

Université de Montréal

**Étude des effets du phénotype de sénescence des cellules stromales de la
moelle osseuse sur les fonctions hématopoïétiques**

par

Cynthia Carbonneau

Département de Pharmacologie, Université de Montréal

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Pharmacologie

Décembre 2012

© Cynthia Carbonneau, 2012

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée:

**Étude des effets du phénotype de sénescence des cellules stromales de la
moelle osseuse sur les fonctions hématopoïétiques**

présentée par :

Cynthia Carbonneau

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Audrey Claing, président-rapporteur

Dr Christian Beauséjour, directeur de recherche

Dr Richard Momparler, membre du jury

Dr Imed Gallouzi, examinateur externe

Dr Gerardo Ferbeyre, représentant du doyen

À mon amour, Sébastien Talbot,
qui m'a fait voir tout ce que je pouvais accomplir

À mon mentor, Christian Beauséjour,
qui m'a montré comment y parvenir

À ma famille, Leslie, Linda et André Carbonneau,
qui m'ont encouragée tout au long du parcours

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Christian Beauséjour, pour m'avoir permis d'entreprendre cette grande aventure que sont les études graduées. Je tiens à le remercier pour son ouverture d'esprit, sa patience et son incroyable disponibilité.

J'aimerais aussi témoigner ma gratitude à mes collègues de laboratoire et à ceux de notre laboratoire «élargi» pour leur contribution intellectuelle et leur soutien moral, en particulier à Dre Basma Benabdallah, Dre Geneviève Despars, Oanh Lê, Yannick Landry, Audrey Fortin, Vimal Krishnan et Lina Palacio du labo Beauséjour et à Sonia Desjardins, Joëlle Grégoire-Gauthier, Ludovic Durrieu, François Fontaine, Mame Massar Dieng, Sylvia Selleri et Arnaud Duval du labo Haddad.

Merci aussi à tous les membres des *labmeetings* du mardi midi pour leurs remarques et commentaires qui ont permis de faire avancer ce travail dans la bonne direction.

Merci à mes collaborateurs scientifiques, Shanti Rojas-Sutterlin, Dr Trang Hoang et Dr Réjean Couture, ainsi qu'au personnel de l'animalerie, tout particulièrement Denise Carrier, Véronique et André.

Je tiens à souligner l'aide incroyable reçue de Dre Basma Benabdallah et Dr Sébastien Talbot pour la rédaction de cette thèse. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout le temps que vous m'avez consacré et vos suggestions judicieuses qui m'ont permis de remettre un travail de qualité dans des délais aussi courts.

Enfin, je ne peux pas passer sous silence le soutien indéfectible de ma famille. Merci Maman, Papa, Leslie, Pauline et Sébastien. Merci d'avoir fait ce grand tour de manège avec moi, ça en a valu la peine! Et surtout, merci mon amour de m'avoir poussée à me dépasser constamment. Tu as su voir en moi un potentiel que je ne soupçonnais même pas.

Finalement, je tiens à remercier les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) pour avoir subventionné ce travail. Je tiens également à souligner le support financier que j'ai reçu sous forme de bourses de la Fondation des Étoiles et la Fondation du CHU Ste-Justine, de la Fondation Georges-Phenix, du Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ), des IRSC et de la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales de l'Université de Montréal (FESP) (bourse de passage accéléré au doctorat et bourse de voyage Olive-Beaudry-Leriché).

RÉSUMÉ

L'irradiation (IR) est utilisée dans le traitement de plusieurs cancers et désordres hématologiques, en particulier dans les protocoles de conditionnement précédents les transplantations de moelle osseuse. L'emploi de doses réduites d'IR semble favoriser le succès de la prise de greffe. Cette observation soulève un point de plus en plus discuté dans la littérature, soit l'importance de l'intégrité du microenvironnement pour la transplantation et le bon fonctionnement de l'hématopoïèse. L'IR induit la sénescence des cellules stromales de la moelle osseuse *in vitro*. Ce mécanisme de défense cellulaire entraînant un arrêt de prolifération permanent est également observé *in vivo* dans différents systèmes, mais n'a pas encore été étudié dans le contexte de la niche hématopoïétique. Les travaux présentés dans cette thèse ont pour objectif de déterminer si l'IR induit la sénescence des cellules stromales de la moelle osseuse et si une telle induction altère les fonctions hématopoïétiques. Nos résultats ont permis de démontrer pour la première fois qu'une IR corporelle totale induit effectivement la sénescence des cellules stromales de la moelle osseuse. En outre, cette altération du microenvironnement affecte la lymphopoïèse B de façon Ink4a/Arf-dépendante (1^{er} article). De plus, les modifications systémiques qui résultent de l'IR compromettent l'homéostasie osseuse en augmentant la résorption de l'os, sans toutefois diminuer la formation de celui-ci (2^e article). Ces données nous permettent de mieux comprendre les effets de la sénescence des cellules stromales de la moelle osseuse sur les fonctions hématopoïétiques. Par ailleurs, elles suggèrent que l'emploi de drogues et/ou de procédés n'induisant pas la sénescence des cellules stromales de l'os offrirait un meilleur pronostic à long terme pour les patients.

Mots clés : irradiation, sénescence, microenvironnement osseux, cellules stromales de la moelle osseuse, INK4a/ARF, fonctions hématopoïétiques, homéostasie osseuse, ostéoblastes, ostéoclastes

ABSTRACT

Ionizing radiation (IR) is used in the treatment of several cancers and hematological disorders, especially in conditioning regimens for bone marrow transplantation. Reduced doses of IR seem to favor the success of engraftment. This observation supports the growing evidences suggesting the importance of the microenvironment integrity for the success of bone marrow transplantation and hematopoiesis maintenance. IR induces senescence of bone marrow stromal cells *in vitro*. This defense mechanism which leads to a permanent cell growth arrest is also observed in different organs *in vivo* but has not yet been studied in the hematopoietic niche. The objectives of this doctoral thesis are to determine whether IR induces senescence of bone marrow stromal cells and whether such induction alters hematopoietic functions. Our results have demonstrated for the first time that total body IR actually induces the senescence of bone marrow stromal cells. Furthermore, this alteration of the microenvironment affects B lymphopoiesis in an Ink4a/Arf-dependent manner (paper #1). In addition, the systemic changes associated with IR compromise bone homeostasis by increasing bone resorption without reducing bone formation (paper #2). All together, these data enhance our knowledge related to the effects of IR-induced senescent bone marrow stromal cells on hematopoietic function. Moreover, our results suggest that using drugs and/or procedures inducing no senescent bone marrow stromal cells would provide a better long-term prognosis for patients.

Keywords : ionizing radiation, senescence, bone marrow microenvironnement, bone marrow stromal cells, INK4a/ARF, hematopoietic function, bone homeostasis, osteoblasts, osteoclasts

PRÉAMBULE

Mes travaux de recherche avaient pour objectif de déterminer les effets du phénotype de sénescence des cellules stromales de la moelle osseuse sur les fonctions hématopoïétiques. Brièvement, la sénescence est un mécanisme de protection cellulaire bloquant la prolifération des cellules endommagées. Ces dernières demeurent toutefois actives dans le tissu et acquièrent un profil propre à leur nouvel état. Il existe plusieurs types d'inducteurs de sénescence qui ont tous en commun la production de dommages à l'ADN. Nous nous sommes intéressés à l'irradiation (IR) puisqu'elle est utilisée dans le traitement de plusieurs cancers et désordres hématologiques. Entre autres, elle sert dans les protocoles de conditionnement précédents les transplantations de moelle osseuse. Fait étonnant, il a été observé que l'exposition à une dose réduite d'IR améliorerait le taux de succès de la prise de greffe. Cette observation soulève un point qui est de plus en plus discuté dans la littérature, soit l'importance de l'intégrité du microenvironnement pour le bon fonctionnement de l'organe cible. En effet, plusieurs études ont démontré qu'un microenvironnement contenant des cellules endommagées était néfaste pour le potentiel régénératif des tissus en question. Bien que la preuve de l'induction de la sénescence par l'IR ait été faite dans certains types cellulaires, elle n'a pas été démontrée *in vivo* dans les cellules stromales de la moelle osseuse. Ainsi, le premier objectif de cette thèse visait à déterminer si l'IR induirait la sénescence des cellules stromales de la moelle osseuse et si une telle induction altérerait les fonctions hématopoïétiques.

En exposant des souris C57Bl/6 à une IR corporelle totale, nous avons constaté l'induction de marqueurs de sénescence, notamment la bêta-galactosidase associée à la

sénescence (SA- β -gal) et l'expression de p16INK4a/p19ARF, dans les cellules stromales de la moelle osseuse. De plus, huit semaines après cette exposition, leur compte absolu était diminué dans la fraction isolée de la moelle, un effet absent chez les souris irradiées invalidées pour les gènes *Ink4a/Arf* et qui semble indépendant du potentiel des cellules stromales à former des colonies de type fibroblaste. Cette réduction était spécifique puisqu'elle n'était pas observée dans la fraction des cellules stromales isolée des os à la collagénase. Étonnamment, nous avons également constaté un effet cellulaire non-autonome et *Ink4a/Arf*-dépendant de l'IR sur la lymphopoïèse B. Globalement, nos résultats révèlent une sensibilité distincte des différentes populations de cellules stromales de la moelle osseuse à l'IR et suggèrent qu'un dommage résiduel à long terme au microenvironnement peut influencer l'hématopoïèse d'une manière *Ink4a/Arf*-dépendante.

Au cours des dernières décennies, une amélioration significative des modalités de traitement des leucémies pédiatriques a permis d'augmenter le taux de survie des patients ainsi que leur espérance de vie. Plusieurs années suivant la guérison, on constate maintenant que cette population de survivants est atteinte de nombreuses complications. En particulier, on observe une forte corrélation entre l'IR et la probabilité de fracture. Comme les cellules stromales participent aussi bien à la formation qu'à la résorption osseuse, l'induction de leur sénescence par l'irradiation pourrait être à l'origine d'un déséquilibre de l'homéostasie osseuse et entraîner un risque accru de fractures.

Ainsi, nous avons voulu évaluer si l'IR affecte l'homéostasie osseuse en altérant la capacité des cellules stromales de la moelle osseuse à former de l'os. Nous avons

démontré que l'IR n'affecte pas la capacité de minéralisation des ostéoblastes (OB) matures, mais qu'elle empêche indirectement celle de leurs précurseurs en bloquant leur différenciation en OB. Il est donc raisonnable de croire que la formation osseuse sera amenée à décliner suivant l'irradiation lorsque de nouveaux OB, dont la durée de vie moyenne est de 30 jours, devront être formés à partir des cellules souches mésenchymateuses (MSC, en anglais, pour *mesenchymal stem cell*). Toutefois, considérant que l'IR n'induit pas la sénescence de 100% de ces cellules *in vivo*, ce processus risque de survenir longtemps après l'irradiation. En effet, les MSC intactes pourront temporairement maintenir l'intégrité du tissu osseux avant d'atteindre un stade d'épuisement cellulaire prématuré. Ainsi, l'IR semble capable d'affecter l'homéostasie osseuse en altérant la capacité des cellules stromales de la moelle osseuse à former de l'os.

Le deuxième objectif de mes études doctorales visait à déterminer si l'homéostasie osseuse peut être affectée de façon cellulaire non-autonome. Nous nous sommes d'abord concentrés sur la capacité des cellules stromales à former de l'os. En utilisant du milieu conditionné, nous avons démontré que le sécrétome des cellules stromales irradiées ne diminue pas le potentiel de minéralisation des MSC. Par ailleurs, lorsqu'elles sont transplantées de façon sous-cutanée, ces cellules forment de l'os dans les jeunes et les vieilles souris. Pour ce qui est de l'ostéoclastogénèse, elle est retardée par le sécrétome des OB irradiés. Par contre, la résorption osseuse est augmentée dans les souris âgées ou irradiées depuis huit semaines. Globalement, nos résultats montrent que les altérations environnementales dues à l'IR et au vieillissement ne diminuent pas la formation osseuse. À l'opposé, le sécrétome des OB sénescents et l'environnement

systemique ont des effets antagonistes sur les ostéoclastes, suggérant que l'effet systemique observé n'est pas dû aux OB sénescents. Ainsi, l'homéostasie osseuse peut être altérée de façon cellulaire non-autonome par l'IR et le vieillissement, mais seulement au niveau de la résorption osseuse par les ostéoclastes. La perte de formation osseuse doit être due à un effet cellulaire autonome des cellules stromales de la moelle osseuse.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iv
RÉSUMÉ	vi
ABSTRACT	viii
PRÉAMBULE	ix
TABLE DES MATIÈRES	xiii
LISTE DES FIGURES	xviii
LISTE DES TABLEAUX	xix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xx
CHAPITRE I	1
REVUE DE LA LITTÉRATURE ET MISE EN CONTEXTE	1
1.0. LA STRUCTURE OSSEUSE	2
1.1. L’architecture et la composition	2
1.2. L’ossification	3
1.2.1. L’ossification primaire	3
1.2.1.1. L’ossification intra-membranaire	4
1.2.1.2. L’ossification endochondrale	5
1.2.1.3. L’implant sous-cutané : un modèle d’ossification primaire	6
1.2.2. L’ossification secondaire	7
2.0. LE MICROENVIRONNEMENT OSSEUX	8
2.1. Les cellules souches hématopoïétiques et l’hématopoïèse	8
2.2. Le système hématopoïétique : spécialisation des HSC	12
2.2.1. La différenciation lymphoïde	15
2.2.2. La différenciation myéloïde et sa régulation	16
2.2.3. L’identification des cellules hématopoïétiques murines	18
2.3. La niche hématopoïétique	20
2.3.1. La définition	20
2.3.2. Les cellules souches mésenchymateuses	22
2.3.3. Les ostéoblastes	24
2.4. L’implication fonctionnelle du stroma	27
2.4.1. Le rôle du stroma dans la régulation de l’hématopoïèse	28

2.4.2.	Le trafic des HSC	29
2.4.3.	L'homéostasie osseuse.....	32
2.4.4.	La pathophysiologie	34
3.0.	LA SÉNESCENCE CELLULAIRE	35
3.1.	Le concept et les types de sénescence cellulaire	35
3.2.	Les inducteurs de la sénescence prématurée	37
3.2.1.	Le stress oxydatif et les espèces réactives oxygénées.....	37
3.2.2.	Les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs	39
3.2.3.	L'irradiation	40
3.3.	L'usage médical de l'irradiation	42
3.4.	Les caractéristiques des cellules sénescents.....	43
3.4.1.	La morphologie	43
3.4.2.	Le potentiel mitogénique	44
3.4.3.	Le profil sécrétoire	46
3.4.4.	Le dommage à l'ADN	47
3.4.4.1.	Les cassures double-brin de l'ADN	48
3.4.4.2.	Les cassures simple-brin de l'ADN.....	50
3.4.4.3.	Le dysfonctionnement des télomères.....	50
3.4.4.4.	La détection des foci de dommage à l'ADN associés à la sénescence	51
3.4.5.	Les modifications de la chromatine	51
3.4.6.	L'expression de suppresseurs de tumeurs	52
3.5.	Les voies d'induction de la sénescence	52
3.5.1.	Le rôle de p16	54
3.5.2.	Le rôle de p19	56
3.6.	La sénescence <i>in vivo</i>	58
3.6.1.	La mise en évidence.....	58
3.6.2.	L'élimination des cellules sénescents	59
	CHAPITRE II	62
	ARTICLES	62
4.0.	L'EXPRESSION DE INK4A/ARF INDUITE PAR L'IRRADIATION DANS DES POPULATIONS DE CELLULES STROMALES DE LA MOELLE OSSEUSE DE SOURIS INTERFÈRE AVEC L'HOMÉOSTASIE DE LA MOELLE OSSEUSE	63

4.1. Mise en contexte	63
4.2. Contribution des auteurs.....	63
4.3. Référence.....	64
4.4. Abstract	66
4.5. Introduction	67
4.6. Materials and Methods	69
4.6.1. Mice	69
4.6.2. Isolation, purification and characterization of stromal cells.....	69
4.6.3. Cell proliferation, SA- β -gal detection and BrdU incorporation	70
4.6.4. RNA isolation and Real time quantitative PCR.....	70
4.6.5. Colony-forming unit (CFU).....	71
4.6.6. Homing.....	71
4.6.7. Hematopoietic reconstitution assays	72
4.6.8. Statistical analysis	73
4.7. Results	73
4.7.1. Exposure to IR induces p16 ^{INK4a} /p19 ^{ARF} expression in distinct bone marrow stromal cell populations.....	73
4.7.2. IR-induced senescence of bone marrow stromal cells is ink4a/arf dependent	75
4.7.3. Cellularity of marrow stroma post-IR is dependent on stromal cell type and ink4a/arf status.....	76
4.7.4. Ink4a/arf expression does not interfere with homing and engraftment processes..	77
4.7.5. IR-induced damage alters lymphopoiesis in a cellular non-autonomous and ink4a/arf dependent manner.....	78
4.8. Discussion.....	79
4.9. Acknowledgements	83
4.10. Authorship	83
4.11. References	84
4.12. Figures and Legends.....	89
4.13. Supplementary Figures and Legends.....	100
5.0. UN MICROENVIRONNEMENT VIEILLISSANT/SÉNESCENT N'INTERFÈRE PAS AVEC L'OSTÉOGÉNÈSE IN VITRO ET IN VIVO, SUGGÉRANT UN DÉFAUT CELLULAIRE AUTONOME.....	107
5.1. Mise en contexte	107

5.2. Contribution des auteurs.....	107
5.3. Référence.....	108
5.4. Abstract	110
5.5. Introduction	111
5.6. Materials and Methods	112
5.6.1. Mice	112
5.6.2. Isolation, purification and characterization of stromal cells.....	113
5.6.3. Conditioned media collection	113
5.6.4. Osteogenesis.....	113
5.6.5. Osteoclastogenesis	114
5.6.6. RNA isolation and Real time quantitative PCR.....	114
5.6.7. ELISA.....	115
5.6.8. Heterotopic bone model.....	115
5.6.9. Statistical analysis	116
5.7. Results	116
5.7.1. The secretome of senescent stromal cells does not diminish mineralization potential of bone progenitors.	116
5.7.2. The secretome of senescent osteoblastic stromal cells delays osteoclastogenesis... ..	117
5.7.3. Mineralization from BM-SC is not diminished in aged mice.....	118
5.8. Discussion.....	119
5.9. Acknowledgements	121
5.10. Authorship	122
5.11. References	123
5.12. Figures and Legends	124
CHAPITRE III	131
6.0. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	132
6.1. Discussion générale.....	132
6.2. Les modèles de sénescence	133
6.2.1. L'irradiation corporelle totale	133
6.2.2. Le vieillissement	134
6.3. L'altération du nichage : pistes mécanistiques	135
6.3.1. La migration	137

6.3.2. L'adhésion	140
6.3.3. La mobilisation	144
6.4. Stratégies pour favoriser le nichage	147
6.5. Le modèle d'ossification primaire.....	149
7.0. CONCLUSION.....	151
RÉFÉRENCES	152
CHAPITRE IV.....	xxii
ANNEXE	xxii
8.0. ARTICLE 3.....	xxiii
A soluble G-CSF decoy receptor as a novel tool to increase hematopoietic cell homing and reconstitution in mice	xxiii

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: L'OSTÉON : STRUCTURE FONCTIONNELLE FONDAMENTALE DE L'OS CORTICAL	5
FIGURE 2: SITES DE L'HÉMATOPOÏÈSE SELON LE STADE DE DÉVELOPPEMENT DE L'ORGANISME.....	9
FIGURE 3: DIVISION ASYMÉTRIQUE DES CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES	11
FIGURE 4: VOIES DE DIFFÉRENTIATION HÉMATOPOÏÉTIQUE	14
FIGURE 5: FACTEURS IMPLIQUÉS DANS L'OSTÉOCLASTOGÉNÈSE	17
FIGURE 6: LE CONCEPT DE NICHE VASCULAIRE ET ENDOSTÉALE.....	22
FIGURE 7: VOIES DE DIFFÉRENTIATION DES BM-SC.....	26
FIGURE 8: INTERACTIONS CELLULAIRES DANS LA NICHE HÉMATOPOÏÉTIQUE	31
FIGURE 9: SÉNESCENCE RÉPLICATIVE ET PRÉMATURÉE.....	36
FIGURE 10: PHÉNOTYPE DES CELLULES SÉNESCENTES.....	44
FIGURE 11: RÉGULATION DU CYCLE CELLULAIRE	46
FIGURE 12: SCHÉMA DE LA VOIE ATM DE LA RÉPONSE AU DOMMAGE À L'ADN	49
FIGURE 13: REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU LOCUS INK4B-ARF-INK4A	54
FIGURE 14: VOIES DE P16INK4A ET P19ARF DANS LA SÉNESCENCE	56
FIGURE 15: ÉTAPES DU NICHAGE HÉMATOPOÏÉTIQUE	136
FIGURE 16: RÉDUCTION DU POUVOIR CHEMOATTRACTANT DES CELLULES STROMALES SÉNESCENTES.....	138
FIGURE 17: RÉDUCTION DE LA CAPACITÉ DE RÉTENTION DES CELLULES HÉMATOPOÏÉTIQUES PAR LES CELLULES STROMALES SÉNESCENTES.....	142
FIGURE 18: ACCUMULATION DE G-CSF DANS LE PLASMA DE SOURIS IRRADIÉES : POSSIBILITÉ D'UNE PRODUCTION PAR LES CELLULES STROMALES SÉNESCENTES	145
FIGURE 19: ACCUMULATION DE CELLULES MYÉLOÏDES DANS LE SANG PÉRIPHÉRIQUE DE SOURIS IRRADIÉES DEPUIS PLUS DE 12 SEMAINES	147

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1: TYPES DE SÉNESCENCE ET CARACTÉRISTIQUES	37
TABLEAU 2: MÉDIATEURS IMPLIQUÉS DANS LA SÉNESCENCE CELLULAIRE.....	57

LISTE DES ABRÉVIATIONS

53BP1 : protéine 1 de liaison à p53

A

ADN : acide désoxyribonucléique

ALP : phosphatase alcaline

ARNm : acide ribonucléique messager

ATM : protéine mutée dans le syndrome d'ataxie télangiectasie

ATR : protéine liée à ATM et Rad3

B

BM-SC : cellules stromales dérivées de la moelle osseuse

BMT : transplantation de moelle osseuse

BSP : sialoprotéine osseuse

C

CDK : kinase cycline-dépendante

CDKi : inhibiteur des kinases cyclines-dépendantes

CDKN2a : inhibiteur 2a des kinases cyclines-dépendantes

CDKN2b : inhibiteur 2b des kinases cyclines-dépendantes

C/EBP α : protéine de liaison alpha activatrice du motif CCAAT

CFU-F : capacité à former des colonies fibroblastiques

c-Kit : récepteur du facteur des cellules souches

CLP : progéniteur lymphoïde commun

CMP: progéniteur myéloïde commun

D

DAPI : 4'-6'-diamidino-2-phényindole

DDR : machinerie de la réponse au dommage à l'ADN

Dlx5 : *distal-less homeobox 5*

F

Fc ϵ RI α : récepteur 1 alpha Fc epsilon

G

γ -H2AX : variant X de l'histone H2A phosphorylée

G-CSF : facteur stimulant la formation de colonies de granulocytes

GLB1 : galactosidase, bêta 1

Gy : grays

H

HA/TCP : hydroxyapatite/tricalcium phosphate

HPC : cellules progénitrices hématopoïétiques

HSC : cellules souches hématopoïétiques

I

IGF-1 : facteur de croissance insulino-mimétique 1

IL : interleukine

IL7R : récepteur de l'IL-7

Iv : intraveineuse

IR : irradiation

K

KSL : cellules c-kit⁺, Sca-1⁺, lineage⁻

L

Lin⁻ : absence des marqueurs de différenciation des cellules sanguines matures

LT-HSC : HSC avec un potentiel de renouvellement à long terme

M

M-CSF : facteur stimulant la formation de colonies de macrophages

MCP-1 : protéine 1 chimiotactique des monocytes

Mdm2: *mouse double minute 2*

MMP : métalloprotéinases

MPP : cellules progénitrices multipotentes

MRN : complexe Mre11-Rad50-Nbs1

MSC : *mesenchymal stem cells* ou *mesenchymal stromal cells* ou *marrow stromal cells* ou *multipotent stromal cells*

Msx2 : homologue 2 de l'homéoboîte msh

N

NAC : N-acétyl-L-cystéine

N-cad : N-cadhérine

O

OB : ostéoblastes

OB-SC : cellules stromales ostéoblastiques dérivées de l'os

OC : ostéoclastes

OCN : ostéocalcine

OIS : sénescence induite par un oncogène

OPG : ostéoprotégérine

OPN : ostéopontine

P

PPAR γ : récepteur gamma activé par les proliférateurs des peroxisomes

pRb : protéine rétinoblastome

Q

qPCR : réaction de polymérase en chaîne quantitative

R

R : récepteur

Rad : dose de radiation absorbée

RANK : récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B

RANKL : ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B

ROS : espèces réactives oxygénées

Runx2 : facteur de transcription 2 lié à runt

S

SA- β -gal : bêta-galactosidase associée à la sénescence

SAHF : foci d'hétérochromatine associés à la sénescence

SASP : phénotype sécrétoire associé à la sénescence

Sca-1 : antigène 1 des cellules souches

SCF : facteur des cellules souches

SDF : foci de dommage à l'ADN associés à la sénescence

SDF-1 α : facteur 1alpha dérivé des cellules stromales ou CXCL12

SEM : écart standard à la moyenne

SLAM : molécules de signalisation d'activation lymphocytaire

ST-HSC : HSC avec un potentiel de renouvellement à court terme

T

TBI : irradiation corporelle totale

Terc^{-/-} : souris déficientes pour la télomérase

TIF: foci de dommage à l'ADN induits par un dysfonctionnement des télomères

TGF- β : *transforming growth factor β*

TRAP : phosphatase alcaline résistante au tartrate

V

VCAM-1 : molécule 1 d'adhésion cellulaire vasculaire ou CD106

W

Wnt : *Wingless*

CHAPITRE I

REVUE DE LA LITTÉRATURE ET MISE EN CONTEXTE

1.0. LA STRUCTURE OSSEUSE

1.1. L'architecture et la composition

Le corps humain adulte est constitué de 206 os. Selon leur architecture, ils peuvent être classés en cinq catégories, soit les os plats, longs, courts, sésamoïdes et irréguliers. Néanmoins, tous les os sont formés de deux structures, soit l'os cortical et l'os trabéculaire. L'os cortical est une structure compacte qui constitue la portion externe de l'os et dont la porosité est évaluée à 5-30%. L'os trabéculaire, aussi appelé os spongieux en raison de son apparence (porosité de 30-90%), forme quant à lui la portion interne de l'os. Globalement, l'os cortical représente 80% de la masse osseuse totale chez l'adulte. Malgré une surface dix fois supérieure à celle de l'os cortical, l'os trabéculaire ne représente que les 20% restants ¹. Finalement, la cavité intérieure des os est occupée par la moelle osseuse : le siège de l'hématopoïèse (Voir la section 2.1 pour une description détaillée).

Le tissu osseux est principalement composé de calcium et de phosphate sous la forme de cristaux d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ² et de collagène de type I. Ce sont deux composantes confèrent respectivement aux os rigidité et flexibilité. On retrouve aussi, de manière non-exhaustive, l'ostéocalcine (OCN), l'ostéopontine (OPN) la sialoprotéine osseuse (Bsp, en anglais, pour *bone sialoprotein*), le facteur de croissance insulino-mimétique 1 (IGF-1, en anglais, pour *insulin growth factor 1*), le facteur de croissance fibroblastique et le *transforming growth factor* β (TGF- β) ^{3,4}.

On retrouve 3 types de cellules dans le tissu osseux : les ostéocytes, les ostéoblastes (OB) et les ostéoclastes (OC). Toutes ces cellules communiquent entre elles par l'intermédiaire de prolongements cellulaires ⁵.

1.2. L'ossification

L'ossification est l'action de former de l'os. On parle d'ossification primaire lorsqu'il y a formation *de novo* et d'ossification secondaire lorsqu'il y a formation à partir d'un os mature. On retrouve le premier phénomène lors du développement de l'organisme et lors de la réparation de fractures. Le deuxième intervient plutôt dans le maintien de l'intégrité osseuse.

1.2.1. L'ossification primaire

L'ossification primaire peut être soit intra-membranaire soit endochondrale ⁶. L'ossification primaire intra-membranaire intervient principalement lors de la formation des os plats tels que le crâne et les clavicules. L'ossification primaire endochondrale est quant à elle associée à la formation des os longs, mais est aussi présente dans les trois autres types d'os (courts, sésamoïdes et irréguliers).

