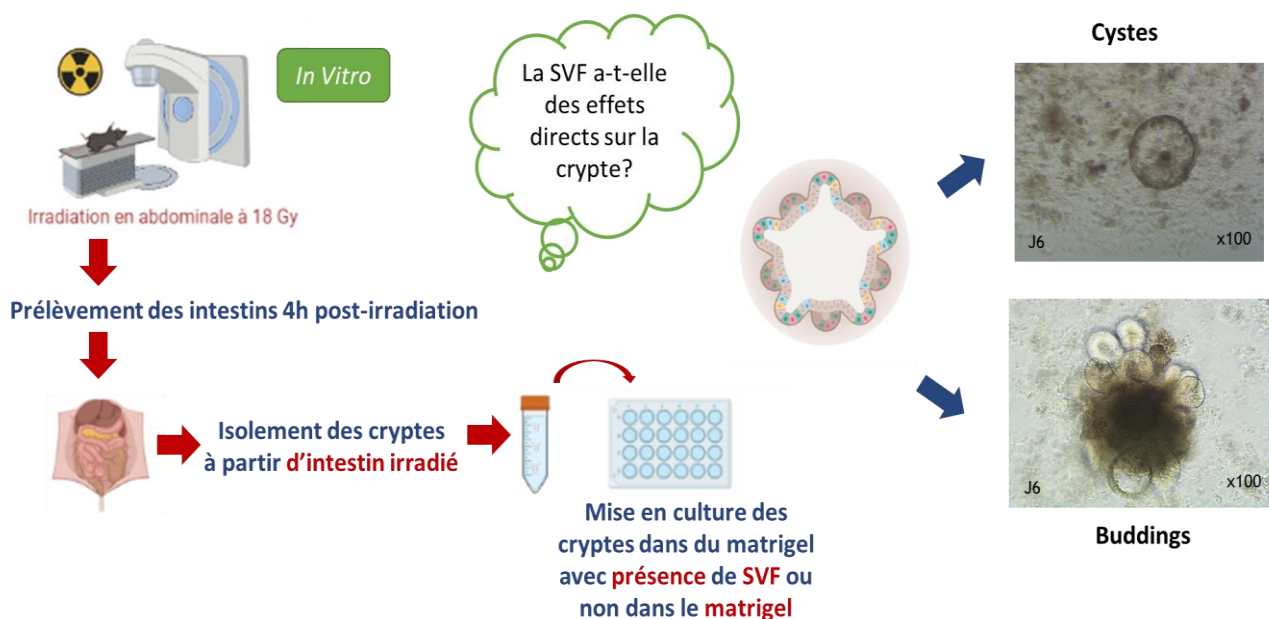
L'intestin grêle des souris ont été prélevés, rincés avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) et ouverts longitudinalement. Les villosités ont ensuite été délicatement grattées à l'aide d'une lame de verre, lavées trois fois avec du PBS, coupées en segments de 1cm, déposées dans un tube de 50 ml contenant 20 ml de PBS froid sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  et lavées trois fois. Les segments intestinaux ont été remis en suspension dans un tube de 50 ml contenant du PBS froid avec 5 mM EDTA et incubés à 4°C sur un rotor pendant 30 minutes. Les intestins grêles ont été collectés et lavés dans un tube de 50 ml contenant 15 ml de PBS froid sans  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ . Les segments d'intestin ont été à nouveau incubés dans un tube de 50 ml contenant du PBS froid avec 2,5 mM EDTA sur un rotor à 4°C pendant 30 minutes, puis lavés dans un tube de 50 ml contenant 15 ml de PBS froid sans  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ . Les intestins grêles ont été remis en suspension dans un nouveau tube de 50 ml contenant 15 ml de PBS froid sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  et agités doucement pendant 40 secondes. Après sédimentation des segments d'intestin le surnageant a été recueilli et filtré au travers d'un filtre de 70  $\mu\text{m}$  et conservé comme fraction 1 (F1). La procédure a été répétée sur les segments d'intestin pour obtenir les fractions 2-3 (F2-F3). Les fractions ont été centrifugées à 200g pendant 5 minutes à 4°C, puis le culot a été remis en suspension dans 3 mL de milieu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 contenant 5% SVF (Gibco). A la suite de cette étape, les fractions ont été à nouveau recentrifugées à 200g pendant 5 minutes à 4°C. Les culots ont été remis en suspension dans un volume de Matrigel froid dépendant du nombre de puits à réaliser.