1.2.1.1. L'ossification intra-membranaire

L'ossification intra-membranaire ⁷ débute par la prolifération des MSC situées près de vaisseaux sanguins. L'accumulation suffisante de cellules pour former un nodule entraîne leur différenciation en ostéoblastes (OB) qui sont les cellules responsables de la formation osseuse (Voir section 2.2.1 et 2.2.2 pour une description des OB et de leurs précurseurs). Ces OB sécrètent alors du collagène de type I pour produire la matrice extracellulaire appelée «ostéoïde». Ce processus s'effectue de l'intérieur du nodule vers l'extérieur. Ainsi, certaines cellules sont emprisonnées dans l'ostéoïde et deviennent des ostéocytes. Les OB à la périphérie continuent de produire du collagène pour augmenter la taille de l'ostéoïde. En parallèle, ils y incorporent du calcium et du phosphate pour former du tissu osseux minéralisé. Le grossissement progressif des nodules entraîne leur fusion en trabécules et ultimement, la formation d'os «tissé» lorsque toute la surface est couverte. On l'appelle ainsi en raison de l'apparence désordonnée des fibres de collagène. L'os «tissé» a l'avantage d'être produit rapidement, mais il possède une faible résistance mécanique. C'est pourquoi il est ensuite résorbé par les ostéoclastes (OC) (Voir la section 2.1 pour une description des OC) pour être remplacé par de l'os lamellaire constitué d'une superposition de feuillets concentriques de collagène (Figure 1). Ce dernier est formé beaucoup plus lentement et est plus résistant. Il nécessite aussi une surface relativement plane sur laquelle il est synthétisé, d'où l'importance de l'os «tissé». L'apposition de l'os lamellaire mène à la formation d'une structure cylindrique d'environ 0,2 millimètres de diamètre traversée en son centre par des vaisseaux sanguins et des nerfs. Il s'agit de l'unité fonctionnelle fondamentale de l'os cortical qu'on nomme

«ostéon»⁸. Les ostéons sont formés dans le sens longitudinal des os et confèrent à l'os sa résistance à la torsion.

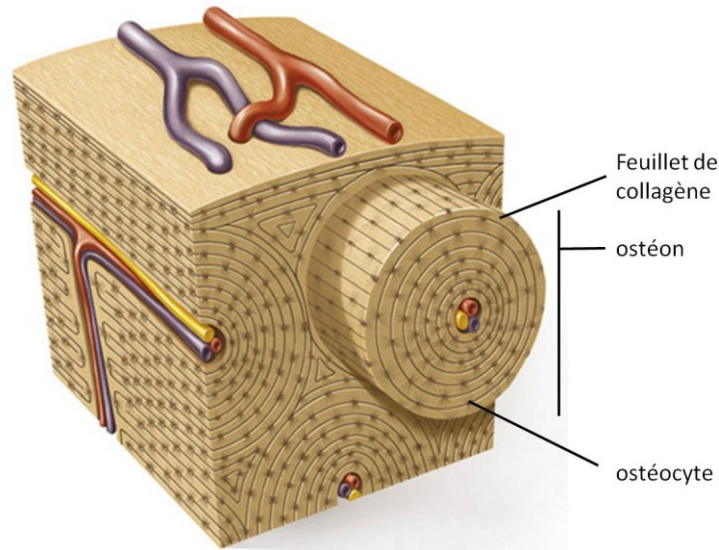


Figure 1: L'ostéon : structure fonctionnelle fondamentale de l'os cortical

L'ostéon est une structure cylindrique d'environ 0,2 millimètres de diamètre formée dans le sens longitudinal de l'os. Il résulte de l'apposition de l'os lamellaire qui est constitué d'une superposition de feuillets concentriques de collagène autour de vaisseaux sanguins et de nerfs.

Adapté de © Nowa Era.

1.2.1.2. L'ossification endochondrale

L'ossification endochondrale⁹ débute par l'agglutination de MSC qui se différencient ensuite en chondrocytes. Ces derniers sécrètent du collagène de type I pour produire la matrice extracellulaire, ce qui forme un cartilage hyalin respectant la forme de

l'os qui sera formé. Celui-ci grossit au fur et à mesure que les chondrocytes prolifèrent et produisent plus de matrice. À ce stade, ils deviennent hypertrophiés, cessent de produire du collagène et sécrètent la phosphatase alcaline (ALP, en anglais, pour *alkaline phosphatase*) favorisant la minéralisation du cartilage. Enfin, les chondrocytes hypertrophiés sécrètent le facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires avant d'entrer en apoptose. Les cavités ainsi créées sont envahies par des vaisseaux sanguins qui acheminent des cellules hématopoïétiques et des MSC à l'intérieur de l'os. Il s'ensuit un processus impliquant les OB et les OC qui mène à la formation de la cavité médullaire qui deviendra le siège de l'hématopoïèse. Finalement, le processus d'ossification endochondrale est répété dans les deux extrémités de l'os et mène à la formation d'os trabéculaire. Le cartilage qui persiste entre les différents foyers d'ossification de l'os est nommé «plaque épiphysaire». Durant le développement de l'organisme, elle continue à proliférer et à être remplacée par de l'os pour permettre la croissance des os longs.

1.2.1.3. L'implant sous-cutané : un modèle d'ossification primaire

Différents modèles d'ossification hétérotopique (aussi appelée «ectopique») ont été proposés pour permettre l'étude des mécanismes impliqués dans l'ossification primaire. Un des premiers modèles développés consiste en l'implantation intrapéritonéale d'une chambre de diffusion contenant de la moelle osseuse. Alors que la population hématopoïétique résidente décline; la fraction stromale contenue dans la

moelle osseuse prolifère, se différencie et forme de l'os dont la structure est typique du tissu osseux ¹⁰. Par contre, même après la formation osseuse, ce modèle ne permet pas le développement de l'hématopoïèse. Un autre modèle consiste à injecter des MSC obtenues par expansion *in vitro* dans l'espace sous la capsule rénale. Elles forment alors un os dont l'histologie et l'architecture sont identiques à celles d'un os natif. Par ailleurs, alors que le tissu osseux, les cellules stromales et les adipocytes proviennent des cellules transplantées, l'os est colonisé par les cellules hématopoïétiques de l'hôte ¹¹. Cette procédure demande toutefois un haut niveau d'habileté technique et n'est pas sans douleur pour l'animal. Enfin, le modèle le plus prisé de nos jours, du fait qu'il remédie aux lacunes du modèle précédent, est l'injection sous-cutanée d'un implant contenant les cellules stromales. La composition de cet implant varie grandement d'une équipe à l'autre : certains utilisent seulement du collagène de type I, d'autres y ajoutent des particules d'hydroxyapatite pour fournir un support aux cellules stromales, d'autres ont recours à des *scaffolds* solides en trois dimensions pour permettre une adhérence optimale des cellules et finalement, certains vont même jusqu'à ajouter des cellules endothéliales pour stimuler l'angiogénèse ¹²⁻¹⁴.

1.2.2. L'ossification secondaire

L'ossification secondaire fait référence au remodelage osseux présent dans les os matures. Elle fait intervenir l'action concertée des OB et des OC. On parle ainsi d'homéostasie osseuse, c'est-à-dire l'équilibre entre la formation et la résorption osseuse. Le remodelage osseux est nécessaire pour le maintien des fonctions mécaniques et

biologiques de l'os. Au niveau mécanique, les os protègent les organes internes et participent au maintien de la structure du corps ¹⁵. Le remodelage osseux est donc nécessaire pour réparer les microfissures produites quotidiennement et pour façonner le squelette durant la phase de croissance ou en réponse à des contraintes mécaniques. Au niveau biologique, les os servent entre autres de réserve pour certains minéraux et facteurs de croissance ⁹. L'action des OB et des OC permet donc de répondre aux besoins de l'organisme en séquestrant ou en libérant ces différentes molécules.

2.0. LE MICROENVIRONNEMENT OSSEUX

2.1. Les cellules souches hématopoïétiques et l'hématopoïèse

Le système hématopoïétique est constitué par l'ensemble des cellules sanguines et de leurs précurseurs. La formation de nouvelles cellules sanguines est un processus physiologique nommé «hématopoïèse». Il survient dans différents organes selon le stade de développement de l'organisme. D'abord dans le sac vitellin chez l'embryon, elle est relocalisée à la région mésodermique *aorta-gonad-mesonephros*, puis au foie fœtal et enfin à la moelle osseuse lorsque celle-ci est formée (Figure 2) ¹⁶. Certaines cellules subissent ensuite une maturation et une activation dans les organes secondaires (rate, thymus et ganglions lymphatiques). L'hématopoïèse normale est un processus qui assure l'équilibre entre l'auto-renouvellement des cellules et leur différenciation.

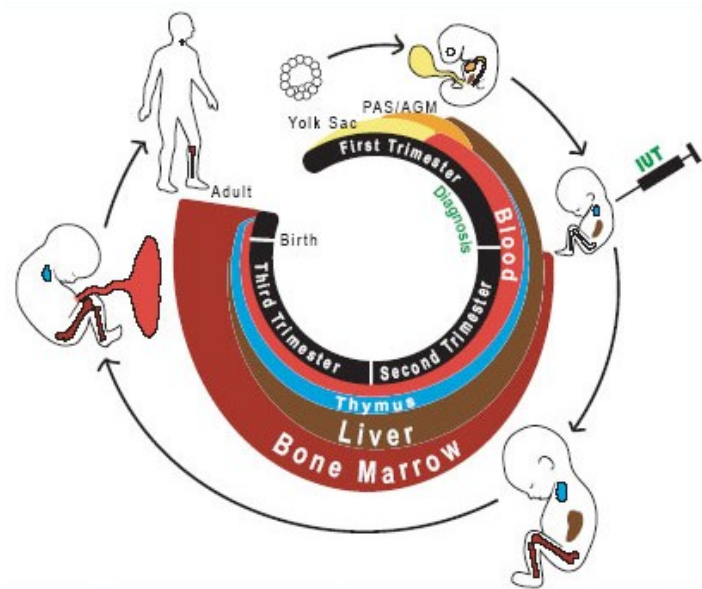
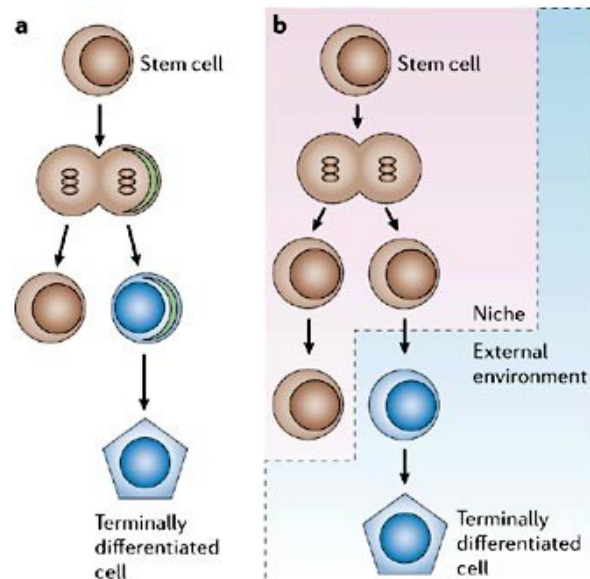


Figure 2: Sites de l'hématopoïèse selon le stade de développement de l'organisme

L'hématopoïèse survient d'abord dans le sac vitellin (*yolk sac*), puis dans la région mésodermique *aorta-gonad-mesonephros* (AGM) chez l'embryon. Elle est ensuite relocalisée au foie et enfin, à la moelle osseuse lorsque celle-ci est formée chez le fœtus. La moelle osseuse demeure le site de l'hématopoïèse chez l'adulte. Tiré avec permission de Muench et Barcena ¹⁷.

L'hématopoïèse est assurée par les cellules souches hématopoïétiques (HSC, en anglais, pour *hematopoietic stem cells*) qui sont des cellules multipotentes très rares étant donné leur fréquence d'environ 1 sur 10 000 dans la moelle osseuse de la souris ¹⁸. Elles génèrent en moyenne $2,4 \times 10^8$ nouvelles cellules chaque jour, une tâche rendue possible grâce à leur capacité d'auto-renouvellement ¹⁹. Cette dernière consiste en une division cellulaire asymétrique qui donne naissance à deux cellules-filles, dont l'une est identique à la HSC initiale et l'autre est destinée à se différencier. Sans cette capacité particulière, toutes les cellules proliféreraient jusqu'à donner des cellules matures et il y aurait vite épuisement de cellules immatures pour perpétuer le processus. Cette aptitude qui caractérise toute cellule souche permet donc de maintenir une population de cellules non différenciées apte à produire des cellules sanguines pour toute la durée de vie de l'organisme.

La division cellulaire asymétrique peut être intrinsèque ou extrinsèque (Figure 3). Dans le premier cas, le devenir des deux cellules est contrôlé par un transfert inégal du matériel génétique de la cellule mère, favorisant la prolifération d'une d'entre elles. Dans le deuxième, la division génère deux cellules-filles au potentiel développemental identique (deux HSC), mais l'une d'elles est influencée par des signaux extérieurs qui induisent sa différenciation ²⁰. Au besoin, les HSC peuvent aussi subir une division symétrique résultant en deux cellules souches ou deux cellules différenciées. Par exemple, en cas d'hémorragie, les HSC favoriseront la production de deux cellules différenciées pour reconstituer le système plus efficacement. Cela aura pour conséquence de diminuer le nombre de HSC. On assistera alors à une série de divisions symétriques donnant deux HSC pour restaurer cette population.



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

Figure 3: Division asymétrique des cellules souches hématopoïétiques

La division asymétrique donne naissance à une cellule souche hématopoïétique identique à la cellule-mère et à une autre cellule destinée à se différencier en cellule hématopoïétique mature. (a) Division asymétrique intrinsèque due au transfert asymétrique du matériel génétique de la cellule souche hématopoïétique. (b) Division asymétrique extrinsèque due aux signaux extérieurs menant à la différenciation d'une des cellules-filles. Tiré avec permission de Wilson et Trumpp²¹.

2.2. Le système hématopoïétique : spécialisation des HSC

Le système hématopoïétique est constitué de deux classes de cellules. Le terme «lymphoïde» fait référence à la lymphe et à sa principale composante cellulaire, les lymphocytes. Par exclusion, les cellules non-lymphoïdes sont regroupées sous le terme «myéloïde» qui fait référence à leur origine dans la moelle osseuse. On a d'abord supposé que les HSC constituaient une population homogène et donc, que chaque HSC avait le même potentiel de se différencier dans ces deux lignées. Cependant, les travaux de Müller-Sieburg ont modifié cette vision en démontrant que certaines populations de HSC ont des patrons de repopulation distincts et prédéterminés de façon épigénétique²². Cela a permis d'identifier 3 sous-types de HSC selon qu'elles sont biaisées envers la lignée lymphoïde, la lignée myéloïde ou qu'elles n'ont pas de biais. Cette dernière catégorie, qui sert de point de référence, est considérée «balancée» et correspond au ratio myéloïde/lymphoïde retrouvé dans le sang de souris saines. Chez la souris C57BL/6, il est d'environ 1:5. Leurs travaux ont également démontré que les HSC biaisées pour la lignée myéloïde ont une capacité d'auto-renouvellement supérieure à celles biaisées pour la lignée lymphoïde, une caractéristique qui pourrait bien expliquer la proportion accrue de cellules myéloïdes observée durant le vieillissement²³⁻²⁵

Parmi les cellules capables de générer ces deux lignées, on retrouve trois populations distinctes selon l'intervalle de temps pendant lequel elles peuvent reconstituer l'organisme (Figure 4). Il s'agit des HSC ayant un effet à long terme (LT-HSC, en anglais, pour *long-term HSC*), des HSC ayant un effet à court terme (ST-HSC, en anglais, pour *short-term HSC*) et des cellules progénitrices hématopoïétiques (HPC, en

anglais, pour *hematopoietic progenitor cells*) qui agissent à très court terme ²⁶. Concrètement, les HSC ont la capacité de reconstituer les lignées lymphoïde et myéloïde dans le sang périphérique à des niveaux détectables établis arbitrairement à 1% et ce, 16 semaines après la transplantation ²⁷. Les ST-HSC maintiennent leur effet pendant quelques semaines seulement alors que les LT-HSC le maintiennent pendant plusieurs mois ²⁸. Cela serait dû à l'état prolifératif soutenu des ST-HSC, par opposition à la prolifération sporadique des LT-HSC ²⁹. Enfin, les HPC n'ayant pas de capacité d'auto-renouvellement, elles repopulent le système pendant les premières semaines, mais jamais au-delà de 16 semaines.

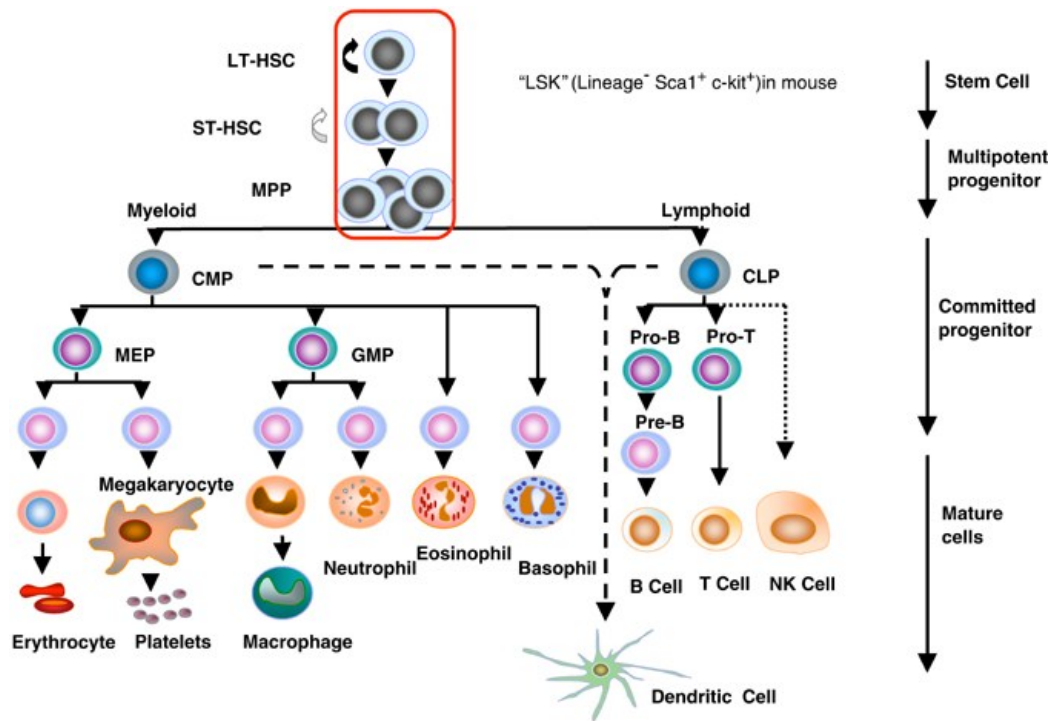


Figure 4: Voies de différenciation hématopoïétique

Arborisation des voies de différenciation des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. LT-HSC, HSC avec un potentiel de renouvellement à long terme; ST-HSC, HSC avec un potentiel de renouvellement à court terme; MPP, cellule progénitrice multipotente aussi appelée cellule progénitrice hématopoïétique; CMP, progéniteur myéloïde commun; CLP, progéniteur lymphoïde commun; MEP, progéniteur mégacaryocytaire et érythrocytaire; GMP, progéniteur granulocytaire et macrophagien. Tiré avec permission de Larsson et collègues³⁰.

C'est au stade de HPC qu'on constate une arborisation de l'hématopoïèse. En effet, ces derniers peuvent se différencier en cellules progénitrices communes à la lignée lymphoïde (CLP, en anglais, pour *common lymphoid progenitor*) ou en cellules progénitrices communes à la lignée myéloïde (CMP, en anglais, pour *common myeloid progenitor*). De façon générale, la lignée lymphoïde participe à la réponse immunitaire adaptative alors que la lignée myéloïde participe à la réponse immunitaire innée.

2.2.1. La différenciation lymphoïde

Les CLP génèrent les cellules matures suivantes : les lymphocytes B et T (via une série d'intermédiaires immatures), les cellules dendritiques plasmacitoïdes et les cellules *natural killers*. En contrepartie, les cellules matures engendrées par les CMP sont les érythrocytes, les mégacaryocytes, les monocytes, les macrophages, les cellules granulocytaires (neutrophiles, éosinophiles et basophiles) et les cellules dendritiques myéloïdes. La production de ces cellules matures implique la perte progressive de potentialité des progéniteurs. Les CMP évoluent en progéniteurs bipotents pour les mégacaryocytes et les érythrocytes ou pour les granulocytes et les macrophages avant de se différencier davantage en progéniteurs unipotents et enfin, en cellules matures. La maturation des éosinophiles, des basophiles et des cellules dendritiques myéloïdes fait exception en n'impliquant pas d'intermédiaire bipotent³⁰.

2.2.2. La différenciation myéloïde et sa régulation

Les monocytes et les macrophages de la lignée myéloïde peuvent subir une étape de maturation supplémentaire. En effet, ils peuvent fusionner et former des ostéoclastes (OC). Ces cellules multinucléées ont été identifiées en 1873 par Kölliker, mais ce n'est qu'au milieu des années 1980 que leur origine myéloïde a été rapportée³¹. Elles sont caractérisées par leur grande taille et une forte expression de la phosphatase alcaline résistante au tartrate (TRAP, en anglais, pour *tartrate resistant acid phosphatase*) et de la cathepsine K, deux enzymes responsables de leur activité de résorption osseuse.

L'ostéoclastogénèse fait intervenir quatre protéines (Figure 5). D'abord, le facteur stimulant la formation de colonies de macrophages (M-CSF, en anglais, pour *macrophage colony-stimulating factor*) se lie au récepteur tyrosine kinase M-CSFR au niveau des précurseurs ostéoclastiques pour induire leur prolifération. Un second signal est ensuite nécessaire pour permettre la différenciation et la fusion en OC : trois membres de la famille du facteur de nécrose tumorale et de ses récepteurs interviennent alors, soit le récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B (RANK), le ligand du RANK (RANKL) et l'ostéoprotégérine (OPG). Le RANKL se lie au RANK situé sur les précurseurs ostéoclastiques pour induire leur fusion^{32,33} tandis que l'OPG est un récepteur inhibiteur soluble qui se lie au RANKL pour empêcher son interaction avec RANK et ainsi bloquer l'ostéoclastogénèse.

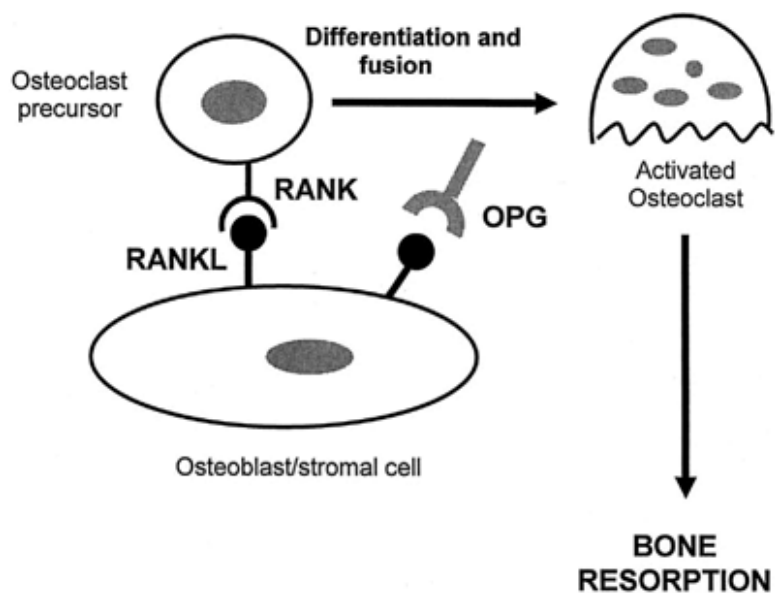


Figure 5: Facteurs impliqués dans l'ostéoclastogénèse

La liaison du RANKL (ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B) au RANK (récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B) situé sur les précurseurs ostéoclastiques est nécessaire pour induire leur fusion. L'ostéoclastogénèse peut être bloquée par la liaison du récepteur inhibiteur soluble OPG (ostéoprotégérine) au RANKL pour empêcher son interaction avec RANK. Le M-CSF (facteur stimulant la formation de colonies de macrophages, non identifié sur le schéma) est requis tout au long du processus pour la prolifération, la différenciation et la fusion des précurseurs ostéoclastiques. Tiré avec permission de Coetzee et collègues

2.2.3. L'identification des cellules hématopoïétiques murines

Il est possible d'identifier les différents types de cellules hématopoïétiques murines en se basant sur l'expression spécifique de certaines protéines membranaires. Par exemple, on peut identifier une population enrichie en HSC à l'aide d'une combinaison de marquages positifs et négatifs. Étant donné la rareté des HSC, la première étape consiste à éliminer les cellules exprimant des marqueurs associés à l'état de différenciation des cellules sanguines matures comme CD3, CD4, CD8 (lymphocytes T), B220 (lymphocytes B), CD11b, Gr-1, Ter119 (cellules myéloïdes). La population ainsi obtenue est identifiée *lineage^{neg}* (aussi Lin^- ou L) en référence à l'absence de différenciation ²⁷. Parmi celle-ci, les cellules positives pour le récepteur du facteur des cellules souches (SCF, en anglais, pour *stem cell factor*), c-Kit (aussi CD117 ou K), et pour l'antigène 1 des cellules souches (Sca-1 ou S, en anglais, pour *stem cell antigen 1*) sont fortement enrichies en HSC. Globalement, cette combinaison est identifiée $\text{K}^+\text{S}^+\text{L}^-$ ou plus simplement, KSL. Plusieurs marquages complémentaires ont été proposés pour raffiner les critères d'identification des HSC. Toutefois, c'est la découverte de deux membres de la famille des molécules de signalisation d'activation lymphocytaire (SLAM, en anglais, pour *signaling lymphocytic activation molecule*), soit CD150 (*SLAMF1*) ³⁵ et CD48 (*SLAMF2*) ¹⁹, qui a été l'avancée la plus significative. En effet, l'expression membranaire de CD150 sur les HSC est moins affectée par l'âge et le fond génétique de la souris que la majorité des molécules proposées et permet leur identification à l'aide d'un nombre restreint de molécules ²⁷. Un marquage Lin^- , Sca-1^+ , c-Kit^+ , CD150^+ , CD48^- permet ainsi de circonscrire les HSC.

Lorsqu'elles se différencient en HPC, les HSC perdent l'expression du CD150, pour acquérir un phénotype Lin^- , Sca-1^+ , c-Kit^+ , CD150^- , CD48^- ²⁶. Lorsque les HPC se différencient à leur tour en CLP, on observe une diminution de Sca-1 et de c-Kit et l'expression du récepteur de l'IL-7 (IL-7R) ¹⁸. Ainsi, les CLP se caractérisent par les marqueurs de surface Lin^- , $\text{Sca-1}^{\text{dim}}$, $\text{c-Kit}^{\text{dim}}$, IL7R^+ , où «dim» signifie une expression faible de la molécule d'intérêt. Enfin, les CMP conservent l'expression de c-Kit, mais perdent complètement l'expression de Sca-1 et acquièrent celle du récepteur 1 alpha Fc epsilon (FcεRIα).

Une fois engagées dans la voie de différenciation en lymphocyte B, les cellules acquièrent et conservent l'expression de la protéine tyrosine phosphatase C de type récepteur (aussi CD45R). On la retrouve sous une forme hautement glycosylée sur les lymphocytes B, d'où l'appellation B220 en raison de son poids moléculaire ³⁶. La forme B220 est aussi présente à la surface des cellules T activées, de rares cellules dendritiques et de quelques autres cellules présentatrices d'antigènes, mais ces populations représentent une fraction négligeable. Le B220 semble donc un marqueur intéressant pour étudier l'engagement lymphocytaire B.

Une fois engagées dans la voie de différenciation en lymphocyte T, les cellules expriment le CD3, un co-récepteur faisant partie de la superfamille des immunoglobulines. Ce dernier participe à la formation du complexe du récepteur des cellules T nécessaire à leur activation. En outre, il est exclusivement retrouvé sur les lymphocytes T, à l'exception d'une sous-population de cellules de Purkinje. Ainsi, le CD3 permet d'étudier l'engagement lymphocytaire T dans son intégralité.

Les cellules de la lignée myéloïde sont caractérisées par la présence de l'intégrine hétérodimérique $\alpha_M\beta_2$ à la membrane cytoplasmique. La sous-unité α_M , aussi appelée CD11b, est responsable de l'adhésion leucocytaire lors de la réponse inflammatoire³⁷. De part sa large distribution, le CD11b est un marqueur intéressant pour étudier l'engagement myéloïde. Il n'est toutefois pas exclusif puisqu'il est aussi exprimé par les cellules *natural killer*³⁷.

2.3. La niche hématopoïétique

2.3.1. La définition

Le concept de niche hématopoïétique a été décrit pour la première fois en 1978 par Schofield comme étant une région à l'intérieur de la moelle osseuse contenant des types cellulaires capables de maintenir le potentiel d'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques et ce, tout au long de la vie de l'organisme³⁸. Selon la définition initiale, il s'agissait ni plus ni moins que d'un compartiment capable de supporter physiquement les HSC. Depuis, le concept de niche a évolué tant au niveau de la caractérisation des cellules et structures qui la composent que des interactions qui la régissent. En effet, la niche hématopoïétique est en mesure de moduler l'activité des HSC par contact direct ou par la sécrétion de divers facteurs et cytokines. Les dernières années ont également vu l'apparition des concepts de niche endostéale et vasculaire, deux compartiments distincts à l'intérieur de la moelle osseuse (Figure 6). La niche endostéale, parfois nommée niche ostéoblastique, est composée d'OB en étroit contact avec l'os³⁵. Plusieurs études ont démontré plus spécifiquement que les OB fusiformes exprimant la

protéine d'adhésion N-cadhérine y interagissent avec les LT-HSC³⁹⁻⁴¹. La niche vasculaire est quant à elle située dans la moelle osseuse, près des vaisseaux sanguins dont l'endothélium sinusoidal sert de support aux ST-HSC et aux HPC actives¹⁵. Suivant un dommage ou un stress, les LT-HSC peuvent également s'y retrouver pour participer à la reconstitution du système hématopoïétique⁴². Ces différentes observations corroborent l'hypothèse selon laquelle la niche endostéale fournirait un microenvironnement quiescent aux HSC alors que la niche vasculaire favoriserait leur prolifération et leur différenciation¹⁵. Dans une niche comme dans l'autre, plusieurs autres types de cellules participent à la régulation de l'activité des HSC. On retrouve différentes cellules stromales (MSC, adipocytes, cellules réticulaires exprimant abondamment CXCL12), mais aussi des cellules hématopoïétiques matures (mégacaryocytes, macrophages, ostéoclastes)³⁵. Outre leur constitution cellulaire, ces deux niches divergent également au niveau de leur oxygénation. En effet, de par sa proximité des vaisseaux, la niche vasculaire est plus oxygénée¹⁵. À l'inverse, la niche endostéale est hypoxique⁴³; une caractéristique qui a été associée avec le maintien de la quiescence et du potentiel d'auto-renouvellement des HSC^{28,44}.

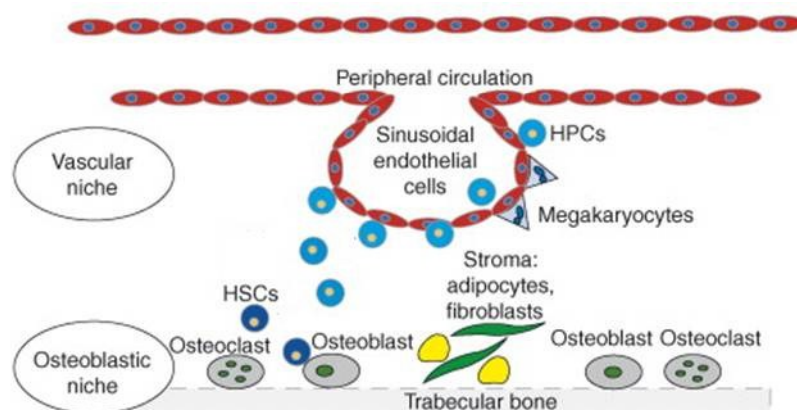


Figure 6: Le concept de niche vasculaire et endostéale

La niche endostéale, ou niche ostéoblastique, est située près de l'os tandis que la niche vasculaire est en contact avec les vaisseaux sanguins dans la moelle osseuse. HSCs, cellules souches hématopoïétiques; HPCs, cellules progénitrices hématopoïétiques Adapté de Kaplan et collègues ⁴⁵.

2.3.2. Les cellules souches mésenchymateuses

Dans les années 1960, McCulloch et Till ont démontré la présence de cellules stromales ayant un potentiel d'expansion clonale à l'intérieur de la moelle osseuse de souris ^{46,47}. Friedenstein et collègues ont ensuite développé une méthode *ex vivo* pour étudier ces cellules en se basant sur leur capacité à adhérer rapidement au plastique des pétris de culture et à former des colonies fibroblastiques (CFU-F, en anglais, pour *colony-forming units-fibroblast*) ^{48,49}. Des cellules stromales aux propriétés similaires ont aussi été isolées à partir du foie, du tissu adipeux, du sang de cordon ombilical, du muscle, etc.

^{50,51}. Suite à une stimulation avec des milieux de culture spécifiques, elles ont démontré une capacité de différenciation *in vitro* en plusieurs types cellulaires tels que les OB, les adipocytes, les chondrocytes, les cellules musculaires lisses et les cellules neuronales ^{52,53}. *In vivo*, elles peuvent être recrutées aux sites de lésions tissulaires pour aider à la réparation. Elles y servent de support et sécrètent des facteurs de croissance et des cytokines qui favorisent la prolifération et la survie des cellules spécialisées des tissus et organes endommagés ⁵⁴⁻⁵⁶. Elles semblent aussi être capables de restaurer l'intégrité du tissu lésé en fusionnant/transdifférenciant en cellules spécialisées ⁵⁷.

Ainsi, en se basant sur leur capacité d'auto-renouvellement (potentiel CFU-F) et leur aptitude à se différencier en plusieurs types cellulaires (multipotence), ces cellules stromales ont été nommées «cellules souches mésenchymateuses». Toutefois, cette population s'avère être hétérogène. En effet, en transplantant individuellement les cellules ayant formé des CFU-F, le groupe de Robey a démontré que seulement 60% avaient la capacité de former de l'os ⁵⁸. Ces résultats suggèrent que seule une fraction des MSC possède réellement les propriétés des cellules souches. Bien que l'acronyme MSC soit utilisé par l'ensemble des gens travaillant dans le domaine, sa définition initiale ne fait pas l'unanimité. On lui préfère «*mesenchymal stromal cells*», «*marrow stromal cells*» ou «*multipotent stromal cells*». Dans le cadre de cette thèse, le terme BM-SC (en anglais, pour *bone marrow-derived stromal cells*) est préconisé pour faire référence aux cellules stromales dérivées de la moelle osseuse.

Les BM-SC constituent une population hétérogène qu'il est possible d'isoler directement de la moelle osseuse grâce à leur capacité à adhérer au plastique. Il existe

toutefois des BM-SC qui ne présentent pas cette aptitude ⁵⁹. Au niveau phénotypique, leur analyse par cytométrie en flux n'a pas permis de mettre en évidence un marqueur unique, mais plutôt une combinaison de molécules de surface permettant leur identification. Elles sont entre autres positives pour CD44, CD73, CD90, CD105 et CD106 et négatives pour des marqueurs associés aux cellules endothéliales (CD31, CD133) et hématopoïétiques (CD14, CD34, CD45, Ter119) ⁶⁰. Récemment, de nouveaux marqueurs permettant d'identifier une population de BM-SC davantage enrichie en cellules souches ont été identifiés. Il a ainsi été déterminé que l'ajout d'une des quatre molécules suivantes à la combinaison déjà établie augmente la proportion de cellules ayant un fort potentiel CFU-F dans la population isolée. Il s'agit de la protéine filamentaire nestine ⁶¹, de la protéine STRO-1 ^{62,63}, du récepteur alpha du facteur de croissance dérivé des plaquettes ⁶⁴ et de la molécule d'adhésion cellulaire du mélanome (aussi appelée CD146) ¹⁴. Néanmoins, la détermination du profil phénotypique des BM-SC demeure une tâche ardue puisque l'expression de certains de leurs marqueurs de surface semble fluctuer en réponse au microenvironnement, tant *in vitro* qu'*in vivo* ⁶⁵.

2.3.3. Les ostéoblastes

Les OB proviennent de la différenciation des BM-SC. Plusieurs observations *in vivo* suggèrent qu'un équilibre régit l'ostéoblastogénèse et l'adipogénèse à partir de ces progéniteurs. Par exemple, les souris hétérozygotes pour le récepteur gamma activé par les proliférateurs des peroxisomes (*Pparg*^{+/-}), un facteur de transcription associé à l'adipogénèse, ont une masse osseuse supérieure à celle des souris de type sauvage; les

BM-SC extraites de souris invalidées pour le gène *Pparg* ont un potentiel ostéogénique accru; ou encore, le traitement de souris avec un agoniste de PPAR γ entraîne une perte de la densité osseuse⁶⁶⁻⁶⁸. En outre, il a été démontré que les BM-SC expriment à la fois, les facteurs de transcription associés à l'adipogénèse (la protéine de liaison alpha activatrice du motif CCAAT (C/EBP α) et PPAR γ) et à l'ostéogénèse (le facteur de transcription 2 lié à runt (Runx2), l'homologue 2 de l'homéoboîte msh (Msx2), l'ostérix (Osx) et le *distal-less homeobox 5* (Dlx5)). Ceux-ci seraient toutefois exprimés à de faibles niveaux dus à un rétrocontrôle négatif⁶⁹. Un débalancement de cet équilibre entraîne la différenciation des BM-SC. Par exemple, l'activation de la voie de signalisation canonique de *Wingless* (Wnt) favorise l'ostéoblastogénèse en inhibant les facteurs adipocytaires C/EBP α et PPAR γ et en induisant les facteurs ostéoblastogéniques Runx2, Dlx5 et Osx^{53,69} (Figure 7).

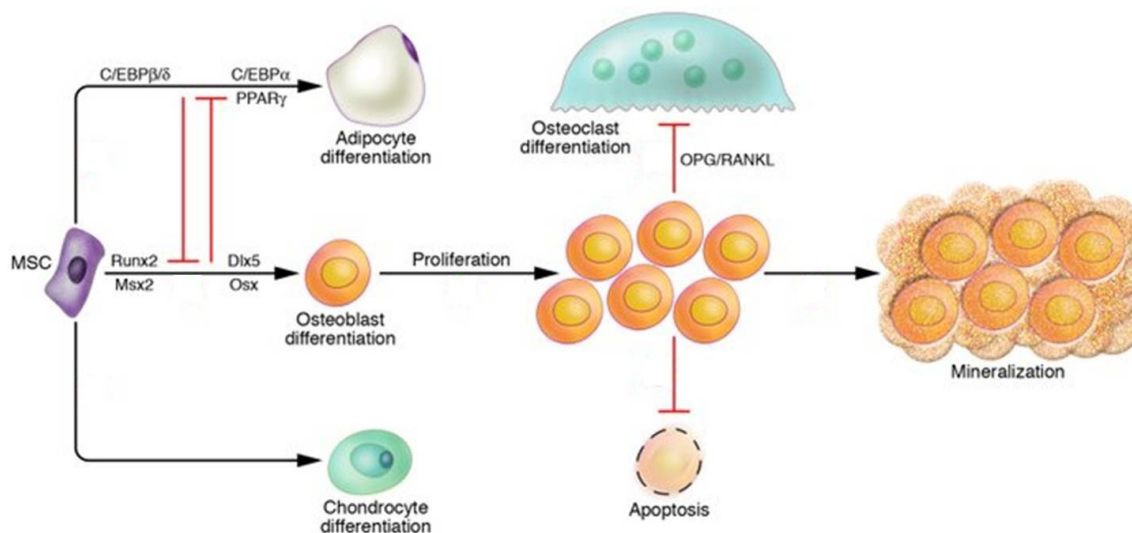


Figure 7: Voies de différenciation des BM-SC

Les BM-SC peuvent se différencier en adipocytes, ostéoblastes ou chondrocytes. MSC, cellule stromale mésenchymateuse; PPAR γ , récepteur gamma activé par les proliférateurs des peroxisomes; C/EBP α ou β/δ , protéine de liaison alpha ou bêta/delta activatrice du motif CCAAT; Runx2, facteur de transcription 2 lié à runt; Msx2, homologue 2 de l'homéoboîte msh; Osx, ostérix; Dlx5, *distal-less homeobox 5*; OPG, ostéoprotégérine; RANKL, ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa-B. Adapté de Krishnan et collègues⁷⁰.

Les OB formés par la différenciation des BM-SC sont responsables de la formation osseuse *in vivo* via la production de protéines de la matrice extracellulaire et la minéralisation osseuse. Ils produisent entre autres la BSP, l'OCN, l'OPN et le collagène de type I et expriment fortement l'ALP⁴. Il est possible d'obtenir des cellules stromales

ostéoblastiques dérivées de l'os (OB-SC, en anglais, pour *bone-derived osteoblast-like stromal cells*) par la mise en culture de fragments osseux dénués de moelle osseuse. Alternativement, on peut aussi en isoler en digérant à la collagénase les os vidés de leur moelle. La fraction CD31⁻, CD45⁻, Ter119⁻ des cellules extraites par ce procédé constitue les OB-SC ⁷¹. Outre leur localisation qui diffère, les OB-SC ont sensiblement le même profil phénotypique que les BM-SC. Ainsi, elles sont également positives pour les marqueurs de surface CD44, CD90 et CD105 ⁷². Cette réalité rend difficile l'attribution des effets observés *in vivo* à une population particulière de cellules stromales.

2.4. L'implication fonctionnelle du stroma

Contrairement à plusieurs tissus où les cellules effectrices sont majoritairement entourées de matrice extracellulaire, l'architecture de la moelle osseuse favorise les contacts directs entre cellules stromales et hématopoïétiques. Au-delà d'une simple fonction de support physique, cette réalité suggère l'existence d'interactions entre les deux systèmes cellulaires. Trentin a été le premier à proposer ce concept en 1971 avec sa théorie du *hematopoietic inductive microenvironment* selon laquelle la moelle osseuse serait séparée en plusieurs compartiments dont chacun serait responsable de la maturation d'un seul type de cellules hématopoïétiques ⁷³. Les décennies qui ont suivies ont permis de mettre en évidence une multitude d'interactions régulant les fonctions stromales et hématopoïétiques. Considérant l'objectif de cette thèse, seule la régulation des fonctions hématopoïétiques sera abordée dans les prochaines sections.

2.4.1. Le rôle du stroma dans la régulation de l'hématopoïèse

Deux des principales fonctions hématopoïétiques pour lesquelles le rôle du stroma est étudié sont le maintien du nombre de HSC et de leur quiescence. Différentes altérations génétiques du compartiment ostéoblastique ont permis de mettre en lumière sa relation avec les HSC. Par exemple, une mutation spontanée entraînant la perte de la forme membranaire du SCF chez la souris *steel-Dickie* altère le développement des OB-SC. Il en résulte un retard de formation osseuse et une diminution de la masse osseuse⁷⁴. Au niveau hématopoïétique, cela entraîne un déficit de la capacité d'auto-renouvellement des HSC et une érythropoïèse compromise. La transplantation des HSC *steel-Dickie* dans une souris de type sauvage ayant un microenvironnement intact restaure ces deux fonctions⁷⁵. Ainsi, le défaut hématopoïétique n'est pas cellulaire autonome, mais est plutôt dû à la modification de la niche.

À l'aide d'un modèle génétique de délétion conditionnelle des OB-SC, Visnjic et collègues ont pu caractériser davantage la relation qui existe entre ces cellules stromales et les HSC^{76,77}. Ils ont introduit le gène de la thymidine kinase sous le contrôle du promoteur *Coll1 α 1* qui est responsable de l'expression du collagène α 1 de type I. Ainsi, bien que ce gène soit introduit dans tout le génome, son expression est restreinte aux cellules qui produisent ce type de collagène, soit les OB. L'administration de ganciclovir à ces souris entraîne donc l'apoptose spécifique des OB puisque ce sont les seules cellules à exprimer la thymidine kinase. On observe alors une perte osseuse progressive qui est accompagnée par une diminution de la cellularité de la moelle osseuse, incluant une réduction du nombre de cellules de type KSL. La force de ce modèle réside dans

son caractère réversible, la restauration de l'hématopoïèse a été observée en concomitance avec le retour des OB-SC lors du retrait de la drogue. Ces deux modèles, de concert avec plusieurs autres revus par Wilson et Trumpp, ont permis de déterminer que le nombre d'OB-SC, ou du moins une sous-population immature de ceux-ci, module la taille et l'activité du compartiment de HSC ²¹.

De nombreuses études ont également investigué les interactions entre les cellules stromales et hématopoïétiques au niveau moléculaire. De façon non-exhaustive, le maintien de la quiescence des HSC fait intervenir la liaison de l'angiopoïétine 1 au récepteur Tie2 des HSC ⁴⁰; du facteur 1 alpha dérivé des cellules stromales (SDF-1 α , en anglais, pour *stromal-derived factor 1 α* ou CXCL12) au récepteur CXCR4 des HSC ^{78,79}; de *Jagged 1* au récepteur *Notch 1* des HSC ^{80,81} et de membres de la famille Wnt aux récepteurs *Frizzled* des HSC ⁸¹. En outre, les cellules stromales agissent aussi indirectement via la production de matrice extracellulaire. Par exemple, les niveaux d'OPN dans celle-ci sont inversement corrélés avec le nombre de HSC trouvés dans la niche ^{82,83} et la présence du protéoglycane *agrin* est essentielle à la survie et à la prolifération des ST-HSC ⁸⁴.

2.4.2. Le trafic des HSC

La niche hématopoïétique contrôle le trafic des HSC de trois façons. Elle peut favoriser leur rétention dans la niche, leur mobilisation vers la circulation sanguine ou leur retour dans la niche (aussi appelé nichage). Cette régulation se fait par la modulation

d'une panoplie de molécules d'adhésion, cytokines et facteurs de croissance (Figure 8). L'expression de la molécule d'adhésion N-cadhérine (N-cad) et de plusieurs intégrines est entre autres augmentée suivant l'activation de Tie2 par l'angiopoïétine 1 pour renforcer la rétention des HSC dans la niche ⁴⁰. La présence de la molécule 1 d'adhésion cellulaire vasculaire (VCAM-1, en anglais, pour *vascular cell adhesion molecule 1* ou CD106) à la surface des cellules stromales est aussi très importante pour l'ancrage des cellules hématopoïétiques via le *very late antigen-4* ⁸⁵. Lorsque la mobilisation est nécessaire, le stroma sécrète le facteur stimulant la formation de colonies de granulocytes (G-CSF, en anglais, pour *granulocyte colony-stimulating factor*). Ce dernier entraîne la production de protéases telles que la peptidase CD26 et l'élastase des neutrophiles afin de cliver des molécules d'adhésion comme VCAM-1 et SDF-1 α ⁸⁶⁻⁸⁹. Plusieurs autres molécules dont le SCF et l'IL-8 ont aussi un potentiel mobilisateur ⁹⁰. À l'inverse, la chimiokine SDF-1 α est le principal acteur du nichage des HSC ⁹¹.

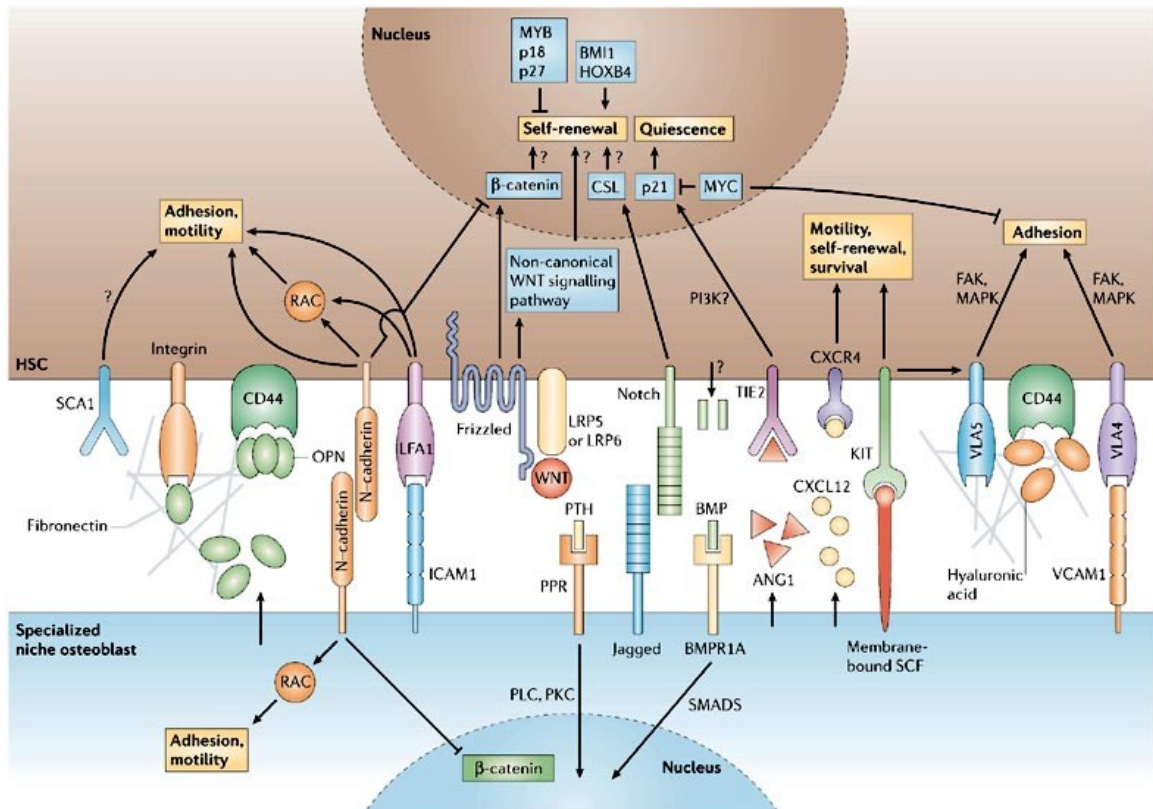


Figure 8: Interactions cellulaires dans la niche hématopoïétique

Représentation schématique des principales interactions identifiées entre les cellules stromales de la niche hématopoïétique et les HSC. Tiré avec permission de Wilson et Trumpp²¹.

Cette capacité qu'ont les HSC de retourner dans leur niche est à la base du concept de transplantation de moelle osseuse (BMT, en anglais, pour *bone marrow transplantation*). Il est ainsi possible d'administrer des cellules hématopoïétiques de façon intraveineuse (iv) et les HSC vont naturellement retourner dans leurs niches pour repopuler le système hématopoïétique du receveur. En outre, il n'est pas nécessaire de

purifier les HSC puisque ces cellules nichent de façon différentielle selon leur état de maturation ⁹². Par ailleurs, l'injection concomitante de cellules matures est souhaitée puisque ces cellules permettent de maintenir les fonctions hématopoïétiques à court terme en attendant la reconstitution permanente par les HSC.

2.4.3. L'homéostasie osseuse

L'homéostasie osseuse est un équilibre entre la formation et la résorption osseuse par les OB et les OC, respectivement. En plus de cette participation directe au remodelage osseux, la niche y contribue indirectement par son rôle dans l'ostéoclastogénèse. Alors que le RANK est situé sur les précurseurs ostéoclastiques, le M-CSF, le RANKL et l'OPG proviennent d'effecteurs externes. L'utilisation de souris *op/op* a contribué à l'identification de certains d'entre eux. L'incapacité de ces souris à produire du M-CSF fonctionnel est à l'origine de leur ostéopétrose. Il s'agit d'une pathologie caractérisée par un durcissement et une augmentation de la densité des os. Il a été démontré que des OB-SC extraits de souris de type sauvage induisent des précurseurs ostéoclastiques provenant de souris *op/op* à se différencier en OC ⁹³. La situation inverse, soit des OB-SC *op/op* et des précurseurs ostéoclastiques de type sauvage, ne permet pas la formation d'OC, sauf avec l'ajout de M-CSF exogène. Ces résultats, ainsi que d'autres obtenus avec des BM-SC ³³, indiquent que les cellules stromales, mais en particulier les OB-SC, produisent le facteur de croissance M-CSF nécessaire à l'ostéoclastogénèse.

Le RANKL est exprimé à la membrane des BM-SC et des OB-SC. Cette conclusion découle du fait que le contact cellulaire entre ces cellules stromales et les

précurseurs ostéoclastiques est nécessaire pour la formation d'OC *in vitro*^{94,95}. Les lymphocytes T activés produisent également du RANKL comme en témoigne leur capacité à former des OC *in vitro*⁹⁶. De plus, le RANKL provenant de l'activation systémique des lymphocytes T est responsable de la perte osseuse observée dans un modèle d'arthrite chez le rat⁹⁶. Par contre, étant donné que les souris déficientes en lymphocytes T n'ont pas de défaut osseux, il est probable que le RANKL provenant de ces cellules ne soit pas impliqué dans l'homéostasie osseuse en condition physiologique³². Les ostéocytes, soit les ostéoblastes qui ont été piégés dans la matrice osseuse, produisent aussi du RANKL à des niveaux supérieurs aux BM-SC et OB-SC *in vitro* et ont un potentiel ostéoclastogénique accru⁹⁷. Par ailleurs, la délétion spécifique du RANKL dans ces cellules *in vivo* entraîne une sévère ostéopétrose ce qui confirme l'importance des ostéocytes dans la formation des OC^{97,98}. Étonnamment, la délétion spécifique du RANKL dans les ostéoprogéniteurs (un stade du développement situé entre les BM-SC et les OB-SC matures) n'altère pas le remodelage osseux. En revanche, le RANKL provenant des OB-SC matures et des chondrocytes hypertrophiques est essentiel pour le développement osseux⁹⁸.

Le récepteur inhibiteur OPG est majoritairement sécrété par les cellules stromales et les lymphocytes B^{99,100}. Par ailleurs, ces derniers sont responsables de 64% de la production totale d'OPG dans la moelle osseuse, la majeure partie (45%) provenant des lymphocytes B matures. De plus, des souris déficientes en lymphocytes B présentent une carence en OPG et sont ostéoporotiques, un état qui peut être restauré par la reconstitution des lymphocytes B¹⁰¹.

2.4.4. La pathophysiologie

Si le microenvironnement osseux est capable de moduler les fonctions hématopoïétiques, alors il est plausible de croire d'un défaut dans ce compartiment puisse altérer ces mêmes fonctions. Walkley et collègues ont apporté une première preuve supportant cette hypothèse en démontrant qu'un microenvironnement déficient pour le récepteur γ de l'acide rétinoïque induit un syndrome myéloprolifératif ¹⁰². En effet, lorsque des cellules hématopoïétiques provenant d'une souris de type sauvage sont transplantées dans une souris déficiente pour ce récepteur, elles perpétuent ce phénotype en réponse au microenvironnement. L'altération de la niche osseuse par la délétion spécifique de la protéine *Dicer1* dans les ostéoprogéniteurs murins a aussi révélé une régulation anormale des cellules hématopoïétiques. En effet, on assiste au développement d'un syndrome myélodysplasique pouvant induire une leucémie myéloïde aiguë ¹⁰³. Enfin, différentes modifications du microenvironnement ont été associées à l'incidence de myélofibroses primaires, néoplasmes myéloprolifératifs et myélomes multiples ¹⁰⁴.

Ces résultats soulèvent une question quant à savoir si des altérations du microenvironnement pourraient expliquer certains changements hématopoïétiques observés dans le vieillissement, tels que la proportion accrue de cellules myéloïdes ou l'efficacité réduite de prise de greffe ²⁵. Pour y répondre, Mayack et collègues ont incubé pendant 36 heures des HSC/HPC avec des OB-SC provenant de souris jeunes ou âgées. Ils ont ensuite analysé leur potentiel après transplantation ¹⁰⁵. Cette expérience a permis de reproduire le débalancement myéloïde/lymphoïde observé dans le vieillissement, ainsi que la prise de greffe diminuée des HSC/HPC. Dans le même ordre d'idées, Liang et

collègues ont démontré que les HPC de vieilles souris ont une capacité de nichage deux à trois fois inférieure à celle des HPC de jeunes souris. Cette conséquence peut à la fois comporter une composante intrinsèque et extrinsèque ¹⁰⁶. Toutefois, ils ont également démontré une réduction du nichage de jeunes HPC dans la moelle osseuse de vieilles souris, un effet indubitablement lié à l'altération du stroma. Ainsi, l'intégrité du microenvironnement osseux est importante pour le maintien des fonctions hématopoïétiques.

3.0. LA SÉNESCENCE CELLULAIRE

3.1. Le concept et les types de sénescence cellulaire

Le concept de sénescence cellulaire a été décrit pour la première fois en 1965 par Hayflick ¹⁰⁷ suite à des observations faites sur des fibroblastes humains en culture. Il s'agit d'un processus limitant la durée de vie répliquative des cellules par un arrêt permanent et irréversible de la cellule en phase G1 du cycle cellulaire ¹⁰⁸. Il a été démontré qu'il s'agit de sénescence répliquative en réponse à un raccourcissement des télomères; ces régions hautement répétitives d'ADN non-codant (5'-TTAGGG-3' chez les vertébrés) situées à l'extrémité des chromosomes pour en protéger l'intégrité ¹⁰⁹. Ce phénomène découle de l'incapacité de l'ADN polymérase à répliquer les extrémités linéaires des chromosomes, ce qui entraîne leur érosion progressive à chaque cycle de répllication cellulaire ^{110,111}. Lorsque les télomères atteignent une longueur critique qui ne leur permet plus de protéger le matériel génétique, la cellule perçoit les télomères résiduels comme de l'ADN endommagé ¹¹². Elle active alors la machinerie de la réponse

au dommage à l'ADN (DDR, en anglais, pour *DNA-damage response*) et mène ultimement à l'entrée de la cellule en sénescence répllicative suite à l'échec de la réparation^{109,113}. L'ajout par manipulation génétique de la télomérase, une transcriptase inverse capable de restaurer les télomères, permet de rétablir le cycle prolifératif des cellules en sénescence répllicative (Figure 9)¹¹⁴.

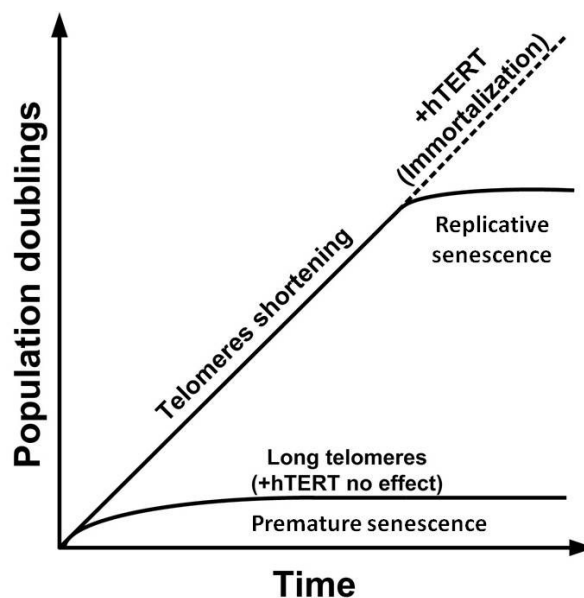


Figure 9: Sénescence répllicative et prématurée

La sénescence répllicative se distingue de la sénescence prématurée par la capacité des cellules à proliférer suite à l'ajout de la télomérase.