### Mise en culture des cryptes :

Les cryptes libérées dans la fraction obtenue à partir de souris témoins et irradiées ont été séparées en deux culots, un culot pour la condition sans SVF et un culot a été remis en suspension avec 50 000 cellules de la SVF dans du Matrigel froid (Corning). 50  $\mu\text{l}$  de Matrigel contenant les cryptes ont été déposés dans chaque puits d'une plaque de 24 puits pour créer des dômes de Matrigel. Les plaques sont incubées à 37°C pendant 15 min afin de solidifier le matrigel. Ensuite, 500  $\mu\text{L}$  de milieu de culture organoïde ((DMEM)/F12 supplémenté en pénicilline/streptomycine, 5% SVF, 10 mM HEPES, Glutamax, B27, N2 (tous de Thermo fisher),

100 µg/ml primocine (Invivogen), 1mM NAC (Sigma), 50 ng/ml Noggin, 100 ng/ml Wnt3a, et 1µg/ml Rspodin-1 (tous de R&D Systems), 50 ng/ml EGF (Peprotech) a été ajouté à chaque puits pour la mise en culture à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO2. Le milieu a été changé 24 heures après la mise en culture, puis tous les 2 jours. Le suivi de la culture a été réalisé à l'Incucyte, un incubateur de cellules associé à un système d'imagerie relié à un ordinateur. L'Incucyte a permis de visualiser l'évolution au cours du temps des cryptes en organoïdes provenant des souris témoins et irradiées mise en présence ou non de SVF. Le nombre d'organoïdes formant des cystes et des « buddings » a été évalué par rapport au nombre total d'organoïdes présents dans chaque puits par le système d'imagerie Archimed.

Pour les études d'immunohistologie, les plaques de 24 puits ont été rincées deux fois avec du PBS froid avant l'ajout de la solution de récupération cellulaire (cell recovery solution; BD Biosciences). Les plaques ont été incubées 30 minutes à +4°C sur un rotor orbital, puis les organoïdes dans le Matrigel dissous ont été centrifugés 10 minutes à 300 g, lavés une fois avec du PBS froid. Les organoïdes ont été ensuite fixés 30 min dans du formol à 4%, lavés dans du PBS puis inclus dans de l'agarose à bas point de fusion à 3%. Des coupes de 5 µm d'épaisseur d'agarose contenant les organoïdes ont été déparaffinées et réhydratées pour les marquages immunohistologiques.



Mise en place du protocole expérimentale du modèle des organoïdes





## **Impact de la fraction stromale-vasculaire du tissu adipeux pour la régénération de la muqueuse intestinale dans le syndrome gastro-intestinal radio-induit**