Il existe un autre type de sénescence cellulaire appelé sénescence prématurée du fait qu'elle survient avant le développement de la sénescence répllicative. Elle peut être induite par différents stimuli, tels que le stress oxydatif ou les espèces réactives oxygénées (ROS, en anglais, pour *reactive oxygen species*), l'activation d'oncogènes – on

parle alors de sénescence induite par un oncogène (OIS, en anglais, pour *oncogene-induced senescence*)¹¹⁵⁻¹¹⁷ – ou encore l’irradiation (IR)^{118,119}. Chacun de ces stimuli entraîne des dommages à l’ADN au même titre que la sénescence répliquative. Toutefois, la sénescence prématurée se distingue de la sénescence répliquative par l’incapacité des cellules à proliférer malgré l’ajout de la télomérase (Figure 9)¹¹⁴. De plus, certains oncogènes induisent un arrêt en phase G2 dans une fraction des cellules atteintes^{116,120,121}. La sénescence prématurée sera abordée plus en détails puisqu’il s’agit du modèle choisi pour cette thèse.

type de sénescence	répliquative	prématurée
prolifération suite à l'ajout de la télomérase <i>in vitro</i>	OUI	NON
inducteur(s) du dommage à l'ADN	raccourcissement des télomères	stress oxydatif/ROS, activation d'oncogènes, irradiation
Voie d'induction majoritaire de la sénescence	p21	p16

Tableau 1: Types de sénescence et caractéristiques

3.2. Les inducteurs de la sénescence prématurée

3.2.1. Le stress oxydatif et les espèces réactives oxygénées

Le stress oxydatif fait référence à un déséquilibre entre les facteurs pro- et anti-oxydants de la cellule dont les ROS, produits majoritairement par le métabolisme aérobie de la mitochondrie. Ces facteurs sont les principaux acteurs dans l’induction de la sénescence prématurée des cellules. La théorie des radicaux libres de Harman décrite en 1956 propose que les altérations fonctionnelles observées dans le vieillissement sont causées par l’accumulation de dommages structurels causés par les ROS¹²². Toutefois,

un nombre grandissant d'observations démontre que ces dommages seuls ne sont pas suffisants pour expliquer les pertes de fonction associées avec l'âge telles que la proportion accrue de cellules myéloïdes ou l'efficacité réduite de prise de greffe. De nouvelles hypothèses ont été développées au fil des ans, dont la théorie du stress redox de Sohal, pour inclure la découverte du rôle des ROS dans plusieurs voies de signalisation^{123,124}. Néanmoins, bien que la relation causale des ROS dans le dysfonctionnement des organes reste encore à élucider, leurs effets au niveau cellulaire sont bien réels. En outre, alors que les différentes théories exposées sont principalement basées sur la production endogène de ROS par la chaîne respiratoire mitochondriale, la sénescence prématurée peut découler d'un stress oxydatif exogène causant la production de ROS indépendamment de la mitochondrie. L'existence de mécanismes distincts est donc envisageable.

La culture de fibroblastes murins en présence de 20% d'oxygène (condition supra-physiologique) réduit leur capacité proliférative et induit leur sénescence. Il est à noter que cet effet est indépendant de la sénescence répliquative considérant la présence de la télomérase dans les cellules murines^{125,126}. Par ailleurs, la culture de ces mêmes cellules, mais aussi de fibroblastes humains, en présence de 3% d'oxygène (condition physiologique) prolonge leur longévité et peut même aller jusqu'à éviter leur entrée en sénescence^{126,127}. L'incubation de fibroblastes humains en présence de peroxyde d'hydrogène ou de molécules induisant sa production (par exemple, l'oridonin) entraîne également l'entrée en sénescence¹²⁸⁻¹³⁰. Cette sénescence peut toutefois être renversée par le traitement à la N-acétyl-L-cystéine, un antioxydant agissant entre autres sur les niveaux de la glutathion S-transférase impliquée dans la conversion du peroxyde

d'hydrogène en molécule d'eau¹³⁰⁻¹³². Enfin, l'induction de la OIS par Ras passe par une élévation des niveaux de ROS intracellulaires, qui est elle aussi bloquée par un traitement à la NAC¹³¹.

3.2.2. Les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs

Un oncogène est un gène dont l'expression rendue anormale peut transformer la cellule qui l'exprime. Généralement, devant un tel stress, la cellule répond par l'entrée en sénescence; un phénomène qui a été observé pour la première fois avec l'apparition de l'oncogène Ras^{V12}¹³³. Par la suite, il a été démontré que la surexpression ou l'expression de formes constitutivement actives de plusieurs protéines impliquées dans la voie de signalisation de Ras (Raf, MEK, Ets) cause aussi l'induction de la sénescence¹³⁴⁻¹³⁶ par un mécanisme de rétrocontrôle négatif s'opposant à l'hyper-prolifération causée par ces oncogènes¹³⁷. À l'inverse, la perte de suppresseurs de tumeurs comme PTEN induit aussi la sénescence¹³⁸. La OIS est donc un mécanisme de protection cellulaire contre le développement de cancers. En effet, l'inactivation additionnelle de gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la OIS, tels que l'inhibiteur des kinases cyclines-dépendantes (CDKi, en anglais, pour *cyclin-dependent kinase inhibitors*) p16, promeut la tumorigénèse^{133,138,139}. Il a toutefois été démontré que l'inactivation de p53 ou de la protéine suppresseur de tumeur rétinoblastome (pRb) dans des cellules exprimant de hauts niveaux de p16 ne restaure pas la prolifération¹¹⁴. Par ailleurs, la réinsertion par manipulation génétique de ces suppresseurs de tumeurs peut entraîner l'entrée en

sénescence des cellules tumorales tant *in vitro* que *in vivo* (Voir la section 3.4 pour une description détaillée des gènes suppresseurs de tumeurs)¹⁴⁰⁻¹⁴².

3.2.3. L'irradiation

Il existe plusieurs types de radiations dont les particules alpha et bêta et les rayons X et gamma. Les particules alpha sont relativement grosses et possèdent une double charge positive, ce qui limite leur degré de pénétrance dans un tissu. Elles causeront donc un dommage très important à un nombre limité de cellules. Les particules bêta sont beaucoup plus petites et possèdent une charge négative, augmentant leur degré de pénétrance dans l'organisme. Elles altéreront plus de cellules, mais l'intensité du dommage sera moins grande. Les rayons X et gamma sont de l'énergie pure ne comportant aucune masse. Ils possèdent un important degré de pénétrance et peuvent interagir avec une multitude de cellules sur leur passage, mais causent moins de dommage que les particules radioactives¹⁴³. Comme les protocoles de conditionnement pour les greffes de moelle osseuse font intervenir les rayonnements gamma, seuls les effets de ceux-ci seront documentés dans la présente étude.

La dose d'irradiation (IR) est quantifiée en grays (Gy) ou en dose de radiation absorbée (rad). Elle correspond à la quantité d'énergie de radiation délivrée par unité de masse de tissu. Un Gy équivaut à 100 rad ou à un joule d'énergie de radiation absorbée par kilogramme de tissu. L'IR peut avoir une action directe ou indirecte. On parle d'effet direct des radiations lorsque l'énergie de désintégration provenant d'une source radioactive interagit avec l'ADN. On parle plutôt d'effet indirect lorsque cette énergie

interagit avec une molécule d'eau et entraîne sa décomposition radiolytique sous forme de ROS. La recombinaison de ceux-ci avec diverses composantes de la cellule peut entraîner la formation de substances toxiques telles que le peroxyde d'hydrogène et avoir des effets délétères sur la cellule. De façon générale, il s'agit du principal type de dommage rencontré, car l'ADN ne représente qu'une infime fraction à l'échelle du corps humain et que ce dernier est majoritairement composé d'eau¹⁴⁴. Enfin, la radiosensibilité d'un tissu ou organe est fonction de la vitesse à laquelle il se régénère¹⁴⁴. Les cellules hématopoïétiques comptent ainsi parmi les plus radiosensibles de l'organisme.

L'IR est depuis longtemps connue pour réduire la capacité des cellules stromales de la moelle osseuse à former des colonies¹⁴⁵. Cet effet semble permanent puisque cette fonction reste altérée plusieurs mois, voir des années, après la transplantation¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Toutefois, il n'a pas été démontré si l'effet observé était dû à la mort par apoptose ou par l'induction de la sénescence dans les cellules stromales de la moelle osseuse. Il a néanmoins été démontré que l'IR induit la sénescence de BM-SC murines *in vitro*¹⁴⁸. De plus, bien que la majorité des cellules hématopoïétiques soient éliminées par apoptose, une IR sous-létale (4-6,5 Gy) est à même d'induire la sénescence des HSC^{118,149}. En effet, il a été démontré que près du tiers des cellules hématopoïétiques de type KSL ne sont pas éliminées par apoptose et survivent plusieurs semaines après une IR de 4 Gy en culture. Ces cellules ne sont toutefois plus aptes à proliférer et expriment la β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β -gal), p16INK4a et p19ARF, trois marqueurs de sénescence¹⁴⁹ (Voir la section 3.4 pour une description détaillée des marqueurs de sénescence). Par ailleurs, l'IR induit aussi la sénescence de ces cellules *in vivo* et entraîne une diminution soutenue de leur nombre¹¹⁸.

3.3. L'usage médical de l'irradiation

L'intérêt pour l'étude des effets biologiques de l'irradiation (IR) a vu le jour au début du 20^e siècle. Une première étude publiée en 1906 a démontré que l'IR est davantage cytotoxique pour les cellules en pleine division cellulaire comparativement aux cellules matures différenciées ¹⁵⁰. Considérant la vitesse à laquelle les cellules cancéreuses se multiplient, l'IR n'a pas tardé à faire son apparition dans le traitement de différents cancers ¹⁵¹. Ce n'est que beaucoup plus tard qu'elle a été utilisée dans le traitement de leucémies, pour pallier aux échecs de la chimiothérapie chez des patients nécessitant une myéloablation suivie d'une transplantation de moelle osseuse (BMT, en anglais, pour *bone marrow transplantation*) ¹⁵². Contrairement aux tumeurs solides pour lesquelles une IR locale suffit, l'élimination des cellules hématopoïétiques requière une TBI. En effet, le pelvis et les vertèbres représentent environ 60% des sites d'hématopoïèse, mais on en retrouve également au niveau des côtes, du sternum, du crâne, des omoplates, des fémurs, des tibias et des humérus ¹⁵³. Suite à un tel traitement (5-16 Gy) ¹⁵³, aussi bien les cellules hématopoïétiques saines que cancéreuses sont éliminées, ce qui entraîne une aplasie médullaire chez le patient et justifie le besoin d'une BMT. Historiquement, trois raisons majeures motivent l'utilisation de la TBI : (1) l'élimination des cellules anarchoïques, (2) l'élimination des cellules immunocompétentes du receveur pouvant mener au rejet de la greffe et (3) la création d'espace dans la niche permettant d'accueillir les cellules greffées ¹⁵⁴. Cette dernière est maintenant controversée. La TBI s'est rapidement imposée comme l'une des modalités indispensables au conditionnement précédent la BMT ¹⁵². De nos jours, l'utilisation de doses réduites d'IR est de plus en plus répandue, conséquence d'une observation tout à

fait fortuite. En effet, certains patients trop faibles pour recevoir la dose complète d'IR se sont vus offrir une dose réduite accompagnée d'un pronostic moins encourageant. Étonnamment, le taux de succès de ces BMT était aussi bon sinon meilleur que celui des patients ayant reçu la dose létale. Ces observations ont été parmi les premières à suggérer l'importance de l'intégrité de la niche pour le bon fonctionnement des cellules hématopoïétiques. En conséquence, l'emploi de doses réduites d'IR est maintenant préféré dans les protocoles de conditionnement pour les BMT.

3.4. Les caractéristiques des cellules sénescences

3.4.1. La morphologie

La sénescence altère l'aspect des cellules. En effet, celles-ci adoptent une morphologie large et aplatie *in vitro*. L'augmentation des niveaux d'ezrin, une protéine associée à la membrane et au cytosquelette, causerait l'acquisition de cette dernière caractéristique suite à l'activation de CDK5 par la protéine pRb^{155,156}. Les cellules sénescences peuvent aussi être identifiées par différents marqueurs, bien qu'aucun ne soit exclusif à la sénescence. Ainsi, elles sont généralement positives pour la bêta-galactosidase associée à la sénescence (SA- β -gal, en anglais, pour *senescence-associated beta-galactosidase*)^{108,157}. Il s'agit d'une enzyme lysosomale active à pH 4,0 en condition physiologique. Lorsqu'une cellule entre en sénescence, le nombre et la taille des lysosomes augmentent^{158,159}, de même que l'expression du gène *GLB1* codant pour la β -D-galactosidase¹⁶⁰. Ces caractéristiques particulières permettent de détecter l'activité de l'enzyme dans les cellules sénescences à des pH sous-optimaux variant entre

5,0 et 6,0; pH pour lequel l'activité est indétectable dans les cellules saines^{157,161}. La visualisation se fait par l'ajout de X-galactose qui donne une coloration bleue aux cellules suite à son clivage par l'enzyme (Figure 10). Il s'agit d'une méthode simple et rapide de détecter les cellules sénescents, qui a toutefois été critiquée parce qu'elle n'est pas essentielle à l'établissement de la sénescence¹⁶⁰.

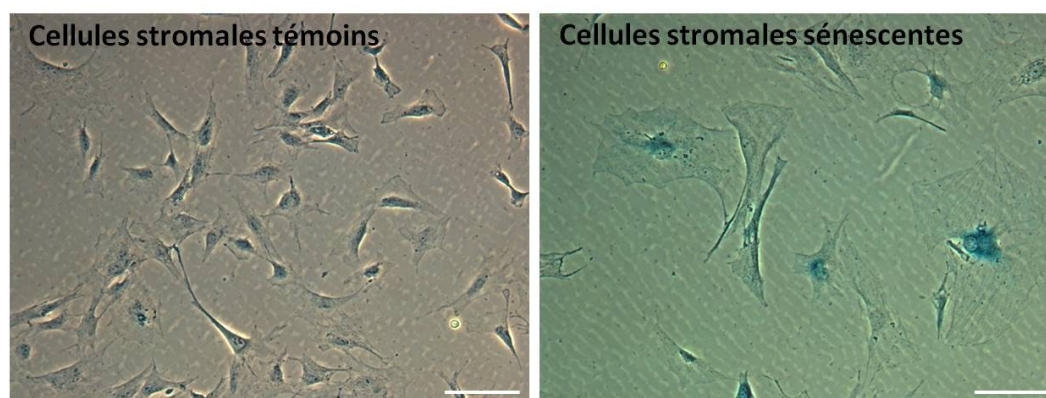


Figure 10: Phénotype des cellules sénescents

Les cellules sénescents adoptent une morphologie large et aplatie et sont positives pour la bêta-galactosidase associée à la sénescence (bleu). Montré ici, des OB-SC 10 jours après avoir reçu (sénescents) ou non (témoins) une irradiation de 10 Gy. Échelle : 10 μ m, Grossissement : 10X.

3.4.2. Le potentiel mitogénique

La sénescence est caractérisée pas un arrêt de prolifération permanent de la cellule en phase G1 du cycle cellulaire distinct de la sortie de la cellule du cycle en G0, aussi appelée quiescence (Figure 11)¹⁰⁸. Bien que similaires, ces deux états de la cellule se distinguent par différents aspects. Par opposition aux cellules sénescents, les cellules

quiescentes ne sont pas arrêtées de façon permanente et peuvent réintégrer le cycle cellulaire en réponse à des signaux physiologiques¹⁰⁸. De plus, une grande proportion de cellules sénescents acquiert une résistance à certains signaux apoptotiques. Par exemple, les fibroblastes humains sénescents sont résistants à l'apoptose causée par le stress oxydatif et la privation en facteurs de croissance, mais demeurent sensibles à celle induite via la signalisation par le récepteur Fas^{162,163}. Par ailleurs, la résistance à un signal apoptotique donné sera dépendante du type cellulaire impliqué, comme pour les fibroblastes humains sénescents qui résistent à l'apoptose induite par la céramide contrairement aux cellules endothéliales¹⁶⁴. Enfin, les cellules sénescents présentent un patron d'expression génique et un phénotype sécrétoire qui leurs sont propres. Entre autres, on note des altérations dans l'expression des régulateurs du cycle cellulaire, tant au niveau de gènes qui ont pour fonction d'en inhiber la progression que de gènes responsables de son activation^{41,165-169}. Comme exemple de gènes inhibiteurs du cycle cellulaire, on constate une augmentation des CDKi p16 et p21 (aussi nommées CDKN2a ou p16INK4a et CDKN1a, p21Cip1 ou Waf1, respectivement). Ces derniers agissent sur les complexes cyclines/CDK pour empêcher le passage de la phase G1 à la phase de synthèse S^{165,170}. Par contre, certains activateurs/facilitateurs du cycle cellulaire comme les cyclines A et B sont diminués dans les cellules sénescents¹⁷¹.

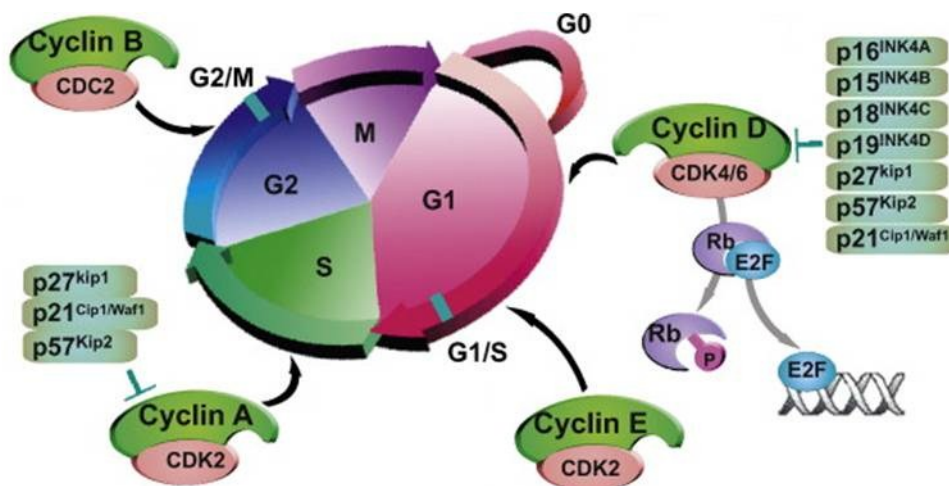


Figure 11: Régulation du cycle cellulaire

Les CDKi (inhibiteurs de kinases cyclines-dépendantes) sont responsables de la prolifération par leur intervention au niveau des différents points de contrôle du cycle cellulaire. G0, phase Gap 0 ou quiescence; G1, phase Gap 1; S, synthèse; G2, phase Gap 2; M, mitose; CDK, kinase cycline-dépendante; CDC, *cell division cycle*; Rb, protéine rétinoblastome; E2F, facteur de transcription E2. Adapté de Wang et collègues ¹⁷².

3.4.3. Le profil sécrétoire

Étant donné la nature de la sénescence, plusieurs des changements observés dans l'expression génique et phénotypique sont liés à la machinerie proliférative ou de réparation du dommage à l'ADN. Par contre, on constate aussi la production de plusieurs cytokines (inflammatoires pour la plupart), facteurs de croissance et protéases (revu par Freund et collègues en 2010) ^{119,173-175}. Le terme SASP (en anglais, pour *senescence-*

associated secretory phenotype) a été proposé pour la première fois en 2007 par Campisi et d'Adda di Fagagna pour décrire ce phénotype sécrétoire complexe et particulier à la sénescence¹⁰⁸. Parmi les facteurs les plus étudiés du SASP, notons l'IL-6¹⁷⁴, l'IL-8¹⁷³ et l'*insulin-like growth factor binding protein 7*¹⁷⁵ qui ont démontré une capacité à induire ou à amplifier la OIS. Toutefois, une étude récente a démontré que des cellules pouvaient être induites en sénescence sans l'apparition du SASP et donc, que le SASP ne serait pas une conséquence de la sénescence, mais plutôt du dommage à l'ADN et serait dissociable de l'arrêt de croissance cellulaire¹⁷⁶.

3.4.4. Le dommage à l'ADN

Comme les inducteurs de sénescence ont tous en commun la création de dommage à l'ADN, il est normal d'observer l'accumulation de foci de dommage à l'ADN associés à la sénescence (SDF, en anglais, pour *senescence-associated DNA-damage foci*)^{112,115,116}. Ces SDF font intervenir la machinerie de la réponse au dommage à l'ADN (DDR, en anglais, pour *DNA damage response*) dont les protéines peuvent être regroupées en quatre grandes classes : les senseurs, les médiateurs, les transducteurs du signal et les effecteurs¹⁷⁷. Il existe plusieurs types de dommages à l'ADN qui sont reconnus par des complexes de la DDR spécifiques à chacun.

3.4.4.1. Les cassures double-brin de l'ADN

La sénescence est généralement induite suite à une cassure double-brin dans l'ADN qui est reconnue par la DDR impliquant la protéine mutée dans le syndrome d'ataxie télangiectasie (ATM, en anglais, pour *ataxia telangiectasia mutated*) (Figure 12)^{177,178}. Le dommage est alors perçu par le complexe Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) qui recrute l'homodimère ATM. Cette kinase sérine/thréonine est autophosphorylée en sérine¹⁹⁸¹, menant à la dissociation du dimère et à son activation sous forme de monomère. Elle peut alors phosphoryler plusieurs cibles dont l'histone H2AX, une protéine chaperonne de l'ADN, en sérine¹³⁹ (γ -H2AX). Elle agit aussi sur le complexe MRN afin de recruter des médiateurs de la DDR comme Mdc1 et la protéine 1 de liaison à p53 (53PB1, en anglais, pour *p53-binding protein 1*). ATM phosphoryle ensuite la thréonine 68 du transducteur de signal Chk2, qui phosphoryle à son tour l'effecteur p53 en sérine¹⁵ pour l'activer. Ultimement, ce suppresseur de tumeur active d'autres effecteurs pour mener à l'une des trois réponses possibles de la cellule, soit (1) l'arrêt transitoire du cycle cellulaire permettant la réparation de l'ADN et la reprise du cycle, (2) l'élimination par apoptose ou (3) l'arrêt permanent du cycle cellulaire et l'entrée en sénescence^{124,178}.

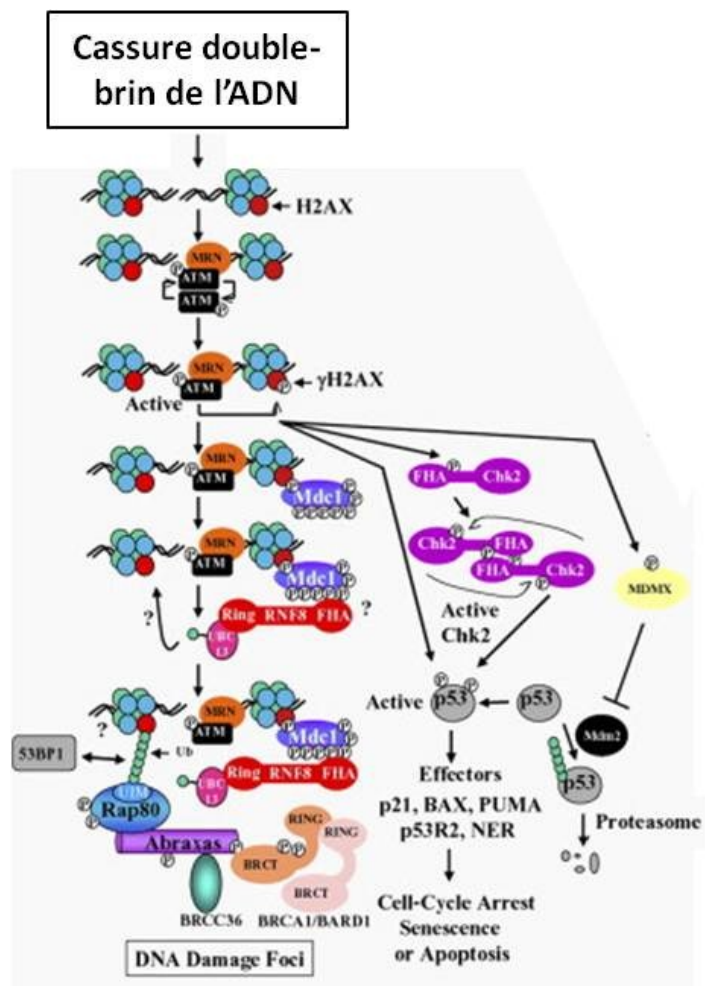


Figure 12: Schéma de la voie ATM de la réponse au dommage à l'ADN

Une cassure double-brin de l'ADN active la machinerie de la réponse au dommage à l'ADN liée à la kinase ATM qui mène à l'activation d'effecteurs tels que p53 et p21 et à l'arrêt du cycle cellulaire ou l'entrée de la cellule en apoptose ou en sénescence. Adapté de Harper et collègues

3.4.4.2. Les cassures simple-brin de l'ADN

Dans certains cas, la sénescence peut aussi être induite par une cassure simple-brin, par exemple lors de dommages induits par les rayonnements ultraviolets ou le stress réplicatif. La DDR passe alors par la voie de signalisation impliquant la protéine liée à l'ataxie télangiectasie et à Rad3 (ATR, en anglais, pour *ataxia telangiectasia and Rad3-related*)¹⁷⁹. Cette kinase sérine/thréonine et son partenaire d'interaction ATRIP sont recrutés au site de dommage ainsi que les senseurs RAD17 et le complexe hétérotrimérique 9-1-1 composé de RAD9, RAD1 et HUS1. À l'instar d'ATM, ATR est autophosphorylée et phosphoryle ensuite une série de senseurs pour permettre le recrutement de médiateurs comme TopBP1. La cascade mène au recrutement et à la phosphorylation du transducteur Chk1 qui, une fois activé, phosphoryle les effecteurs de la famille Cdc25. Cela favorise leur dégradation par le protéasome et empêche ainsi l'activation de certaines kinases essentielles à la progression du cycle cellulaire¹⁷⁹.

3.4.4.3. Le dysfonctionnement des télomères

Lorsque les télomères atteignent une longueur critique qui ne leur permet plus de protéger le matériel génétique, la cellule les reconnaît comme de l'ADN endommagé et active la machinerie de la DDR¹¹². Dans cette situation particulière, on parle alors de foci induits par le dysfonctionnement des télomères (TIF, en anglais, pour *telomere dysfunction-induced foci*) plutôt que de SDF.

3.4.4.4. La détection des foci de dommage à l'ADN associés à la sénescence

Parmi toutes les protéines de la DDR, la détection de foci de 53PB1 et de la γ -H2AX est largement utilisée pour identifier les SDF^{180,181}. Dans le cas des TIF, ces marquages peuvent être colocalisés avec les télomères par les techniques d'immunoprécipitation de la chromatine ou d'hybridation fluorescente *in situ*^{109,112}. Il est important de noter que les SDF sont ceux qui persistent dans la cellule. En effet, plusieurs foci de dommage à l'ADN peuvent être formés par cellule suite à un stress, mais la plupart sont rapidement réparés alors que certains persistent ou mènent à l'apoptose de la cellule^{182,183}. Les facteurs responsables de l'engagement dans une voie ou dans l'autre sont encore largement méconnus, mais seraient dépendants du type cellulaire, de la nature et de l'intensité du dommage¹⁰⁸. Par exemple, les fibroblastes et les cellules épithéliales tendent à entrer en sénescence alors que les cellules hématopoïétiques favorisent l'apoptose. Toutefois, la majorité des cellules ont la capacité d'engager ces deux réponses. Cela a été confirmé par une transition de l'apoptose vers la sénescence, ou inversement, suite à différentes manipulations de protéines pro- et anti- apoptotiques dans des modèles cellulaires¹⁸⁴⁻¹⁸⁶.

3.4.5. Les modifications de la chromatine

Les cellules sénescents se caractérisent habituellement, mais pas obligatoirement, par l'apparition de foci d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF, en anglais, pour *senescence-associated heterochromatin foci*)¹⁸⁷. Les SAHF se forment au niveau du

promoteur de gènes pro-prolifératifs, tels que les gènes régulés par les facteurs de transcription E2F¹⁸⁷. Ils résultent du recrutement ou de la modification de protéines associées à l'hétérochromatine. On constate ainsi l'accumulation de la protéine de l'hétérochromatine 1 et la méthylation de l'histone H3 en lysine^{9 108}. Leur détection par immunofluorescence, tout comme l'ajout de 4'-6'-diamidino-2-phényindole (DAPI), permet de mettre en évidence les SAHF¹⁰⁸.

3.4.6. L'expression de suppresseurs de tumeurs

Enfin, les cellules sénescents sont souvent caractérisées par une augmentation de l'expression des suppresseurs de tumeurs p16INK4a, p19ARF, p53 et d'une hypophosphorylation de pRb. Ces protéines font parties des deux grandes voies de signalisation centrales de la sénescence.

3.5. Les voies d'induction de la sénescence

Suite à l'exposition aux différents inducteurs de sénescence et au recrutement des éléments de la DDR, la cellule bloque le cycle cellulaire pour permettre la réparation de l'ADN par des mécanismes dépendants du type de dommage causé. Lorsque la réparation est impossible, le blocage est maintenu et la cellule devient sénescence. Il existe deux voies majeures responsables d'inhiber la progression du cycle cellulaire, soit la voie de p53 et celle de p16. Bien qu'elles puissent s'entrecroiser, elles peuvent toutes deux agir de façon indépendante¹⁰⁸. Le patron d'induction de la sénescence est fonction de divers facteurs dont l'espèce, la nature du stress ou le type cellulaire. Par exemple, l'activation

concomitante des deux voies est requise chez la souris pour l'induction de la sénescence par l'oncogène Ras^{V12}, alors que l'activation de l'une ou l'autre est suffisante chez l'humain¹³³. En outre, la sénescence répliquative passe par l'augmentation de la CDKi p21, résultat de l'activation de la voie p53. Par opposition, la sénescence prématurée passe généralement par la voie p16¹⁸⁸.

Le locus *INK4b/ARF/INK4a* revêt une grande importance puisqu'il code pour trois suppresseurs de tumeurs activés en sénescence. Chez l'humain, il est localisé sur le chromosome 9 tandis qu'il se retrouve sur le chromosome 4 chez la souris^{189,190}. Il est constitué des gènes des inhibiteurs 2a et 2b des kinases cyclines-dépendantes (*CDKN2a* et *CDKN2b*, en anglais, pour *cyclin-dependent kinase inhibitor 2a* et *2b*) La présence du gène *ARF* n'a été découverte qu'en 1995 dans un cadre de lecture alternatif de *CDKN2a*, d'où son nom (*Alternative Reading Frame*)¹⁹¹.

Malgré le chevauchement des deux protéines de *CDKN2a*, le cadre de lecture fait en sorte qu'elles ne partagent pas d'homologie au niveau de leurs séquences d'acides aminés. Ainsi, les protéines ARF (aussi appelée p14 (humain) et p19ARF (souris) en fonction du poids moléculaire) et INK4a sont composées d'un premier exon spécifique à chacune, en partagent un deuxième malgré une forme légèrement tronquée pour ARF, et seule INK4a est constituée d'un troisième exon dont la majeure partie n'est pas transcrite (Figure 13). Pour sa part, la protéine INK4b (aussi p15INK4b) encodée par *CDKN2b* possède deux exons distincts de ceux de p16INK4a, mais partage tout de même une forte homologie avec cette dernière au niveau de sa séquence en acides aminés (Figure 13).

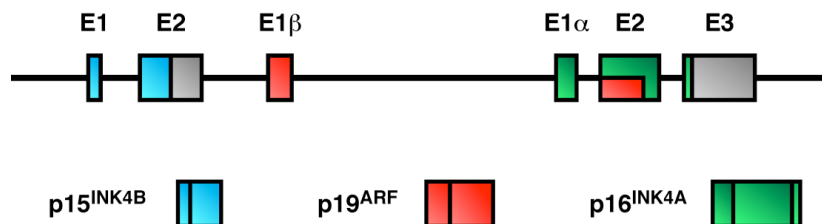


Figure 13: Représentation schématique du locus INK4b-ARF-INK4a

Les différents exons (E) codants pour p15^{INK4b} (en bleu), p19^{ARF} (en rouge) et p16^{INK4a} (en vert), ainsi que les régions non-transcrites (en gris) sont identifiés par des boîtes. Adapté de Gil et Peters ¹⁹².

La délétion des exons 2 et 3 de *CDKN2a* par manipulation génétique a permis au groupe de DePinho de développer un modèle murin invalidé simultanément pour les protéines p16 et p19 ¹⁹³. Les souris doubles mutantes sont viables, mais présentent une formation accrue de tumeurs spontanées et induites. En outre, alors que des cultures primaires de fibroblastes isolés de souris de type sauvage développent une OIS suite à une surexpression de l'oncogène Ras, ce même traitement résulte plutôt en une transformation néoplasique des fibroblastes isolés de souris invalidées pour p16 et p19. Ainsi, ce modèle est un atout majeur pour étudier plus en détails l'implication de ces deux suppresseurs de tumeurs dans la sénescence.

3.5.1. Le rôle de p16

L'accumulation de p16 est le résultat de l'activation du promoteur de *INK4a* par des facteurs de transcription tels que Ets2, qui peut lui-même être activé par la voie de

signalisation oncogénique de Ras ^{192,194}. On constate toutefois que la cinétique d'apparition de p16 est beaucoup plus lente que celle de la cascade de phosphorylation impliquant Ras. Certains expliquent ce délai par une activation séquentielle des voies d'induction de la sénescence; la voie de p16 prenant le relais de celle passant par p21 pour engager l'arrêt permanent de la cellule (Voir la section 3.4.2 pour une description de la voie impliquant p21). Les observations *in vitro* de Stein et collègues selon lesquelles p21 est augmentée, pour ensuite diminuer en concomitance avec une augmentation de p16 supportent cette théorie ¹⁹⁵. D'autres encore proposent que la cellule doive tenter de se diviser pour percevoir le dommage et activer la machinerie qui mènera ultimement à son entrée en sénescence. La vitesse de renouvellement des tissus/organes expliquerait ainsi pourquoi l'apparition de p16 est retardée *in vivo*. Bien que p16 soit considéré comme un excellent marqueur de sénescence, son délai d'apparition dans les tissus sénescents soulève un doute quant à sa responsabilité dans l'établissement du phénotype.

Nonobstant le manque d'information concernant le caractère initiateur ou de maintien de la sénescence de p16, sa voie d'induction est quant à elle bien définie (Figure 14). Ainsi, la transcription accrue de *INK4a* en réponse à un inducteur de sénescence entraîne l'accumulation de p16. Elle peut alors jouer son rôle de CDKi en liant les CDK 4 et 6 ¹⁹⁶. Ce faisant, le complexe CDK4/6-cycline D responsable de la progression de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire ne peut plus être formé. Le suppresseur de tumeur pRb ne peut donc pas être inactivé par phosphorylation et maintient son interaction avec le facteur de transcription E2F. Ainsi séquestré, E2F n'est pas en mesure de transloquer au noyau et d'activer la transcription de gènes importants pour le passage

en phase S ¹⁹⁷. Le suppresseur de tumeur p16 est donc capable de maintenir la cellule en phase G1, une des caractéristiques des cellules sénescents.

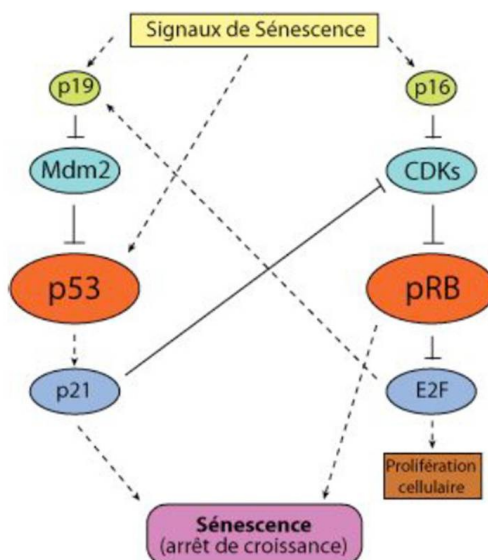


Figure 14: Voies de p16INK4a et p19ARF dans la sénescence

Mdm2, *mouse double minute 2*; CDKs, kinases cyclines-dépendantes; pRB, protéine rétinoblastome; E2F, facteur de transcription E2. Adapté de Campisi et d'Adda di Fagagna ¹⁰⁸

3.5.2. Le rôle de p19

La deuxième voie majeure d'induction de la sénescence a p53 comme acteur principal. Il s'agit d'un suppresseur de tumeur qui, une fois activé, agit à titre de facteur de transcription pour une multitude de gènes entre autres impliqués dans le blocage du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose ou celle de la sénescence. Au moins quatre de ces gènes sont fortement impliqués dans la sénescence et sont suffisants pour l'induire.

Parmi ceux-ci, la CDKi p21 peut se lier à plusieurs complexes cycline-CDK et inhiber leur activité kinase pour empêcher, tout comme p16, l'inactivation de pRb par phosphorylation¹⁹⁸⁻²⁰⁰. E2F demeure ainsi séquestré et ne peut pas activer la transcription des gènes essentiels au passage en phase S. L'activation de p53 passe principalement par sa stabilisation au niveau protéique. En effet, en condition normale, la protéine *mouse double minute 2* (Mdm2 ou Hdm2 pour la forme humaine) lie p53 et entraîne sa dégradation par le protéasome grâce à son activité ubiquitine E3 ligase^{201,202}. Lorsqu'un stress cellulaire entraîne la transcription du gène *CDKN2a*, la protéine p19 produite lie Mdm2 dans le nucléoplasme et inhibe sa capacité à ubiquitiner p53²⁰³. Elle peut également limiter leur interaction en séquestrant Mdm2 dans le nucléole²⁰⁴. Ainsi libéré, le domaine N-terminal de p53 peut être phosphorylé par différentes kinases dont le transducteur de signal Chk2 de la DDR¹⁷⁷.

médiateurs	fonction	rôle dans la sénescence
p16	CDKi	Inhibe CDK4/6, ce qui empêche l'hyperphosphorylation de pRb et maintient l'inactivation du facteur de croissance E2F
p19	CDKi	Lie Mdm2, ce qui empêche l'ubiquitination de p53 et sa dégradation par le protéasome Inhibe CDK4/6, ce qui empêche l'hyperphosphorylation de pRb et maintient l'inactivation du facteur de croissance E2F
p21	CDKi	Inhibe CDK4/6, ce qui empêche l'hyperphosphorylation de pRb et maintient l'inactivation du facteur de croissance E2F
p53	suppresseur de tumeurs	Entraîne l'accumulation de p21
pRb	suppresseur de tumeurs	Empêche l'activation du facteur de croissance E2F en s'y liant sous sa forme hypophosphorylée
Mdm2	ubiquitine E3 ligase	Ubiquitine p53, ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome

Tableau 2: Médiateurs impliqués dans la sénescence cellulaire

3.6. La sénescence *in vivo*

3.6.1. La mise en évidence

Les décennies ayant suivi la mise en évidence du phénomène de la sénescence ont été prolifiques au niveau de sa compréhension mécanistique, ceci par l'apport de multiples études *in vitro*. L'existence de la sénescence *in vivo* n'a cependant été rapportée qu'au cours des dernières années. Très vite, il a été constaté qu'il s'agissait en fait d'un mécanisme à deux facettes. D'un côté, la sénescence est bénéfique au maintien de l'organisme en limitant la progression tumorale ^{165,170,205,206}. On retrouve effectivement des marqueurs de sénescence dans de multiples lésions *in vivo*, incluant les naevi mélaniques (communément appelés «grains de beauté») ^{207,208}, les adénomes pulmonaires murins ²⁰⁹, les neurofibromes dermiques humains ¹³⁷, les adénomes prostatiques humains et murins ¹³⁸, les lymphomes murins ¹³⁹ et les mélanomes précoces murins ²¹⁰, mais jamais dans des tumeurs malignes. Le SASP peut aussi être responsable de certains bienfaits comme l'induction de la sénescence dans des cellules pré-cancéreuses ²¹¹.

Plusieurs études ont aussi démontré des effets délétères de la sénescence *in vivo*, entre autres par son implication dans le vieillissement ²¹²⁻²¹⁴. On observe en effet un nombre accru de cellules sénescents dans différents tissus capables d'auto-renouvellement (système vasculaire, système hématopoïétique, plusieurs organes épithéliaux, stroma) chez la souris, le primate et l'humain ^{205,212,215,216}. Toutefois, la présence de cellules sénescents n'a pas encore été démontrée au niveau des cellules stromales de la moelle osseuse. De plus, il a été démontré que la sénescence induite par une augmentation de l'expression de p16 dans les cellules souches et progénitrices du

cerveau, de la moelle osseuse et du pancréas lors du vieillissement entraîne une diminution de la neurogénèse, de l'hématopoïèse et de la fonction pancréatique²¹⁷⁻²¹⁹. Cette diminution de prolifération des cellules souches et de la régénération tissulaire est significativement retardée chez des souris génétiquement manipulées qui n'expriment pas p16. De façon non-surprenante, ces souris meurent prématurément des suites de cancers. On retrouve également une accumulation de cellules sénescents dans les tissus atteints par des maladies chroniques associées au vieillissement, telles que l'ostéoarthrite et l'athérosclérose²²⁰⁻²²³. D'ailleurs, il a été proposé que le caractère inflammatoire du SASP serait à l'origine d'une variété de maladies liées au vieillissement telles que l'athérosclérose et le cancer²²⁴. Le SASP a également plusieurs points communs avec le phénotype sécrétoire des fibroblastes impliqués dans le processus de guérison de plaie ou dans le stroma facilitant la progression de cancers épithéliaux²¹². Ainsi, étant donné la persistance des cellules sénescents dans les tissus, leur SASP pourrait contribuer au vieillissement et aux pathologies qui y sont associées en stimulant un remodelage chronique et/ou une inflammation locale pouvant compromettre l'intégrité fonctionnelle et structurelle des tissus. Enfin, le SASP peut affecter les cellules environnantes, par exemple, en causant la transformation de cellules prédisposées à la tumorigénèse^{211,212}.

3.6.2. L'élimination des cellules sénescents

Considérant les effets délétères que peut avoir la sénescence, il est pertinent de savoir si les cellules sénescents peuvent être éliminées *in vivo*. Pour ce qui est du vieillissement, il n'est pas exclus que les cellules sénescents le soient, mais la résultante

observée est une accumulation de ces cellules dans les tissus. Dans un modèle murin de carcinome du foie induit par l'inactivation de p53, la réinsertion de ce gène entraîne l'entrée en sénescence des cellules tumorales et l'établissement du SASP, mais plus étonnant, l'activation d'une réponse immunitaire ciblant les cellules tumorales¹⁴². Celles-ci sont entre autres éliminées par les cellules NK. Enfin, dans un modèle murin d'induction de la sénescence par l'IR, notre laboratoire a observé une régression du nombre de cellules sénescents. De plus, cet effet semble indépendant du système immunitaire adaptatif puisque la même cinétique est observée chez les souris $Rag2^{-/-} \gamma c^{-/-}$ caractérisées par une absence des cellules T, B et NK que chez les souris de type sauvage¹⁸². Il n'est pas étonnant que les cellules sénescents ne soient pas éliminées par les cellules NK dans ce modèle. En effet, ni les cellules irradiées ni les tissus sénescents provenant de souris irradiées n'expriment les ligands du récepteur NKG2D responsable de l'activité des cellules NK. Alternativement, il a été proposé que les neutrophiles et les macrophages qui sont présents et fonctionnels chez les souris $Rag2^{-/-} \gamma c^{-/-}$ pourraient être responsables de la clairance des cellules sénescents. En outre, aucune explication ne permet d'expliquer l'élimination partielle des cellules sénescents dans ce modèle.

En résumé, les informations contenues dans la section «Introduction» de cette thèse présentent les caractéristiques de l'os et des différentes populations cellulaires qui y résident, ainsi que les interactions cellulaires impliquées dans la régulation des fonctions hématopoïétiques. Le mécanisme de défense cellulaire qu'est la sénescence y est également décrit, incluant les inducteurs, les voies d'induction et les caractéristiques spécifiques aux cellules sénescents. D'ailleurs, une attention particulière est portée à l'induction par l'irradiation. Enfin, les implications de la sénescence *in vivo* sont abordées.

Ces différentes informations devraient permettre au lecteur d'apprécier l'intérêt ainsi que les conclusions du travail expérimental effectué dans le cadre de cette thèse dont l'objectif est d'étudier les effets du phénotype de sénescence des cellules stromales de la moelle osseuse sur les fonctions hématopoïétiques.

CHAPITRE II

ARTICLES

4.0. L'EXPRESSION DE INK4A/ARF INDUITE PAR L'IRRADIATION DANS DES POPULATIONS DE CELLULES STROMALES DE LA MOELLE OSSEUSE DE SOURIS INTERFÈRE AVEC L'HOMÉOSTASIE DE LA MOELLE OSSEUSE

4.1. Mise en contexte

La chimiothérapie, le vieillissement et des manipulations génétiques de la longueur des télomères altèrent le microenvironnement de la moelle osseuse. Toutefois, la capacité de ces stimuli à induire la sénescence des cellules stromales de la moelle osseuse n'est pas connue. Cette étude est la première à démontrer que l'irradiation induit l'expression de marqueurs de sénescence dans les cellules stromales de la moelle osseuse. Elle met également en évidence une sensibilité distincte des différentes populations de cellules stromales à l'irradiation. Enfin, elle révèle une altération cellulaire non-autonome et dépendante de *ink4a/arf* de l'irradiation sur la lymphopoïèse B.

4.2. Contribution des auteurs

CLC a fait le design expérimental, a réalisé les expériences, a analysé les données et a écrit la première version du manuscrit. GD a participé à la réalisation des expériences *in vivo*, à l'interprétation des résultats et au design expérimental. SRS a réalisé et analysé les expériences de cytométrie en flux associées aux essais de reconstitution hématopoïétique. AF a participé à la réalisation de données préliminaires pour les expériences de homing, OL a participé à la réalisation des expériences *in vivo*. TH a participé à l'interprétation des résultats et à la rédaction de la version finale du manuscrit. CMB a participé au

design expérimental, à l'interprétation des résultats et a écrit la version finale du manuscrit.

4.3. Référence

Carbonneau CL, Despars G, Rojas-Sutterlin S, Fortin A, Le O, Hoang T and Beauséjour CM. Ionizing radiation-induced expression of INK4a/ARF in murine bone marrow-derived Stromal cell populations interferes with bone marrow homeostasis. *Blood*. 2012;119(3):717-26. PMID: 22101896. © The American Society of Hematology.

Ionizing radiation-induced expression of INK4a/ARF in murine bone marrow-derived stromal cell populations interferes with bone marrow homeostasis

Running head: A role for INK4a/ARF in bone marrow stroma post-IR

Cynthia L. Carbonneau^{1,2}, Geneviève Despars^{1,2}, Shanti Rojas-Sutterlin³, Audrey Fortin^{1,2}, Oanh Le^{1,2}, Trang Hoang^{2,3} and Christian M. Beauséjour^{1,2}

¹ Centre de recherche du CHU Ste-Justine, ² Département de pharmacologie, ³ Institut de recherche en immunologie et cancer, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

*Correspondence: Christian M. Beauséjour

Counts: abstract (189 words), manuscript: (5257 words), figures (6), table (1), references (45).

4.4. Abstract

Alterations of the bone marrow microenvironment have been shown to occur after chemoradiotherapy during aging and following genetic manipulations of telomere length. Still, whether marrow stromal cells are adopting senescent features in response to these events is unknown. Here, we show evidence that exposure to ionizing radiation (IR) leads murine stromal bone marrow cells to express senescence markers, namely senescence-associated β -galactosidase and increased p16^{INK4a}/p19^{ARF} expression. Long-term (8 weeks) after exposure of mice to IR, we observed a reduction in the number of stromal cells derived from bone marrow aspirates (referred as BM-SC) an effect we found was absent in irradiated *ink4a/arf* knockout mice and mostly independent on the colony forming unit potential of the stroma. Such reduction in the number of BM-SC was specific as stromal cells isolated from collagenase treated bone (referred as OB-SC) were not reduced post IR. Surprisingly, we found exposure to IR leads to a cellular non-autonomous and *ink4a/arf* dependent effect on lymphopoiesis. Overall, our results reveal distinct sensitivity of marrow stromal cell populations to IR and suggest that long-term residual damage to the bone marrow microenvironment can influence hematopoiesis in an *ink4a/arf* dependent manner.

Key words: stromal cells, bone marrow microenvironment, irradiation, senescence, p19^{ARF}, p16^{INK4a}

4.5. Introduction

Exposure to ionizing radiation (IR) or high-dose chemotherapy leads to long-term residual damage of hematopoietic stem cells (HSC) ¹⁻³. Not surprisingly, IR also induces damage to the bone marrow microenvironment reducing by as much as 90% the colony forming units (CFU) capacity of stromal cells ⁴⁻⁶. Reduction in the number of mitotically competent stromal progenitor cells is likely permanent, as CFU capacity does not fully recover for at least several months/years after transplantation ^{4,5,7}. It is not known whether irradiated bone marrow stromal cells are eliminated and then only partly regenerated, or whether they adopt a senescent phenotype within the marrow niche. Indeed, exposure to DNA damaging agents has been shown to induce senescence of several cell types both in vitro and in vivo ^{3,8-10}. Hematopoietic progenitors isolated from irradiated mice have also been shown to express senescence markers such as p16^{INK4a} ³. Hence, we hypothesized that marrow stromal cells could adopt senescent features and lose their regenerative potential in a p16^{INK4a} dependent manner, post-exposure to IR.

Various stimuli, most of which by inducing DNA damage, have the potential to induce senescence ^{8,11-13}. Common features of the senescent phenotype include permanent loss of proliferation potential and in most cases the expression of senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) ^{14,15}. p16^{INK4a} is an important regulator of senescence and arguably represents the most robust marker for *in vivo* detection of senescent cells ¹⁶⁻¹⁹.

p16INK4a and *p19ARF* are two distinct tumor suppressor genes that originate from the *ink4a/arf* locus (also called *CDKN2a/b*). p16^{INK4a} is a cyclin-dependent kinase inhibitor whose expression increases with age. By inhibiting the cyclin dependent kinase

4 , it ultimately prevents the phosphorylation of Rb²⁰. p19^{ARF}, through its ability to inhibit the MDM2 protein, acts as an activator of p53²¹. Hence, both proteins are direct effectors of cellular senescence by preventing cell cycle progression.

There are numerous studies supporting the importance of the stromal microenvironment in the success of bone marrow transplantation. For example, old mice were shown to be deficient in supporting engraftment of HSC when compared to younger animals, suggesting an important role for the bone marrow microenvironment in the engraftment process²². Similarly, genetically-induced telomere dysfunction leading to microenvironmental alterations of the bone marrow niche was also shown to limit the function and engraftment of HSC²³. Likewise, the bone marrow stromal niche from *Fancg*^{-/-} mice that are impaired in their ability to support adhesion and engraftment of hematopoietic progenitors can be rescued by the injection of stromal cells isolated from wild-type mice²⁴. These examples strongly point to a very important role for the bone marrow stroma in hematopoiesis.

In this study, we aimed to determine if exposure to IR induces senescent features within the bone marrow stromal compartment and whether this could affect its functions as a niche. Our results provide the first evidence for a cellular non-autonomous role of *ink4a/arf* in regulating lymphopoiesis and reveal a distinct sensitivity of stromal cell populations, either marrow or bone-derived, to IR-induced long-term residual damages.

4.6. Materials and Methods

4.6.1. Mice

Eight to 12 week-old female C57BL/6J or B6.SJL-P^{trc}aPep3^b/BoyJ mice were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). *Ink4a/arf*-null mice on a C57BL/6J background were bred on site under a Material Transfer Agreement from the National Cancer Institute Mouse Models of Human Cancers Consortium (strain code 01XB1). All mice were allowed to acclimate at least one week prior to their use for experimentation. All *in vivo* manipulations were approved by the Comité Institutionnel des Bonnes Pratiques Animales en Recherche of CHU Ste-Justine (protocol number S10-32).

4.6.2. Isolation, purification and characterization of stromal cells

Bone marrow was collected by flushing tibias, femurs and iliacs from C57BL/6J mice in phosphate buffer solution. Cleaned bones were next cut in small fragments of 1-2mm and digested for 45 minutes with 0.25% collagenase type 1 (Sigma, St Louis, MO). For *in vitro* experiments, bone marrow-derived stromal cells (BM-SC) and bone-derived osteoblast-like stromal cells (OB-SC), derived from bone marrow or bone chips respectively, were isolated based on their property to attach to polystyrene following culture for 7 days in α -MEM containing 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. Stromal populations were then expanded for 2-4 passages (corresponding to 4-12 population doublings) in 3% oxygen and their phenotype confirmed by flow cytometry using the following antibodies: Ter119, CD31, CD45, CD44, CD90 and CD105, all purchased from BioLegend (SanDiego, CA). Otherwise, stromal cell populations were isolated using the EasySep® negative selection kit for

mesenchymal progenitors (StemCell Technologies, Vancouver, BC) or sorted by flow cytometry using the above described antibodies at a purity of 80-90% for BM-SC and 99% for OB-SC. Adipocytic and osteogenic differentiation potentials of stromal cell populations were determined as previously described ²⁵.

4.6.3. Cell proliferation, SA- β -gal detection and BrdU incorporation

To assess cell proliferation, stromal cells were plated at a density of 7 000 cells per square centimeter and population doubling was evaluated after each cell passage (every 3-4 days). Where indicated, trypsinized cells were induced to senesce by exposure to 10 Grays (Gy) irradiation (using a Gammacell 220 and cobalt-60 as a source) without any interference on their ability to re-adhere to the culture dish. SA- β -gal detection was performed *in vitro* as previously described by Dimri *et al.* ¹⁵. Briefly, cells were fixed and staining was made at pH 5.0 for 16 hours at 37°C 10 days after exposure or not to 10 Gy irradiation. Cell cycle progression into S-phase, as determined by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation, was performed by pulsing cells over a three-day period ending on day 10 following IR, with 10 μ M BrdU (Roche, Laval, QC) and by subsequent immunodetection using an antibody specific for BrdU (mouse monoclonal conjugated to fluorescein isothiocyanate, clone BMC 9318, Roche). The proportion of BrdU⁺ cells over the total number of cells was determined by counting cells manually in random fields seen under the microscope.

4.6.4. RNA isolation and Real time quantitative PCR

RNA was extracted from stromal cell populations using the RNeasy® Mini or Micro Kit (Qiagen, Mississauga, ON). RNA was reverse-transcribed using the QuantiTect Reverse

Transcription Kit (Qiagen). Quantitative differences in gene expression were determined by real-time quantitative PCR using SensiMixTM SYBR Low-ROX (Quantace, Taunton, MA) and the MxPro QPCR software (Stratagene, Mississauga, ON). Primers used for the amplification of p16^{INK4a}, p19^{ARF}, runx2, sp7, opn, bglap, ibsp and 18S rRNA are available in Table 1 within the supplementary result section. Values are presented as the ratio of target mRNA to 18S rRNA, obtained using the relative standard curve method of calculation.

4.6.5. Colony-forming unit (CFU)

CFU were determined by plating $2-5 \times 10^6$ cells collected from bone marrow aspirate or $2-5 \times 10^5$ cells from collagenase-treated bones in 6 well dishes and allowing them to grow in α -MEM containing 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin in a fully humidified atmosphere with 6% CO₂ and 3% O₂ at 37°C. Media was changed seven days after culture was initiated and cells were fixed with 0.5% methylene blue in 50% methanol on day 14. Cell clusters visible to the naked eye (corresponding approximately to at least 50 stromal cells) were scored as a CFU colony. Of note, femoral bone marrow aspirates were processed independently and analyzed as replicates (n=2) for each mouse, whereas cleaned bones from a single mouse were pooled together prior to the collagenase treatment.

4.6.6. Homing

Wild-type (WT) and *ink4a/arf*-deficient mice were exposed or not to a unique sublethal dose of 6 Gy total body irradiation and eight weeks post-exposure to IR, 5×10^6 nucleated bone marrow cells stained according to the manufacturer instructions with 0.5 μ M

carboxyfluorescein succinimidyl ester (Invitrogen, Burlington, ON) were injected into the tail vein without further irradiation. 16 hours post-injection, recipient mice were sacrificed and femoral bone marrow harvested for flow cytometry analysis of the absolute number of CFSE⁺ cells per femur using CountBright™ absolute counting beads (Invitrogen).

4.6.7. Hematopoietic reconstitution assays

For long-term hematopoietic reconstitution, 2 months-old Ly 5.2/CD45.2 wild-type mice were first exposed or not to 6 Gy total body irradiation and allowed to recover for up to 11 months without bone marrow transplantation. Proportion of B (B220-FITC, clone RA3-6B2, Biolegend) and myeloid (CD11b-APC, clone M1/70, Biolegend) cells were evaluated at 3 and 11 months following irradiation. Mice were then sacrificed and 2×10^6 unfractionated bone marrow cells collected from wild-type mice exposed or not to IR 11 months ago were transplanted into Ly 5.1/CD45.1 lethally irradiated (10Gy) recipient mice. Proportion of donor-derived B and myeloid cells were determined in recipient mice 3 months following transplantation. For short-term engraftment assays, 2×10^6 unfractionated bone marrow cells obtained from Ly 5.1/CD45.1 wild-type donor mice were injected into the tail vein of Ly 5.2/CD45.2 wild-type or *ink4a/arf*-deficient recipient mice exposed or not to 6 Gy total body irradiation 8 weeks prior to transplantation. Mice were sacrificed 2 weeks post-transplantation and blood, bone marrow and spleen were analyzed by flow cytometry using the following antibodies: B220-biotinylated, Pe-Cy5 or -FITC (clone RA3-6B2), CD3-biotinylated or -FITC (clone 145-2C11), CD11b-biotinylated, -APC or -FITC (clone M1/70), Sca-1-PE-Cy7 (clone

D7), CD19-PerCP-Cy5.5 (clone eBio1D3), IL-7R-Pe-Cy5 (clone B12-1), (Becton Dickinson), Thy1.2-FITC (clone 30-H12), FcεRIα-biotinylated or -FITC (clone MAR-1), Gr-1-biotinylated, -Pe-Cy7 or -FITC (clone RB6-8C5), Ter119-biotinylated or -FITC (clone TER-119), c-Kit-PE-Cy5.5 or -APC (clone 2B8), CD48-APC (clone HM48-1), streptavidin-eFluor710 (# 49-4317-82) (eBioscience), CD150-PE-Cy5 (clone TC15-12F12.2), CD45.1-PE (clone a20) (Biolegend).