L'exposition aux rayonnements ionisants suite à un accident d'irradiation ou un acte de malveillance peut concerner à la fois des personnes civiles et militaires. Cette exposition peut engendrer des conséquences graves sur la santé des personnes exposées et impacter potentiellement un grand nombre de personnes. Chez l'homme, les doses supérieures à 6 Gy sur un large volume induisent principalement une destruction de la moelle osseuse et des lésions gastrointestinales, entraînant diarrhée, déshydratation, septicémie et hémorragie intestinale avec une mortalité dans les 10 à 15 jours suivant l'exposition. Ce syndrome léthal résulte de la perte de cellules souches intestinales (CSI) et entrave ainsi la régénération épithéliale. L'épithélium intestinal ainsi endommagé entraîne une rupture de la barrière favorisant l'influx systémique d'agents pathogènes bactériens. Ces symptômes gastro-intestinaux sont collectivement connus sous le nom de syndrome gastro-intestinal radio-induit (SGI). Engageant rapidement le pronostic vital, le SGI est encore aujourd'hui face à un mur thérapeutique et sa prise en charge n'est que symptomatique. De plus, le délai d'intervention pour le traitement des personnes irradiées est primordial et il existe un besoin énorme de mesures thérapeutiques efficaces et rapides. Le traitement par des produits dérivés du tissu adipeux et plus particulièrement la fraction stromale-vasculaire (SVF) est compatible avec des traitements d'urgence (pouvant être préparée à proximité du bloc opératoire et sans culture cellulaire). Les retombées potentielles de cette étude seront importantes pour la prise en charge médicale et rapide des personnes irradiées présentant un SGI. L'objectif de cette thèse est d'identifier les cibles cellulaires du traitement par la SVF dans un environnement intestinal déficitaire en cellules souches intestinales induit par l'irradiation et d'évaluer le rôle et l'importance des cellules myélo-monocytaires de l'hôte dans les interactions stroma-cellules souches intestinales pour la régénération intestinale chez la souris. La première étape est axée sur l'évaluation des cellules intestinales cibles du traitement du SGI par la SVF. La deuxième étude consistera à évaluer le rôle des monocytes/macrophages dans le SGI et leur participation dans les effets thérapeutiques induit par la SVF. Cette étude a permis de montrer un effet direct de la SVF sur le compartiment cellule souche et que la coopération entre le monocyte de la SVF et le monocyte de l'hôte est nécessaire pour assurer l'efficacité de la SVF pour le SGI.

Mots clés : Irradiation, Accident, Intestin, Fraction stromale vasculaire (SVF), Immunité, Cellules Souches, Thérapie Cellulaire

## **The stromal vascular fraction for the treatment of the radiation induced gastro-intestinal syndrome**

Exposure to ionizing radiation following an irradiation accident or a terrorism act can affect both civilians and military personnel. This exposure can have serious consequences on the health of exposed persons and potentially impact a large number of people. In humans, doses higher than 6 Gy over a large volume mainly induce bone marrow destruction and gastrointestinal lesions, leading to diarrhea, dehydration, septicemia and intestinal hemorrhage with mortality within 10 to 15 days after exposure. This lethal syndrome induces the loss of intestinal stem cells (ISC) and thus, impairs epithelial regeneration. The damaged intestinal epithelium results in a breakdown of the barrier, allowing systemic influx of bacterial pathogens. These gastrointestinal symptoms are collectively known as radiation-induced gastrointestinal syndrome (GIS). Although life-threatening, GIS is still facing a therapeutic wall and its management is only symptomatic. Moreover, the time of intervention for the treatment of irradiated persons is primordial and there is a huge need for effective and rapid therapeutic measures. Treatment with products derived from adipose tissue and more particularly the stromal-vascular fraction (SVF) is compatible with emergency treatment (can be prepared close to the operating room and without cell culture). The potential impact of this study will be important for the medical and rapid management of irradiated persons with a GIS. The objective of this thesis is to identify cellular targets of SVF treatment in an irradiation-induced intestinal stem cell deficient environment. The second objective is to evaluate the role and importance of host monocytes cells and the interaction between the host immunity and the stroma-intestinal stem cell for intestinal regeneration in mice. The first step is focused on the evaluation of intestinal cells targeted by SVF treatment of IGS. The second step will evaluate the role of monocytes/macrophages in GIS and their involvement in the therapeutic effects induced by SVF. This study demonstrated a direct effect of SVF on the stem cell compartment and that the cooperation between the SVF monocyte and the host monocyte is necessary for SVF to be effective in GIS.

Key Words : Irradiation, Accident, Intestine, Stromal Vascular Fraction (SVF), Immunity, Stem Cell, Cell Therapy