4.6.8. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with the Graph Pad 5.0 software using unpaired Student *t* test. Results were considered statistically significant with *p* values < 0.05.

4.7. Results

4.7.1. Exposure to IR induces p16^{INK4a}/p19^{ARF} expression in distinct bone marrow stromal cell populations

Previous studies suggest that murine marrow stromal cells are not eliminated post-IR^{6,7}, making it conceivable that these cells adopt a senescent phenotype in response to DNA damage. To verify this hypothesis, we subjected C57BL/6J mice to total body irradiation at the sublethal dose of 6 Gy and analyzed their bone marrow stromal cells for the induction of senescence markers, namely p16^{INK4a} and p19^{ARF}. We chose this dose as it was previously shown to induce senescence markers in other mouse tissues, and because it does not require bone marrow transplantation for 100% of the mice to survive the irradiation²⁶. Using a two-step extraction procedure (Fig. 1A) we purified stromal cell populations from mice femurs and measured p16^{INK4a} and p19^{ARF} expression levels. The

bone marrow was first flushed from bones, and stromal cells within this fraction identified as bone marrow stromal cells (BM-SC). Flushed bones were then treated with collagenase, and stromal cells in this fraction were referred to as osteoblast-like stromal cells (OB-SC). In both cases, stromal cell populations were negative for CD45, Ter119, CD31 and 7-AAD and purified either by magnetic columns or flow cytometry cell sorting. Phenotypical, molecular and functional characterization of these stromal cells confirmed the purification of distinct populations. Indeed, phenotypic characterization revealed that BM-SC were CD90^{dim} and CD105^{bright} whereas OB-SC contained a mixture of cells that were either CD90^{dim or bright} and CD105^{negative or dim} (Fig. 1C). Moreover, these populations were functionally different as only BM-SC were able to differentiate into adipocytes upon adipocytic induction (Fig. 1D). Finally, only OB-SC expressed relatively high mRNA levels of *runx2*, *sp7* (encoding transcription factors) and *opn*, *bglap* and *ibsp* (encoding bone extracellular matrix proteins), which are all associated to the osteoblastic phenotype. In comparison, BM-SC did not or only weakly express these genes (Fig. 1E).

In contrast, p16^{INK4a} expression levels were found to be increased in both populations post-IR, although at a much higher level in OB-SC compared to BM-SC (9.5 vs 2.5-fold respectively). However, only BM-SC had a significant 4-fold increase in p19^{ARF} levels (Fig. 1F). Intriguingly, the expression of p16^{INK4a} and p19^{ARF} was not increased immediately after IR (data not shown) but rather only 6-8 weeks later, a phenotype reminiscent of what we previously observed in other irradiated mouse tissues^{13,26}. These results demonstrate that stromal cells populations derived from the bone marrow microenvironment activate senescence markers upon IR-induced DNA damage *in vivo*.

4.7.2. IR-induced senescence of bone marrow stromal cells is *ink4a/arf* dependent

p16^{INK4a} and p19^{ARF} are well established senescence markers²⁷. However, because their expression is delayed post damage, it is unclear whether or not their expression is causative of the senescence phenotype, and thus if inhibition of their expression would be sufficient to prevent IR-induced senescence. To address these questions, we purified stromal cell populations from wild-type and *ink4a/arf* knockout mice and evaluated their susceptibility to undergo cellular senescence following exposure to IR *in vitro*. We observed a striking difference in the growth rate of wild-type vs *ink4a/arf*-null OB-SC under steady-state conditions, and following exposure to IR. In fact, while cells derived from *ink4a/arf*-null mice resumed proliferation after a short (~5-7 days) interruption post-exposure to IR, cells isolated from wild-type mice did not (Fig. 2A). Such transient inhibition in the growth rate of *ink4a/arf*-deficient stromal cells immediately after IR is not surprising, as these cells have intact and presumably functional DNA damage checkpoints.

BrdU incorporation studies and SA- β -gal stainings confirmed that senescence induction was specific to stromal cells derived from wild-type mice (Fig. 2B-C). Indeed, 10 days after exposure to IR, only irradiated wild-type stromal cells had a flattened morphology and exhibited accumulation of SA- β -gal, two characteristics that were absent in irradiated *ink4a/arf*-deficient stromal cell cultures. A 3-day BrdU pulse confirmed this enhanced growth arrest in irradiated wild-type stromal cells, in contrast to stromal cells isolated from knockout animals (34% vs 91% BrdU⁺ nuclei respectively). These data

demonstrate that IR-induced senescence of OB-SC is dependent on *ink4a/arf*, at least *in vitro*.

4.7.3. Cellularity of marrow stroma post-IR is dependent on stromal cell type and *ink4a/arf* status

We next determined the impact of IR on marrow stromal cells *in vivo* by evaluating the absolute number of BM-SC and OB-SC present per femur post-exposure to IR. Using fluorescently labeled beads and flow cytometry, we found that the number of BM-SC per femur was reduced long-term (8 weeks) post-IR compared to the number found in control non-irradiated femurs. This is in contrast to OB-SC and hematopoietic (CD45+) cell populations, where numbers were not reduced during that same period (compare Fig. 3A with 3B-C). This depletion in the number of BM-SC long-term post-IR was not observed in *ink4a/arf*-deficient mice (Fig. 3D). Of interest, we also observed that the number of BM-SC is not reduced 1 week post-IR (Fig. S1), which is in accordance with the fact that p16^{INK4a} and p19^{ARF} expressions were not increased until several weeks after IR. These results reveal a difference in sensitivity to IR between OB-SC and BM-SC populations and suggest that long-term maintenance of the BM-SC population is compromised in irradiated wild-type mice, an effect that can be reversed by the loss of *ink4a/arf*.

Similarly, we also determined if the expression of p16^{INK4a} and p19^{ARF} had an impact on the CFU potential of BM-SC and OB-SC populations isolated from the femurs of wild-type and *ink4a/arf*-deficient mice exposed or not to IR. We found the number of CFU to be only modestly reduced long-term (8 weeks) post-IR in both BM-SC and OB-SC populations (p=0.23 and p=0.06 respectively), an effect that appeared to be *ink4a/arf*-

dependent (Fig. 4). Altogether these results suggest the ability to form CFU *ex vivo* post-IR may not be linked to the capacity to maintain stromal cells *in vivo*.

4.7.4. Ink4a/arf expression does not interfere with homing and engraftment processes

Shortly after irradiation, homing to the bone marrow of hematopoietic cells was severely compromised (see Fig. S2), consistent with results published by Collis *et al* 28. Yet, to address the question whether damage induced by IR can hamper long-term homing, recipient mice were irradiated 8 weeks prior to the transplantation of fluorescently-labeled bone marrow cells (see Fig. 5A). In addition, we assessed the role of p16^{INK4a} and p19^{ARF} in this process and found that their expression within the bone marrow stroma and the consequent reduction in the size of the BM-SC population did not interfere with homing long-term post-IR (Fig. 5C). Similarly, we observed that IR-induced residual damage had no or little impact on engraftment in wild-type recipient mice in both marrow and blood (Fig. 5D). However, engraftment was found significantly decreased in *ink4a/arf*-null mice that had not been exposed to IR 8 weeks prior to transplantation. This effect likely stems from the higher replicative potential of *ink4a/arf*-null hematopoietic progenitors, an advantage they seem to have lost long-term after exposure to IR. In support of our observation that engraftment, at least short term, is not reduced by long-term residual damage induced by IR, we have found the number of donor derived putative stem cells (Lin⁻, Sca-1⁺, c-Kit⁺, CD150⁺, CD48⁻) in the marrow to be equivalent in all groups of mice (Fig. 5E).

4.7.5. IR-induced damage alters lymphopoiesis in a cellular non-autonomous and *ink4a/arf* dependent manner

We next determined if exposure to IR and expression of *ink4a/arf* could interfere with long term hematopoietic reconstitution. We therefore monitored the hematopoietic profiles of mice up to 11 months following exposure to sublethal irradiation (Fig. 6A). As expected, *ink4a/arf*-null mice exposed to IR developed lymphoma starting about 3 months post-IR while wild-type mice remained cancer free for the time of the study (data not shown). Yet, wild-type mice showed a drastic reduction in the numbers of circulating B cells (identified as B220⁺) 11 months post-exposure to IR (Fig. 6A). Reduction in the proportion of B cells was accompanied by an increased myeloid (CD11b⁺) fraction (Fig.S3). This endogenous recovery did not allow us to distinguish between a cell autonomous or microenvironment-dependent effect on the B lineage. To address this question, we transplanted marrow from mice previously exposed or not to IR (11 months groups) into recipient mice (Fig. 6A). We found that the proportion of circulating B cells derived from irradiated donors and non-irradiated donors were comparable in transplanted recipients (Fig. 6A). These results suggest that reduction in B cell lymphopoiesis was mostly dependent on the effect of IR on the microenvironment.

Hence, IR-induced long-term residual damage did not affect homing and overall engraftment although circulating B cells are impaired. We therefore monitored whether common lymphoid progenitors (CLP defined as Lin⁻, Sca-1^{dim}, c-Kit^{dim}, IL7R⁺)²⁹ may be affected by IR. The absolute number of donor derived CLP was not found diminished in the bone marrow of mice exposed to IR 8 weeks prior to the transplant (Fig. 6B)

whereas numbers of CLP in the spleen were significantly reduced, a phenotype that was also associated with a reduction in the number of B220⁺ cells (Fig. 6B-C). This effect was specific to the B lineage as the absolute counts of CD3⁺ cells were not significantly changed (Fig. S4). Remarkably, reduction in the number of CLP was not observed in previously irradiated *ink4a/arf*-null mice (Fig. 6B), but rather significantly increased, suggesting that *ink4a/arf* expression impairs B cells homeostasis in a cell non-autonomous manner. Further supporting these findings, we also performed secondary transplantations using irradiated wild-type and *ink4a/arf*-null mice primary donor mice. We found that only a transient (2 weeks) exposure of progenitors to an irradiated wild-type, but not *ink4a/arf*-null, microenvironment was sufficient to decrease B cell formation in secondary recipient mice (see Fig. S5).

4.8. Discussion

Long-term residual damage induced by total body irradiation is a growing medical concern with many cancer survivors showing treatment-related late effects^{30,31}. In the context of bone marrow transplantation, radiation-based conditioning is suspected to impair hematopoiesis and to have an impact on the success of the graft itself by inducing damage to the bone marrow stroma. Indeed, the importance of the stromal compartment as a niche for HSC has been demonstrated in several ways, for example following genetic manipulations regulating the osteoblastic pool size³². Likewise, co-transplantation of marrow-derived stromal cells along with HSC can be performed safely in humans and has been shown to improve engraftment in both humanized mouse and nonhuman primate models³³⁻³⁵. The extent and the nature by which the marrow stroma is damaged post-IR

remain elusive. We here provide evidence that bone marrow stromal cells populations express markers of senescence in response to IR and we also identified for the first time a cellular non-autonomous role for *ink4a/arf* in mediating IR-induced long-term residual damages to the hematopoietic stroma.

Notably, we have found the expression of p16^{INK4a} to increase after exposure to IR in both BM-SC and OB-SC stromal cell populations albeit at a much higher level in the latter. Conversely, p19^{ARF} expression, which is believed to be primarily induced following the oncogenic disruption of the cell cycle, was only increased within the BM-SC population following irradiation (Fig. 1E)³⁶. We hypothesize that p19ARF expression could be induced as a tumor suppressive mechanism specifically in BM-SC given that these cells, by acting as progenitors for OB-SC³⁷, are likely to undergo more cell divisions and therefore accumulate oncogenic mutations at a higher frequency.

One consequence of increased p16^{INK4a} expression with age is a decrease in tissue regenerative potential at the progenitor/stem cell level³⁸⁻⁴⁰. Hence, one could expect that IR-induced p16^{INK4a} expression could also result in a regenerative defect in marrow stromal cell progenitors. Indeed, 8 weeks post-exposure to IR, we observed a significant reduction in the number of BM-SC present per femur (Fig. 3A). Surprisingly, this defect was specific to BM-SC; it was not observed in the OB-SC population, which yet expressed high levels of p16^{INK4a} (Fig. 1E). We believe the inability to maintain BM-SC may arise from the fact that these cells, by acting as progenitors for OB-SC³⁷, are facing a higher replicative pressure and consequently a potential exhaustion. Along with this hypothesis, we could detect an increase in the expression of several genes specific to the osteoblastic lineage in BM-SC isolated 8 weeks after exposure of mice to IR, suggesting

the commitment of BM-SC progenitors towards differentiation in response to damage (Fig. S6). Alternatively, maintenance of the OB-SC population may be explained from the work of Dominici and colleagues who showed that osteoblasts can be regenerated by megakaryocytes migrating to the endosteal surface shortly after radioablation ⁴¹.

Intriguingly, the ability of BM-SC and OB-SC populations to form CFU was only slightly reduced long-term post-IR despite high expression levels of p16^{INK4a}/p19^{ARF} in these populations. These results were unexpected given that others had shown IR-induced reduction in the CFU of bone marrow stromal cells up to several months/years in mice and humans respectively ^{4,5}. We believe such discrepancies may be attributed to species and strain differences, a hypothesis supported by the work of Rombouts and Ploemacher ⁷. Our results also entail that stromal cells expressing p16^{INK4a}/p19^{ARF} are likely not to be found within the sub-population of cells with CFU potential. However further refinement in the identification of positive markers specific for these cells will be necessary to verify this hypothesis. For example, Méndez-Ferrer and colleagues showed a direct relationship between homing and the proportion of Nestin⁺ bone marrow stromal cells, a population they have identified as having strong CFU capabilities ⁴².

We also noticed a reduction in the proportion of circulating B cells in irradiated mice, a phenotype reminiscent of what is observed in aged mice ^{43,44}. In fact, during the course of our 11 months study, we observed a reduction in the size of the B cells population in non-irradiated mice (compare control groups at 3 and 11 months, Fig. 6A), a reduction that was much less severe than in mice previously exposed to IR. Such slow progression of the phenotype in blood made it impossible to address the role of *ink4a/arf*, knockout mice developing lymphoma within only few months after exposure to IR.

Nevertheless, using groups of mice previously exposed or not to IR and subsequently transplanted, we could identify an important role of the microenvironment in B cell lymphopoiesis. Analysis of donor derived CLP revealed a profound reduction in the spleen, but not in the marrow, 2 weeks post-transplantation, the latest time point at which mice were analysed before *ink4a/arf*-null mice developed lymphoma (Fig. 6C). Because we did not analyse the number of lymphoid progenitors in the marrow of wild-type mice more than 10 weeks after their exposure to IR, it remains to be determined if a reduction in the number of CLP in spleen is sufficient to induce a reduction in the number of circulating B cells or if a reduction in the number of CLP in the marrow is eventually required for the phenotype to develop in blood. Nonetheless, we found a 2 weeks exposure to an irradiated microenvironment was sufficient to decrease B cell formation in secondary transplanted mice, an effect that was also INK4a/ARF dependent. We hypothesised that such a profound and long-lasting impact on B cell formation may arise from the action of the recently characterized senescence associated secretory phenotype which may be sustained by the expression of INK4a/ARF^{9,45}. Obviously more work remains to be done as to understand how exactly the microenvironment is influencing lymphoid progenitors.

It is reasonable to predict that bone marrow conditioning protocols that induce less damage to the hematopoietic niche may have a lesser impact on the long-term. To begin addressing this idea, we tested whether increase in p16^{INK4a} expression, used as a marker of damage to the niche, is proportionally linked to the intensity of the irradiation dose or the type of drug used. We found that both low dose IR (2.5 and 5 Gy) and administration of busulfan (35 mg/kg, the highest tolerated dose) resulted in an increase

in p16^{INK4a} expression at levels similar to the ones observed following exposure to 8 Gy of IR (data not shown). This suggests either that the increase in p16^{INK4a} expression does not correlate with the intensity of the damage induced or that low levels of damage are sufficient to harm the marrow stroma. In conclusion, future efforts should be put into identifying drugs and conditioning regimen therapies that will aim to better maintain the stromal niche.

4.9. Acknowledgements

We would like to thank Vimal Krishnan for his critical reading of the manuscript and Denise Carrier for her help with mice. This work was supported by a grant from the Canadian Institute of Health Research (MOP-102709) (C.M.B.) and from the Canadian Cancer Society Research Institute (019222) (T. H.). S.R.S. and G.D. have been supported by a student fellowship from the FRSQ. C.L.C., A.F. and C.M.B. have been supported, respectively, by a student fellowship from the CIHR, the Fondation des étoiles and a scientist award by the FRSQ.

4.10. Authorship

Contribution: CLC, GD and CMB conceived and designed the experiments; CLC, GD, SRS, AF and OL performed the experiments; CLC, GD, SRS, TH and CMB analyzed the data; CLC, TH and CMB wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

4.11. References

1. Harrison DE, Astle CM, Delaittre JA. Loss of proliferative capacity in immunohemopoietic stem cells caused by serial transplantation rather than aging. *J Exp Med.* 1978;147(5):1526-1531.
2. Testa NG, Hendry JH, Molineux G. Long-term bone marrow damage in experimental systems and in patients after radiation or chemotherapy. *Anticancer Res.* 1985;5(1):101-110.
3. Wang Y, Schulte BA, LaRue AC, Ogawa M, Zhou D. Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. *Blood.* 2006;107(1):358-366.
4. Galotto M, Berisso G, Delfino L, et al. Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Exp Hematol.* 1999;27(9):1460-1466.
5. Piersma AH, Brockbank KG, Ploemacher RE, Ottenheim CP. Recovery of hemopoietic stromal progenitor cells after lethal total-body irradiation and bone marrow transplantation in mice. *Transplantation.* 1985;40(2):198-201.
6. Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, et al. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med.* 2009;206(11):2483-2496. Prepublished on 2009/10/21 as DOI jem.20091046 [pii] 10.1084/jem.20091046.
7. Rombouts WJ, Ploemacher RE. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia.* 2003;17(1):160-170.
8. Meng A, Wang Y, Van Zant G, Zhou D. Ionizing radiation and busulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells. *Cancer Res.* 2003;63(17):5414-5419.
9. Coppe JP, Patil CK, Rodier F, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 2008;6(12):2853-2868. Prepublished on 2008/12/05 as DOI 08-PLBI-RA-2566 [pii] 10.1371/journal.pbio.0060301.
10. Hong EH, Lee SJ, Kim JS, et al. Ionizing radiation induces cellular senescence of articular chondrocytes via negative regulation of SIRT1 by p38 kinase. *J Biol Chem.*

2010;285(2):1283-1295. Prepublished on 2009/11/06 as DOI M109.058628 [pii] 10.1074/jbc.M109.058628.

11. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*. 2006;444(7119):633-637.
12. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*. 2003;426(6963):194-198.
13. Robles SJ, Adami GR. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene*. 1998;16(9):1113-1123.
14. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(9):729-740.
15. Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A novel biomarker identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:9363-9367.
16. Collado M, Gil J, Efeyan A, et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*. 2005;436(7051):642.
17. Gray-Schopfer VC, Cheong SC, Chong H, et al. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *Br J Cancer*. 2006;95(4):496-505.
18. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*. 2005;436(7051):720-724.
19. Ressler S, Bartkova J, Niederegger H, et al. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell*. 2006;5(5):379-389.
20. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999;13:1501-1512.
21. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, et al. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*. 1998;92(6):713-723. Prepublished on 1998/04/07 as DOI S0092-8674(00)81400-2 [pii].
22. Liang Y, Van Zant G, Szilvassy SJ. Effects of aging on the homing and engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2005;106(4):1479-1487.

23. Ju Z, Jiang H, Jaworski M, et al. Telomere dysfunction induces environmental alterations limiting hematopoietic stem cell function and engraftment. *Nat Med.* 2007;13(6):742-747.
24. Li Y, Chen S, Yuan J, et al. Mesenchymal stem/progenitor cells promote the reconstitution of exogenous hematopoietic stem cells in Fancg^{-/-} mice in vivo. *Blood.* 2009;113(10):2342-2351. Prepublished on 2009/01/09 as DOI blood-2008-07-168138 [pii] 10.1182/blood-2008-07-168138.
25. Benabdallah BF, Allard E, Yao S, et al. Targeted gene addition to human mesenchymal stromal cells as a cell-based plasma-soluble protein delivery platform. *Cytotherapy.* 2010;12(3):394-399. Prepublished on 2010/03/25 as DOI 10.3109/14653240903583803.
26. Le ON, Rodier F, Fontaine F, et al. Ionizing radiation-induced long-term expression of senescence markers in mice is independent of p53 and immune status. *Aging Cell.* 2010;9(3):398-409. Prepublished on 2010/03/25 as DOI ACE567 [pii] 10.1111/j.1474-9726.2010.00567.x.
27. Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest.* 2004;114(9):1299-1307.
28. Collis SJ, Neutzel S, Thompson TL, et al. Hematopoietic progenitor stem cell homing in mice lethally irradiated with ionizing radiation at differing dose rates. *Radiat Res.* 2004;162(1):48-55.
29. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell.* 1997;91(5):661-672. Prepublished on 1997/12/11 as DOI S0092-8674(00)80453-5 [pii].
30. Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, et al. Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med.* 2006;355(15):1572-1582.
31. Geenen MM, Cardous-Ubbink MC, Kremer LC, et al. Medical assessment of adverse health outcomes in long-term survivors of childhood cancer. *JAMA.* 2007;297(24):2705-2715.
32. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 2003;425(6960):841-846. Prepublished on 2003/10/24 as DOI 10.1038/nature02040 nature02040 [pii].

33. Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS, et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol*. 2002;30(8):870-878.
34. Masuda S, Ageyama N, Shibata H, et al. Cotransplantation with MSCs improves engraftment of HSCs after autologous intra-bone marrow transplantation in nonhuman primates. *Exp Hematol*. 2009;37(10):1250-1257 e1251. Prepublished on 2009/07/30 as DOI S0301-472X(09)00272-0 [pii] 10.1016/j.exphem.2009.07.008.
35. Macmillan ML, Blazar BR, DeFor TE, Wagner JE. Transplantation of ex-vivo culture-expanded parental haploidentical mesenchymal stem cells to promote engraftment in pediatric recipients of unrelated donor umbilical cord blood: results of a phase I-II clinical trial. *Bone Marrow Transplant*. 2009;43(6):447-454. Prepublished on 2008/10/29 as DOI bmt2008348 [pii] 10.1038/bmt.2008.348.
36. Christophorou MA, Ringshausen I, Finch AJ, Swigart LB, Evan GI. The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumour suppression. *Nature*. 2006;443(7108):214-217.
37. Kalajzic Z, Li H, Wang LP, et al. Use of an alpha-smooth muscle actin GFP reporter to identify an osteoprogenitor population. *Bone*. 2008;43(3):501-510. Prepublished on 2008/06/24 as DOI S8756-3282(08)00237-8 [pii] 10.1016/j.bone.2008.04.023.
38. Janzen V, Forkert R, Fleming HE, et al. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature*. 2006;443(7110):421-426.
39. Krishnamurthy J, Ramsey MR, Ligon KL, et al. p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature*. 2006;443(7110):453-457.
40. Molofsky AV, Slutsky SG, Joseph NM, et al. Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature*. 2006;443(7110):448-452.
41. Dominici M, Rasini V, Bussolari R, et al. Restoration and reversible expansion of the osteoblastic hematopoietic stem cell niche after marrow radioablation. *Blood*. 2009;114(11):2333-2343. Prepublished on 2009/05/13 as DOI blood-2008-10-183459 [pii] 10.1182/blood-2008-10-183459.
42. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829-834. Prepublished on 2010/08/13 as DOI nature09262 [pii] 10.1038/nature09262.

43. Mayack SR, Shadrach JL, Kim FS, Wagers AJ. Systemic signals regulate ageing and rejuvenation of blood stem cell niches. *Nature*. 2010;463(7280):495-500. Prepublished on 2010/01/30 as DOI nature08749 [pii] 10.1038/nature08749.
44. Sudo K, Ema H, Morita Y, Nakauchi H. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2000;192(9):1273-1280.
45. Fumagalli M, d'Adda di Fagagna F. SASPense and DDRama in cancer and ageing. *Nature cell biology*. 2009;11(8):921-923. Prepublished on 2009/08/04 as DOI 10.1038/ncb0809-921.

4.12. Figures and Legends

Figure 1. IR-induced p16^{INK4a}/p19^{ARF} expression is dependent on bone marrow stromal cell populations. (A) Scheme representing the strategy used for the isolation of stromal cells from bone marrow aspirates (BM-SC) and from collagenase-treated bones (OB-SC). (B) Representative flow cytometry profiles of BM-SC and OB-SC identified as Ter119⁻ (erythroid lineage), CD45⁻ (hematopoietic lineage) and CD31⁻ (endothelial lineage) isolated from a non-irradiated mouse is shown (C) Representative flow cytometry profiles of CD44, CD90 and CD105 revealing distinct expression levels in BM-SC (—) and OB-SC (--) populations. (D) Osteogenic and adipocytic differentiation potential of BM-SC and OB-SC populations. (E) Differential mRNA expression levels in BM-SC (□) and OB-SC (■) of 5 osteoblast-associated genes normalized to 18S (*runx2*, *sp7*, *opn*, *bglap* and *ibsp*). Each sample is a pool of 2 mice. (F) qPCR performed on mRNA extracted from purified/sorted BM-SC and OB-SC of 8 weeks irradiated (+) or not (-) mice expressed as fold increase in p16^{INK4a} and p19^{ARF} normalized to 18S. Up to 6 independent stromal cell purifications were performed using a minimum of 2-3 mice per group. Student *t* test **p*<0.05.

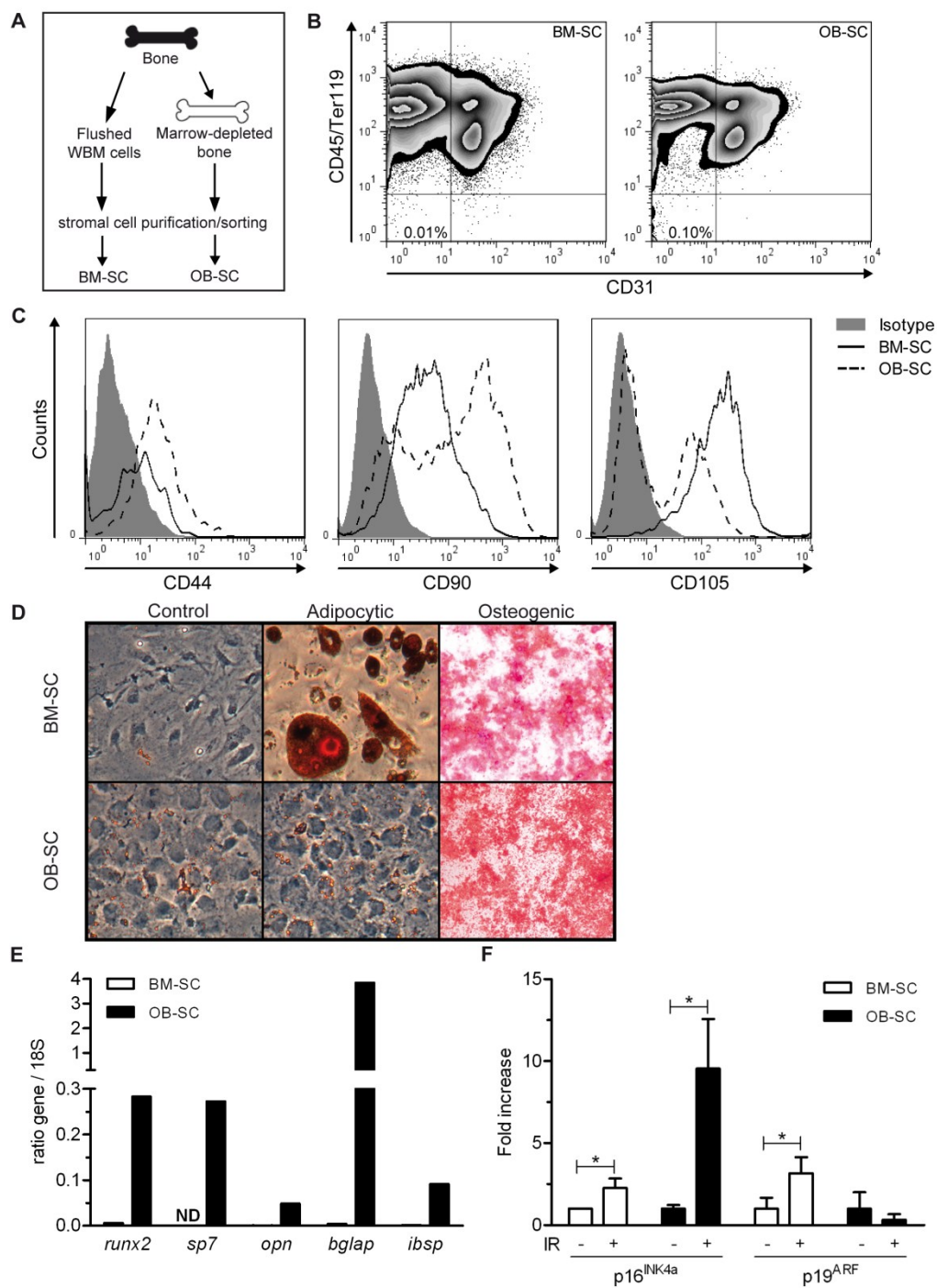
Figure 2. *Ink4a/arf* is necessary to maintain IR-induced senescence of bone marrow stromal cells. (A) OB-SC populations-derived from wild-type (WT) or *ink4a/arf*-deficient (KO) mice were established in vitro and their proliferation following exposure (IR) or not (CTR) to 10 Gy irradiation is shown. A representative experiment (n=3 independent stromal cell isolations) of cumulative population doubling determined over time is shown. (B) Proportion of WT or *ink4a/arf*-null OB-SC in culture that have incorporated BrdU (3-day pulse) 7 days after exposure or not to IR. Up to 16 independent stromal cell isolations were performed. Student *t* test *** $p < 0.001$ (C) Representative photographs showing SA- β -galactosidase staining (blue) of OB-SC 10 days post-exposure or not to 10 Gy IR. Scale bar = 100 μ m.

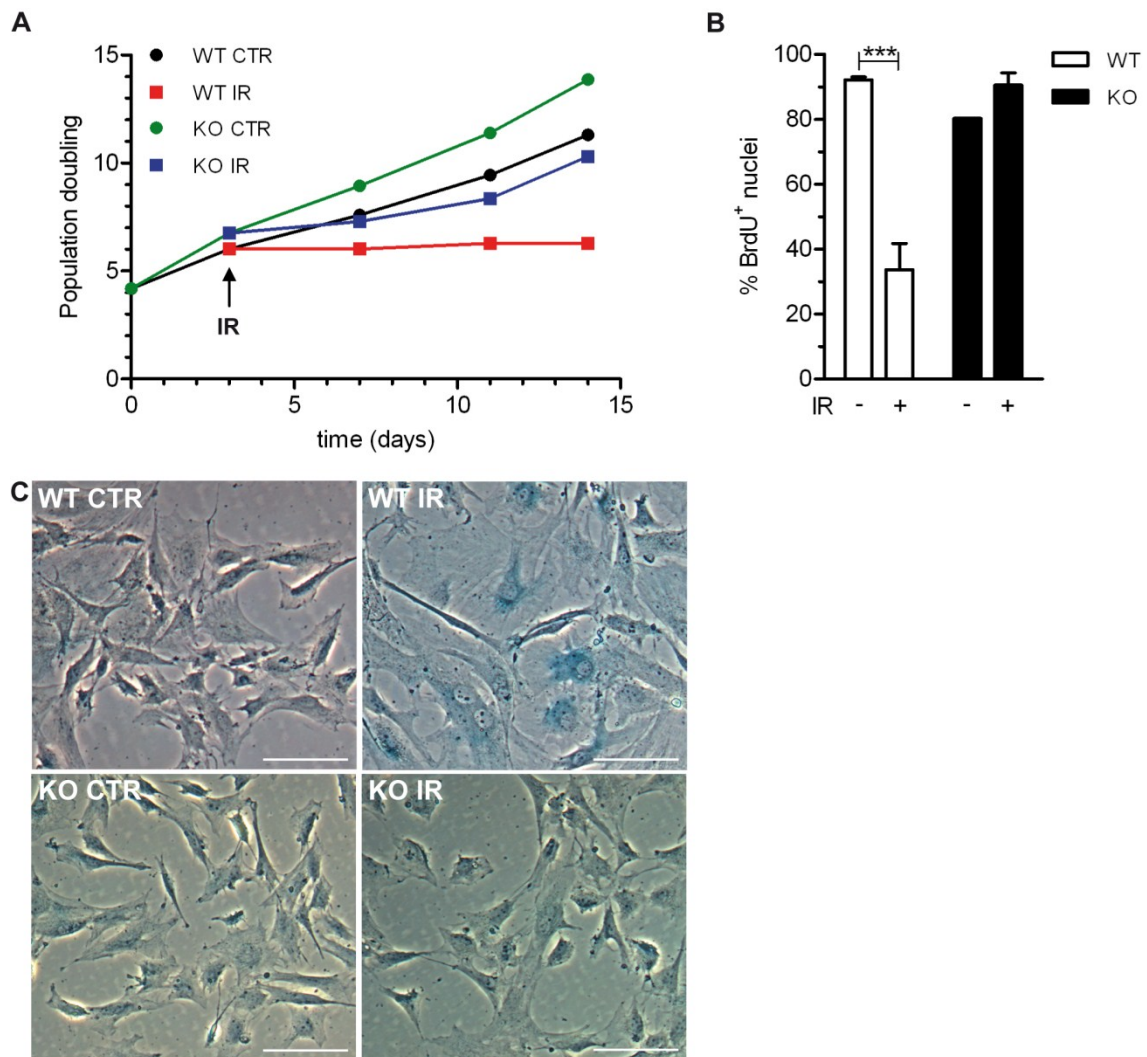
Figure 3. IR-induced changes in the cellularity of the stroma are dependent on their stromal cell type and *ink4a/arf* status. Absolute cell counts of BM-SC (A, D), OB-SC (B, E) and hematopoietic (C, F) populations collected from femurs of wild-type (WT) and *ink4a/arf*-deficient (KO) mice were determined by flow cytometry (see methods) post-exposure or not (CTR) to 6 Gy IR. Of note, BM-SC and hematopoietic cells counts were evaluated in each femur whereas OB-SC counts were expressed by femurs as bones from a single mouse were pooled together for collagenase treatment. n=11-21 mice per group. Student *t* test * $p < 0.05$.

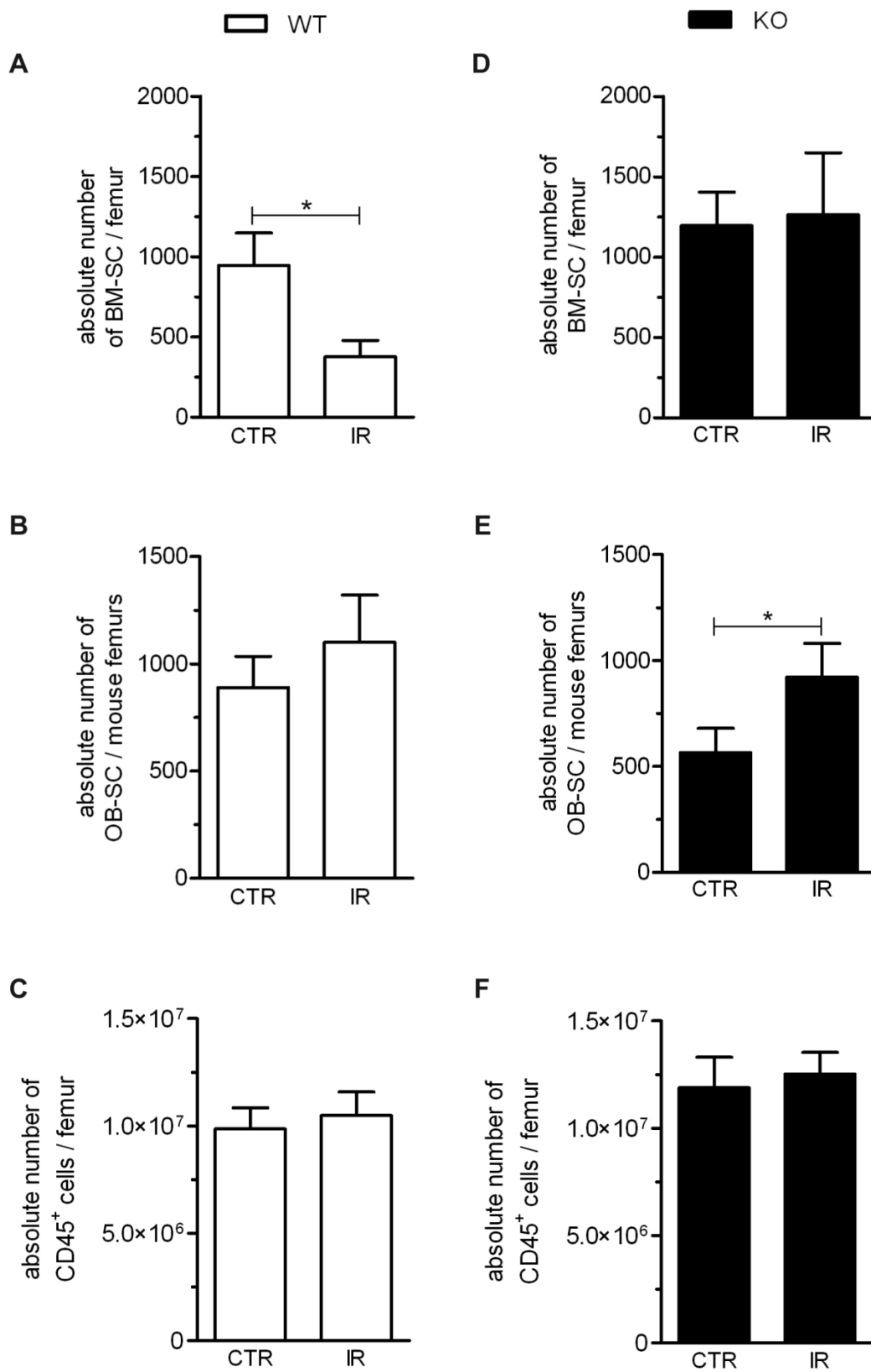
Figure 4. Loss of CFU potential post-exposure to IR is dependent on *ink4a/arf* status. BM-SC (A) and OB-SC (B) were isolated from wild-type (WT) or *ink4a/arf*-deficient (KO) mice exposed or not (CTR) to 6 Gy IR 8 weeks prior to sacrifice and cells were fixed after a 2-week culture to determine CFU counts (average \pm SEM). Of note, BM-SC and hematopoietic cells counts were evaluated in each femur whereas OB-SC counts were expressed by femurs as bones from a single mouse were pooled together for collagenase treatment. n=9-19 mice per group. *p* values from Student *t* tests are shown.

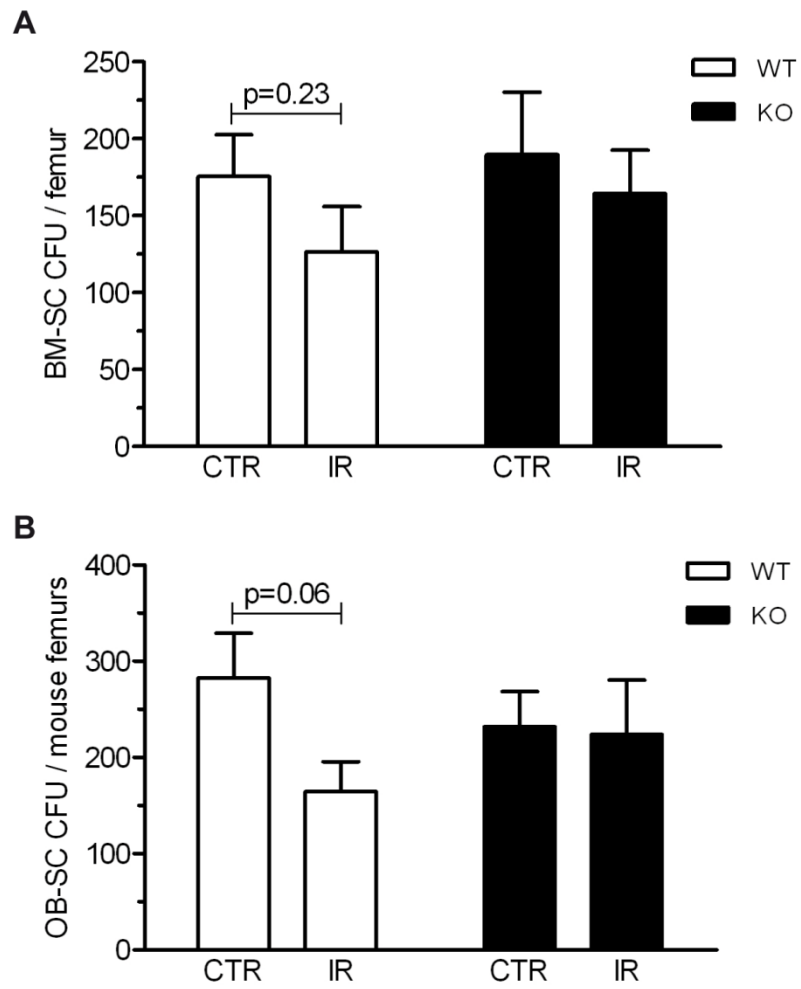
Figure 5. Homing and engraftment processes are independent on long-term residual damage induced by IR. (A) Schematic of the experiments. Wild-type (WT) and *ink4a/arf*-deficient (KO) mice were sublethally irradiated (6 Gy) or not and injected 8 weeks later before homing or engraftment were determined. (B) Representative flow cytometry profiles of hematopoietic cells found in the marrow of flushed femurs 16h after bone marrow transplantation (BMT) or not of 5×10^6 cells previously stained with CFSE. (C) Absolute number (average \pm SEM) of CFSE⁺ cells present in femurs whole bone marrow (WBM) of WT or KO mice exposed (+) or not (-) to IR 8 weeks prior to sacrifice. n=6-14 mice per group. (D) Bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) engraftment 2 weeks following transplantation of 2×10^6 CD45.1 unfractionated bone marrow cells in WT or KO CD45.2 mice exposed (+) or not (-) to IR 8 weeks prior to transplantation. n=4-5 mice per group. (E) Absolute number of donor-derived SLAM (Lin⁻, Sca-1⁺, c-Kit⁺, CD150⁺, CD48⁻) CD45.1⁺ in BM 2 weeks post-transplantation in WT or KO CD45.2 mice exposed (+) or not (-) to IR 8 weeks prior to transplantation. n=4-5 mice per group. Student *t* test **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

Figure 6. IR-induced long-term residual damage alters lymphopoiesis in a non-autonomous *ink4a/arf* dependent manner. (A) Schematic of the experiment. Mice were exposed (+) or not (-) to IR and allowed to recover without transplantation. 11 months later, mice were sacrificed and marrow cells used for the transplantation of CD45.1 recipient mice. The proportion of donor-derived B cells (B220⁺ CD45.2⁺) was analyzed at different time points in blood, before and after transplantation. n=3-9 mice per group. (B-C) As described in figure 5A, wild-type (WT) and *ink4a/arf*-deficient (KO) CD45.2 mice exposed (+) or not (-) to 6 Gy IR were transplanted 8 weeks later with unfractionated CD45.1 bone marrow cells and allowed to reconstitute for 2 weeks prior to BM and spleen analysis of donor-derived CLP (B) and B220⁺ (C) cell counts. n=3-5 mice per group. Student *t* test **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 and °*p*<0.05 (compared to primary mice).

Figure 1, Carbonneau *et al.*, 2012

Figure 2, Carbonneau *et al.*, 2012

Figure 3, Carbonneau *et al.*, 2012

Figure 4, Carbonneau *et al.*, 2012

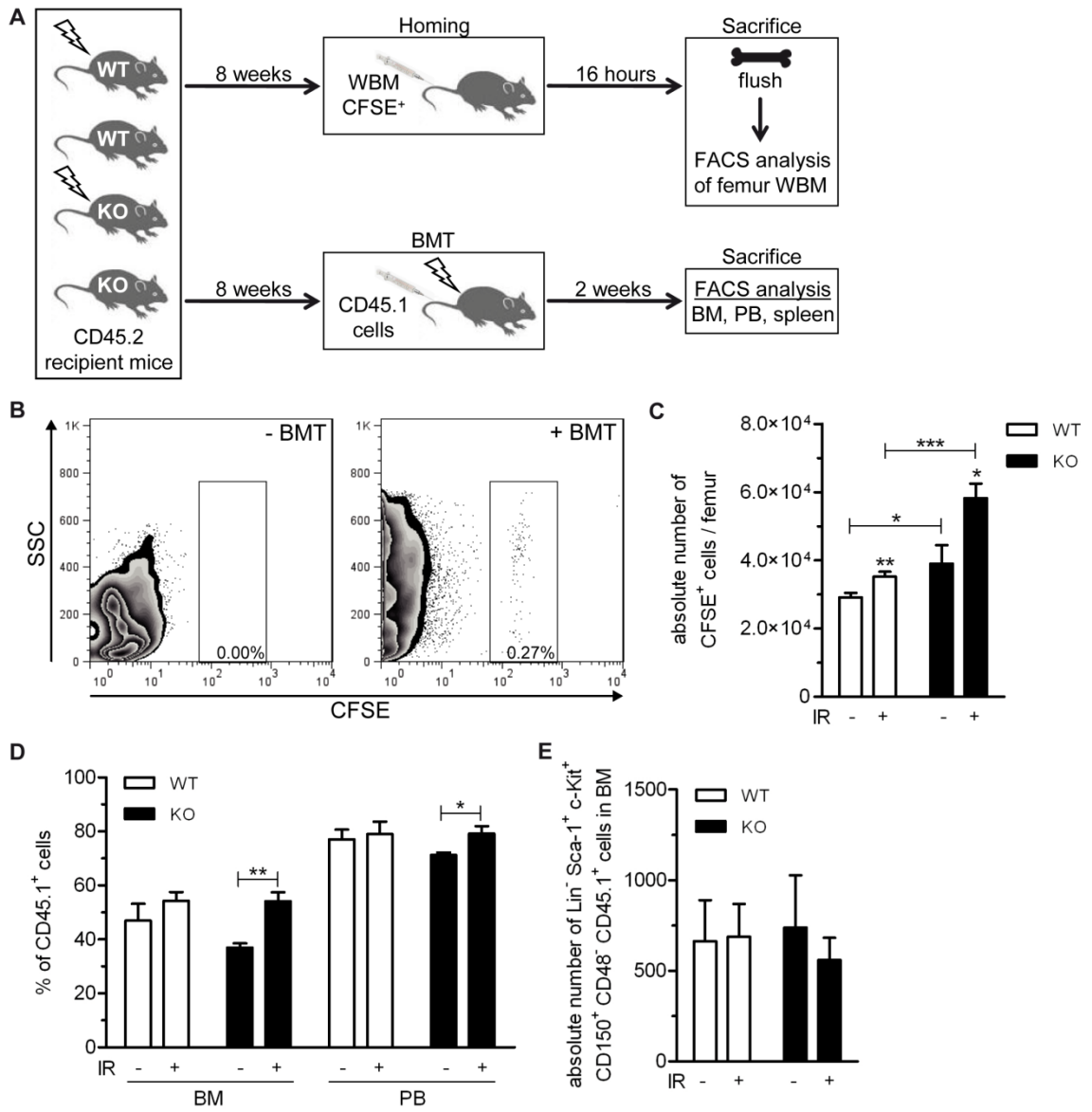


Figure 5, Carbonneau *et al.*, 2012

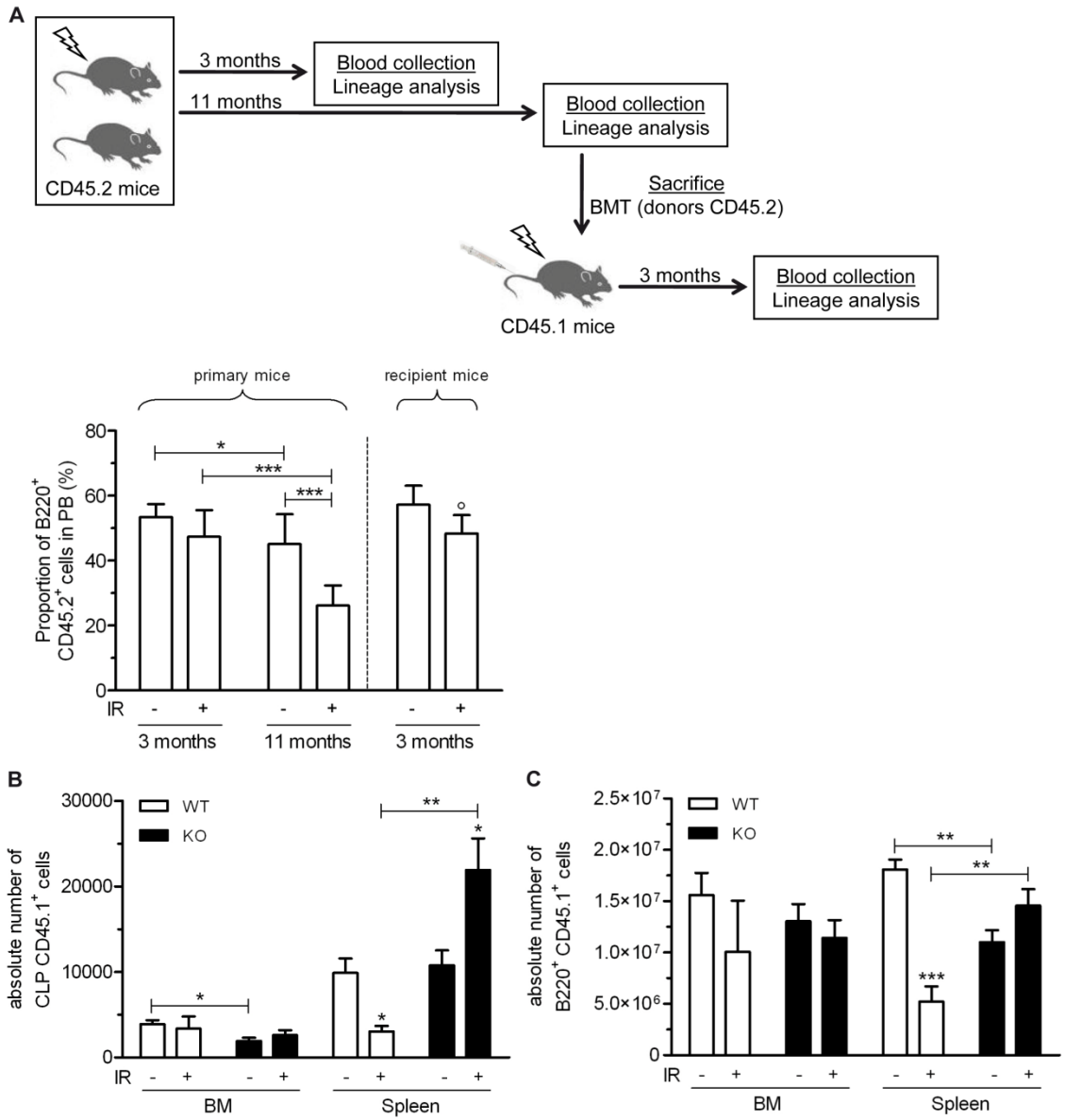


Figure 6, Carbonneau *et al.*, 2012

Table 1. qPCR primers

GENES		PRIMERS	ACCESSION NUMBER
p16 ^{INK4a}	forward	AACTCTTTCGGTCGTACCCC	AF332190
	reverse	GCGTGCTTGAGCTGAAGCTA	
p19 ^{ARF}	forward	GCCGCACCGGAATCCT	L76092
	reverse	TTGAGCAGAAGAGCTGCTACGT	
runx2	forward	GCCGGGAATGATGAGAATA	NM_009820.2
	reverse	GGACCGTCCACTGTCACCTT	
sp7	forward	TCTCCATCTGCCTGACTCCT	NM_130458.2
	reverse	AGCGTATGGCTTCTTTGTGC	
opn	forward	TCAGCTGGATGAACCAAGTCTGGA	BC002113
	reverse	ACTAGCTTGTCCTTGTGGCTGTGA	
bglap	forward	AAGCAGGAGGGCAATAAGGT	NM_007541.2
	reverse	TGCCAGAGTTTGGCTTTAGG	
ibsp	forward	AAAGTGAAGGAAAGCGACGA	NM_008318.3
	reverse	GTCCTTCTGCACCTGCTTC	
18S	forward	TCAACTTTCGATGGTAGTCGCCGT	X00686
	reverse	TCCTTGGATGTGGTAGCCGTTTCT	

4.13. Supplementary Figures and Legends

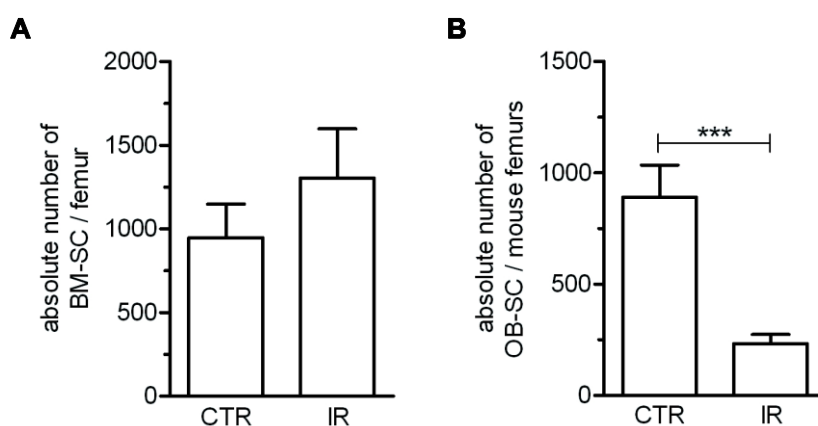


Figure S1. OB-SC but not BM-SC absolute cell counts are reduced in femurs of mice 1 week post-irradiation. Absolute cell counts of BM-SC and OB-SC populations collected from femurs of wild-type mice were determined by flow cytometry (see methods) 1 week post-exposure or not (CTR) to 6 Gy irradiation (IR). BM-SC counts were expressed by femur as femoral bone marrow aspirates were processed independently and analyzed as replicates for each mouse, whereas OB-SC counts were expressed by mouse femurs as cleaned bones from a single mouse were pooled together for collagenase treatment. Shown is the average \pm SEM of $n=13-17$ mice per group. Student t test *** $p<0.001$.

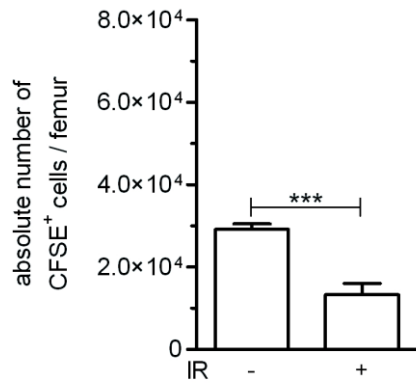


Figure S2. Homing to the bone marrow is compromised short-term after exposure to IR. Absolute number of CFSE⁺ cells present in femurs of wild-type mice exposed (+) or not (-) to 6 Gy IR 1 week prior to sacrifice. Shown is the average \pm SEM of n=6-14 mice per group. Student *t* test *** p <0.001.

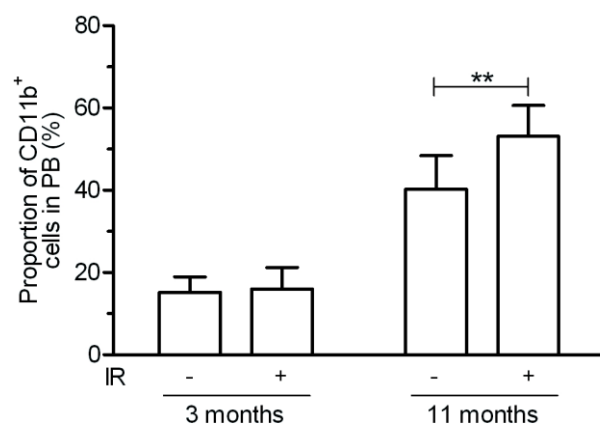


Figure S3. Proportion of myeloid cells in peripheral blood is increased long-term following exposure of mice to IR. Mice were exposed (+) or not (-) to 6 Gy IR and the proportion of myeloid (CD11b⁺) cells in blood was analyzed 3 and 11 months post-IR. Shown is the average \pm SEM of n=7-9 mice per group. Student *t* test ** $p < 0.01$.

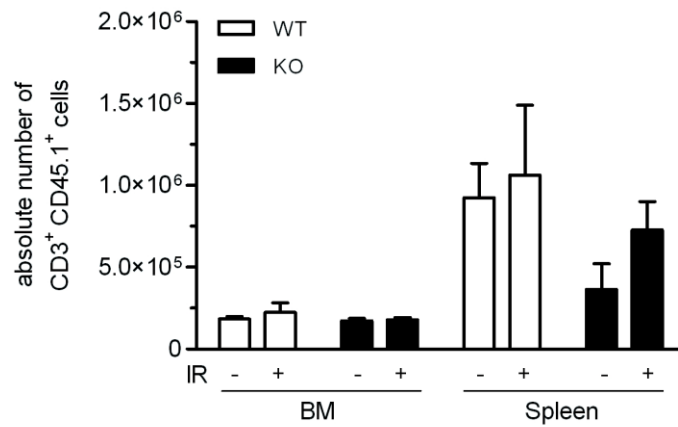


Figure S4. Irradiation does not alter CD3⁺ cells homeostasis. Donor-derived CD3⁺ cell counts in bone marrow and spleen were evaluated in wild-type (WT) and *ink4a/arf*-deficient (KO) mice transplanted 8 weeks post-exposure (+) or not (-) to 6 Gy IR. Shown is the average \pm SEM of n=4-5 mice per group. Student *t* test.

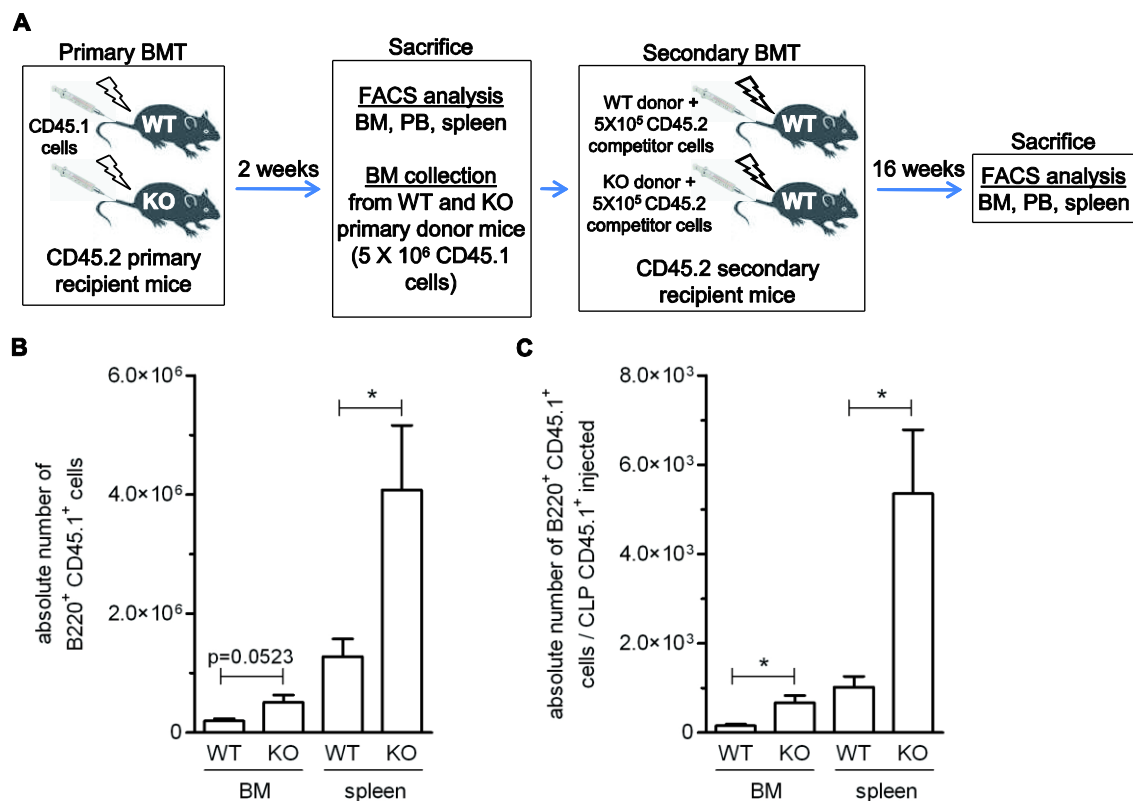


Figure S5. Increased B-cell ratios in mice transplanted using hematopoietic cells collected from a *ink4a/arf*-deficient microenvironment. (A) Schematic of the experiment. Wild-type (WT) and *ink4a/arf*-deficient (KO) CD45.2 mice were transplanted with 2×10^6 unfractionated CD45.1⁺ bone marrow (BM) cells and allowed to reconstitute for 2 weeks prior to sacrifice and secondary transplantation in WT recipient mice. 5×10^6 CD45.1⁺ BM cells from WT or KO primary transplanted mice (determined by flow cytometry analysis of donor mice BM chimerism) were injected along with 5×10^5 CD45.2⁺ WT competitor cells. (B-C) B-cell absolute counts in BM and spleen of secondary recipients 16 weeks following secondary transplantation, shown as B220⁺ CD45.1⁺ cells (B) or B220⁺ CD45.1⁺ cells / CLP CD45.1⁺ cells injected (C). WT and KO groups refer to the microenvironment in which CD45.1⁺ BM cells were in

contact in primary recipients. Shown is the average \pm SEM of n=5-6 mice per group.

Student *t* test * $p < 0.05$.

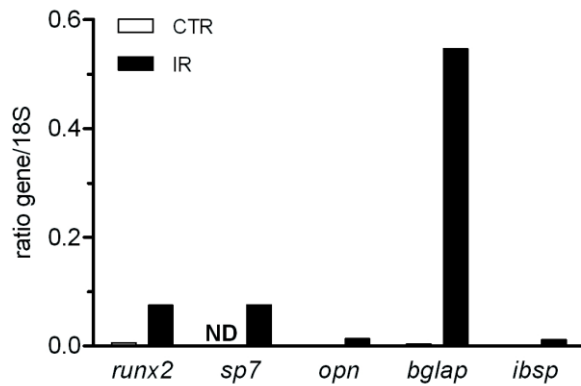


Figure S6. Expression of osteoblast-related genes is increased in response to IR in the BM-SC population. qPCR performed on mRNA extracted from purified BM-SC collected from mice exposed (+) or not (-) to 6 Gy IR 8 weeks prior to sacrifice. Various genes expression is expressed as fold increase normalized to 18S. Each sample is a pool of 2 mice.

5.0. UN MICROENVIRONNEMENT VIEILLISSANT/SÉNESCENT N'INTERFÈRE PAS AVEC L'OSTÉOGÉNÈSE *IN VITRO* ET *IN VIVO*, SUGGÉRANT UN DÉFAUT CELLULAIRE AUTONOME.

5.1. Mise en contexte

Le vieillissement ainsi que l'irradiation (IR), en tant que modalité de traitement pour le cancer et autres désordres hématologiques, sont associés à une augmentation du risque de fracture. On observe également un nombre accru de cellules sénescents dans ces deux conditions. De plus, nous avons démontré dans la section 4 de cette thèse que l'IR induit la sénescence des cellules stromales de la moelle osseuse. Comme ces cellules participent à l'homéostasie osseuse, à la fois directement par la formation de l'os et indirectement en régulant la formation des cellules responsables de sa résorption, nous croyons que leur induction en sénescence pourrait altérer l'homéostasie osseuse. Ainsi, cette étude suggère un effet cellulaire non-autonome du microenvironnement vieillissant/sénescents sur la résorption, mais pas sur la formation osseuse. En outre, la diminution de formation osseuse est due à un effet cellulaire autonome des cellules stromales mésenchymateuses sénescents.

5.2. Contribution des auteurs

CLC a fait le design expérimental, a réalisé les expériences, a analysé les données et a écrit la première version du manuscrit. GD a participé au design expérimental, à la réalisation des expériences *in vivo* et à l'interprétation des résultats. La préparation et la

coloration des implants a été faite par le personnel du *Bone Center* de McGill. CMB a participé au design expérimental et à l'interprétation des résultats.

5.3. Référence

Ce manuscrit est en préparation et n'a jamais été soumis pour publication.

An aged/senescent microenvironment does not interfere with osteogenesis in vitro and in vivo: evidence for a cellular autonomous defect.

Running head: No role for the aged/senescent microenvironment in osteogenesis

Cynthia L. Carbonneau^{1,2}, Geneviève Despars^{1,2}, and Christian M. Beauséjour^{1,2}

¹ Centre de recherche du CHU Ste-Justine, ² Département de pharmacologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

*Correspondence: Christian M. Beauséjour

Counts: abstract (211 words), manuscript: (3522 words), figures (4), table (1), references (17).

5.4. Abstract

Decrease bone density is often observed with age and in cancer survivors who were exposed to ionizing radiation (IR) as part of their treatment. We recently showed that bone marrow progenitor stromal cells (BM-SC) collected from mouse long bones undergo senescence when exposed to IR and that this phenotype prevents their mineralization. As bone homeostasis is regulated by osteogenesis and osteoclastogenesis, we now wanted to determine the impact of a senescent environment on these processes. Here, we provide evidences that the secretome from senescent bone stromal cells does not interfere with mineralization *in vitro*. Intriguingly, we rather found that the senescent secretome could promote mineralization under certain conditions. Alternatively, conditioned media collected from senescent cells could delay osteoclast formation *in vitro*, an effect we found was likely independent of RANKL and OPG, two known regulators of osteoclastogenesis. Using a heterotopic model of bone formation in mice, we then measured the mineralization potential of BM-SC in both young and aged mice. Surprisingly, the mineralization of BM-SC was not delayed in aged mice but rather significantly increased, in line with our *in vitro* observations. Overall, our results suggest a cellular autonomous defect of bone formation with age or following exposure to IR and provide a rationale for using cellular therapies for bone diseases. (211 words)

Key words: systemic environment, bone marrow microenvironment, heterotopic bone formation, senescence, aging, irradiation, stromal cells, osteogenesis, osteoclastogenesis

5.5. Introduction

Irradiation (IR) has long been used in the treatment of hematologic disorders and cancers. Improvement in drug regimens has increased survival and life expectancy. As a result, several years post-treatment, cancer survivors often encounter late effects that manifest as a wide array of diseases, many of which are also observed during normal aging^{1,2}. Increased bone frailty is one of these³. In that matter, we previously reported that exposure of mice to IR induces the senescence of bone marrow stromal cells (BM-SC), a phenotype we showed leads to a cellular non-autonomous B lymphopoiesis defect⁴. We also observed that the senescence of BM-SC prevented them from fully differentiating into mineralizing osteoblast-like cells upon stimulation in vitro (Despars, Carbonneau *et al.*, in preparation).

p16-induced senescence observed in aging brain, blood and pancreatic stem and progenitor cells has been shown to impair neurogenesis, hematopoiesis and pancreatic functions respectively⁵⁻⁷. Recent studies using heterochronic transplantation or parabiosis have also demonstrated that young/healthy stem cells could acquire age-related defects in response to aged local and systemic environment^{8,9}. Such defects may be explained, at least partially, by the senescence associated secretory phenotype whose effects on tissues homeostasis are mostly unknown¹⁰. Conversely, functions of old stem cells could be rejuvenated in these models when injected or exposed to a young environment.

Excessive bone remodelling is believed to be the primary cause of osteoporosis¹¹. The exact role of the cellular components in this pathology and in particular the role of the microenvironment is still largely unknown. Bone homeostasis is a balance between

bone formation by osteoblasts (OB) and bone resorption by osteoclasts (OC). Their activities are known to be regulated by various cytokines, such as the macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and the ligand of the receptor activator of nuclear kappa-B (RANKL) both of which secreted by OB and their mesenchymal stromal cell progenitors. These cells also secrete osteoprotegerin (OPG), a soluble decoy receptor for RANKL, which the ratio is believed to dictate OC formation and ultimately, bone resorption¹².

Here, we wanted to determine whether altered bone homeostasis following IR or during aging could be caused by cellular non-autonomous alterations to the environment. Our results demonstrate that unlike hematopoietic or muscle stem cells, bone progenitor cells are still fully capable to mineralize *in vitro* and to form bone *in vivo* when exposed to an aged/senescent environment.

5.6. Materials and Methods

5.6.1. Mice

Five or seven week-old C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratories (St-Constant, QC). All mice were allowed to acclimate one week prior experimentation. Mice were aged on site until they reach 70-80 weeks-old. All *in vivo* manipulations were approved by the Comité Institutionnel des Bonnes Pratiques Animales en Recherche of CHU Ste-Justine (protocol number S10-32).

5.6.2. Isolation, purification and characterization of stromal cells

BM-SC and osteoblast-like stromal cells (OB-SC) were isolated as previously described⁴. Briefly, bone marrow was collected by flushing tibias, femurs and iliacs from C57BL/6 mice in phosphate buffer solution (PBS). Cleaned bones were next cut in small fragments and digested with 0.25 % collagenase type 1 (Sigma, St Louis, MO). Stromal cells in both fractions were isolated based on their property to attach to polystyrene following culture for 7 days in α -MEM containing 10 % fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. Cells were allowed to expand for 2-4 passages (corresponding to 4-12 population doublings) in 3 % oxygen before their phenotype was confirmed by flow cytometry using the following antibodies: Ter119, CD31, CD45, CD44, CD90 and CD105, all purchased from BioLegend (San Diego, CA).

5.6.3. Conditioned media collection

Stromal cells were plated confluent 7 days following exposure or not to 10 Gy IR. Serum free α -MEM media was added on day 9 and conditioned media (CM) was collected 24 hours later. CM were normalized to 200 000 cells by diluting with α -MEM.

5.6.4. Osteogenesis

Confluent BM-SC were cultured under osteogenic conditions for 14 to 21 days with 1-100 nM dexamethasone, 10 mM β -glycerophosphate, 50 μ M vitamin C, and 50 nM vitamin D3 (Sigma, Saint Louis, MO) in complete medium. CM from stromal cells irradiated or not was added to test the effect of the secretome on osteogenesis. Media was changed every two days. Mineralized nodules were stained with 0.5 % Alizarin Red S

solution pH 4.2 (Sigma, Saint Louis, MO). Alizarin Red S was extracted and quantified using a previously described method¹³.

5.6.5. Osteoclastogenesis

Bone marrow was harvested from limbs of 6-10 week-old C57BL/6 mice and mononuclear cells were purified on Ficoll (GE Healthcare, Sweden). 150 000 mononuclear cells were plated in 24-well petri dish and cultured in α -MEM containing 10 % fetal bovine serum, 1 % L-glutamine and 1 % penicillin/streptomycin. Osteoclastogenesis was induced by addition of 10 ng/ml M-CSF and 20 ng/ml RANKL. 24h-conditioned media collected from 10-day irradiated or not stromal cells was normalized for the number of secreting cells and put in cultures to evaluate its effect. Media was changed every second day. Differentiation was stop when osteoclasts were visible (6-10 culture days). Cells were fixed with 3.7 % formaldehyde and tartrate-resistant alkaline phosphatase (TRAP) staining was performed according to the manufacturer's instructions (Sigma, Saint Louis, MO).

5.6.6. RNA isolation and Real time quantitative PCR

RNA was extracted from stromal cell populations using the RNeasy® Mini or Micro Kit (Qiagen, Mississauga, ON). RNA was reverse-transcribed using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). Quantitative differences in gene expression were determined by real-time quantitative PCR using SensiMix™ SYBR Low-ROX (Quantace, Taunton, MA) and the MxPro QPCR software (Stratagene, Mississauga, ON). Primers used for the amplification of RANKL, OPG, and 18S rRNA are available in Table 1 within the

supplementary result section. Values are presented as the ratio of target mRNA to 18S rRNA, obtained using the relative standard curve method of calculation.

5.6.7. ELISA

Femurs were cleaned and marrow was flushed using a volume of 0.5 ml cold PBS. Media was changed 7 days following exposure or not to 10 Gy IR of stromal cell cultures, and conditioned media was collected 72 hours later. RANKL and OPG specific levels were determined by ELISA from bone marrow eluates or conditioned media according to the manufacturer's instructions (RayBiotech, Norcross, GA). Results were normalized for the number of secreting cells. Alternatively, serum was collected by cardiac puncture of anesthetized mice. Total deoxypyridinoline (tDPD) specific levels were then determined by ELISA according to the manufacturer's instructions (Quidel, San Diego, CA).

5.6.8. Heterotopic bone model

2×10^6 murine BM-SC were allowed to attach to hydroxyapatite/tricalcium phosphate (HA/TCP) ceramic particles (80 mg, 75-150 μm , HA:TCP ratio 60:40) at 37°C for 2h. The suspension was centrifuged and embedded in a 0.3 ml collagen gel at pH 7.0 made of 0.0065 mg/ml collagen type I (BD, Mississauga, ON), 1.32 mM DTT, 6.6 mM CaCl_2 , and 0.32 U/ml transglutaminase (Sigma, Saint Louis, MO). Implant mixtures were kept on ice until their subcutaneous implantation into the flanks of 8 and 70-80 weeks-old C57BL/6 mice. Mice were sacrificed 10 weeks later and implants were harvested, fixed with formaldehyde 3.7 % and embedded in methylmethacrylate for sectioning. Slides were stained with Goldner's trichrome and photographed using a dissection microscope M205 FA (Leica, Concord, ON).

5.6.9. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with the Graph Pad 5.0 software using unpaired Student *t* test. Results were considered statistically significant with *p* values < 0.05.

5.7. Results

5.7.1. The secretome of senescent stromal cells does not diminish mineralization potential of bone progenitors.

The rejuvenating potential of transplanted young/healthy progenitors cells was shown to be limited in aged mice because of the negative impact of the systemic environment^{8,9,14}. Whether the osteogenic potential of mesenchymal progenitor cells is also reduced by an aged/senescent environment is not known. To verify this hypothesis, we isolated BM-SC with multilineage potential (see Carbonneau *et al.*, 2012) and stimulated these cells to undergo osteogenic differentiation in the presence of media alone or conditioned media (CM) collected from control or senescent BM-SC. We chose to collect CM made from stromal cells that underwent IR-induced senescence rather than replicative exhaustion for two reasons: first, to mimic long-term bone frailty observed in cancer survivors and second, because mouse stromal cells do not undergo clean replicative exhaustion *in vitro* but rather experience what is believed to be undefined stress-induced senescence. Using this approach, we found that the secretome of senescent cells did not diminish osteogenesis compared to media alone or CM collected from non-irradiated cells, as measured using Alizarin Red S staining, a marker of mineralization activity (Figure 1A-B). These results, combined to our previous observation that IR-induced senescent BM-

SC are unable to mineralize *in vitro* upon stimulation (Despars, Carbonneau *et al.*, in preparation and Figure 2), suggest that impaired osteogenesis is cell autonomous.

We next wanted to determine if CM collected from non-irradiated stromal cells could rescue the mineralization defect observed in irradiated BM-SC (Figure 2A). While CM collected from non-irradiated cells had no effect on mineralization, we surprisingly found that CM collected from senescent cells could fully restore the mineralization potential of senescent BM-SC (Figure 2B). Altogether, these results demonstrate that the secretome from senescent BM-SC cells not only does not diminish the mineralization potential of stromal cells but rather contains one or several pro-osteogenic factor(s) that can bypass the cell autonomous mineralization defect observed in senescent cells.

5.7.2. The secretome of senescent osteoblastic stromal cells delays osteoclastogenesis.

We and others previously reported that induction of a senescent bone marrow microenvironment alters hematopoiesis^{4,15}. Given that osteoclastogenesis is dependent on the fusion of myeloid/monocyte cells, we wanted to determine whether the senescent associated secretory phenotype could also affect osteoclast formation. To address this question, we purified murine bone marrow mononuclear cells and induced them to differentiate into osteoclasts in presence of CM collected from control or irradiated OB-SC. Interestingly, we observed a marked difference in the shape of osteoclast precursors (Figure 3A). Indeed, while they were mostly spindle-shaped in presence of CM collected from non-irradiated cells, they became rounder in the presence of CM collected from senescent cells. We also noticed a reduction in the number and size (determined by the

number of nuclei) of osteoclasts that were formed in presence of a senescent secretome (Figure 3A-B). We next determined RANKL and OPG levels, two proteins identified for their implication in osteoclastogenesis¹⁶, and found no significant reduction in their levels at both the mRNA and protein levels (Figure 3C-F). These results suggest that the secretome from senescent stromal cells delays osteoclastogenesis in a manner that is independent of RANKL and OPG, at least *in vitro*.

5.7.3. Mineralization from BM-SC is not diminished in aged mice.

We next determined the impact of a systemic environment by subcutaneously implanting BM-SC (in a mixture composed of collagen type I and HA/TCP ceramic) into young or aged mice and evaluating heterotopic ossification. As expected, bone mineralization and hematopoietic cavities were observed 10 weeks post-implantation. However, the average mineralization surface area as determined by Goldner's staining (in green) was drastically increased in implants collected from aged mice (Figure 4A-B). Indeed, only about half of young mice implants were mineralized on average compared to nearly the entire surface in implants collected from old mice. These results are in line with our observation that a senescent secretome does not interfere with mineralization *in vitro*. Interestingly, we also observed much larger hematopoietic cavities within implants collected from aged mice (Figure 4C). These cavities are known to be formed only after mineralization occurred and presumably following osteoclastic resorption¹⁷. To determine whether an increased osteoclastic activity could account for the bigger cavities observed in implants collected from old mice, we determined the RANKL/OPG ratio and the amount of total deoxypyridinoline (tDPD, a product of collagen degradation associated with bone resorption activity) (Figure 4D-E) in mice serum. Whereas there was no difference in the

former, the latter was significantly increased in serum of old compared to young mice (12.28 nM versus 10.23 nM, respectively), suggesting that increase osteoclastogenesis independent of the RANKL/OPG ratio may occur in aged mice and account for the larger hematopoietic cavities observed. Still, these results suggest that systemic environment of aged mice does not diminished bone formation and reinforce the hypothesis that bone frailty observed in aged or irradiated cancer survivors is likely the result of a cellular autonomous defect in bone progenitor cells.

5.8. Discussion

Long-term residual damage induced by irradiation is a growing medical concern, with many cancer survivors showing treatment-related late effects ^{1,2}. One of these is the increased risk of fracture which is also seen in the elderly population. Likewise, we made the observation that senescent stromal cells are formed within an irradiated bone marrow microenvironment and that this could lead to impair B lymphopoiesis ⁴. Similarly, the regenerative potential of satellite progenitor cells is also affected in aged muscle ^{8,9}. The extent to which the aged/senescent environment could contribute to bone homeostasis defect observed in aged or irradiated tissues remains elusive. Bone stromal cells are directly and indirectly implicated in the process of bone formation and in the formation of bone resorbing osteoclasts respectively. As such, whether a senescent environment can impair these functions is of high clinical interest.

In the present study, we found that the secretome from IR-induced senescent stromal cells does not diminish mineralization potential of BM-SC but rather contains one or several pro-osteoblastic factor(s) that can fully suppress the autonomous

mineralization defect observed in IR-induced senescent bone progenitor cells. Intriguingly, such robust osteogenic potential of CM collected from senescent cells was only observed when secreted under steady-state conditions as it has no effect when secreted under osteogenic conditions, as demonstrated by the absence of mineralization by senescent MSC with media alone (Figure 2B). One hypothesis may be that senescent BM-SC secrete osteogenic factor(s) that are not produced/secreted when cells are placed under osteogenic differentiation conditions, suggesting a feedback inhibition mechanism by the media. The identification of such secreted osteogenic factor(s) is a challenging task that remains to be done.

We also noticed a marked difference in the shape of osteoclast precursors as well as a reduction in the number of OC that were formed (Figure 3A). Moreover, OC were smaller according to their reduced number of nuclei. The fact we also observed that OC precursors exposed to CM collected from irradiated osteoblastic stromal cells had less lamellipodia (data not shown) may explain the reduction in size and number of osteoclasts given cellular contact is essential for the fusion of monocytes. Moreover, we believe the senescent secretome may be only delayed osteoclastogenesis given few osteoclasts containing over 20 nuclei were still observed (data not shown). Expression levels of both RANKL and OPG were not significantly altered *in vitro*, suggesting the impact of the senescent secretome on osteoclastogenesis is likely independent of the RANKL/OPG ratio. Intriguingly, implantation of BM-SC in aged mice reconstituted a bone with larger hematopoietic cavities than implants in young mice (Figure 4C). Because in our model of primary ossification bone formation needs to occur before bone resorption can take place¹⁷, this observation is likely explained by the fact that aged mice

mineralize faster which may lead to faster bone resorption and cavity formation. Still, the fact that we observed the presence of a greater amount of tDPD in serum of aged mice could suggest that increased bone resorption occurs (Figure 4D). Yet, as observed in CM collected from senescent cells, the levels of RANKL/OPG in serum from aged mice were not significantly altered, suggesting that if indeed higher osteoclastogenesis occurs, it is independent of these two important modulators. In conclusion, this study reveals the aged/senescent microenvironment has a cellular non-autonomous impact on osteoclastogenesis *in vitro* but no negative effect on the mineralization potential of bone progenitor cells *in vitro* and in bone formation in mice. These results suggest that bone frailty observed in aged and irradiated patient is likely to be the consequence of cellular autonomous defect of bone progenitor cells. Our findings provide a rationale for using cellular therapies in the treatment of bone diseases in the elderly and long-term cancer survivors.

5.9. Acknowledgements

We would like to thank Dr Alain Moreau and Josée Dépôt for their help with histology and Denise Carrier for her help with mice. This work was supported by a grant from the Canadian Institute of Health Research (MOP-102709) (C.M.B.). C.L.C. and G.D. have been supported, respectively, by a student fellowship from the CIHR and the FRSQ. C.M.B. has been supported by a scientist award by the FRSQ.

5.10. Authorship

Contribution: CLC, GD and CMB designed the experiments and analyzed the data; CLC and GD performed the experiments; CLC wrote the first version of the manuscript and CMB wrote the final version.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

5.11. References

- 1 Geenen, M. M. *et al.* Medical Assessment of Adverse Health Outcomes in Long-term Survivors of Childhood Cancer. *JAMA* **297**, 2705-2715 (2007).
- 2 Oeffinger, K. C. *et al.* Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med* **355**, 1572-1582 (2006).
- 3 Mostoufi-Moab, S. *et al.* Bone density and structure in long-term survivors of pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Bone and Mineral Research* **27**, 760-769 (2012).
- 4 Carbonneau, C. L. *et al.* Ionizing radiation-induced expression of INK4a/ARF in murine bone marrow-derived stromal cell populations interferes with bone marrow homeostasis. *Blood* **119**, 717-726 (2012).
- 5 Janzen, V. *et al.* Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature* **443**, 421-426 (2006).
- 6 Krishnamurthy, J. *et al.* p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* **443**, 453-457 (2006).
- 7 Molofsky, A. V. *et al.* Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* **443**, 448-452 (2006).
- 8 Conboy, I. M. *et al.* Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* **433**, 760-764 (2005).
- 9 Carlson, B. M. & Faulkner, J. A. Muscle transplantation between young and old rats: age of host determines recovery. *The American journal of physiology* **256**, C1262-1266 (1989).
- 10 Coppe, J. P. *et al.* Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS biology* **6**, 2853-2868 (2008).
- 11 Cummings, S. R. *et al.* Improvement in spine bone density and reduction in risk of vertebral fractures during treatment with antiresorptive drugs. *Am J Med* **112**, 281-289 (2002).
- 12 Kleyer, A. *et al.* LXRs orchestrate osteoblast/osteoclast crosstalk and counteract pathologic bone loss. *J Bone Miner Res* (2012).
- 13 Gregory, C. A., Gunn, W. G., Peister, A. & Prockop, D. J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem* **329**, 77-84 (2004).
- 14 Mayack, S. R., Shadrach, J. L., Kim, F. S. & Wagers, A. J. Systemic signals regulate ageing and rejuvenation of blood stem cell niches. *Nature* **463**, 495-500 (2010).
- 15 Ju, Z. *et al.* Telomere dysfunction induces environmental alterations limiting hematopoietic stem cell function and engraftment. *Nature Medicine* **13**, 742-747 (2007).
- 16 Coetzee, M. & Kruger, M. C. Osteoprotegerin-receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand ratio: a new approach to osteoporosis treatment? *South Med J* **97**, 506-511 (2004).
- 17 Sacchetti, B. *et al.* Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* **131**, 324-336 (2007).

5.12. Figures and Legends

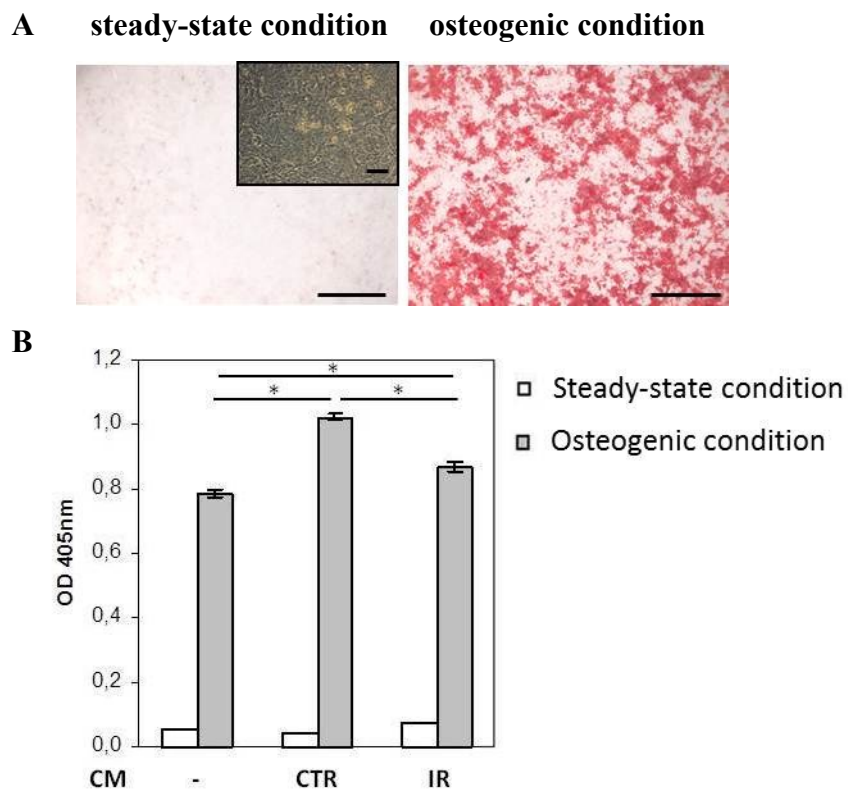
Figure 1. The mineralization potential of mesenchymal stromal cells is not diminished by the secretome of senescent cells. (A) Representative photographs showing mineralization potential (Alizarin Red S staining) of control MSC cultured under steady-state (□) or osteogenic conditions (■) for 14-21 days, in presence of media alone (-) or conditioned media (CM) collected under steady-state conditions from 10 Gy-irradiated (IR) or not (CTR) stromal cells (scale bar 200 μm). Insert shows phase contrast photograph (scale bar 100μm). (B) Representative results (n = 4 independent MSC cultures) of Alizarin Red S quantification by optical density at 405 nm are shown. * $p < 0.05$ by Student *t* test.

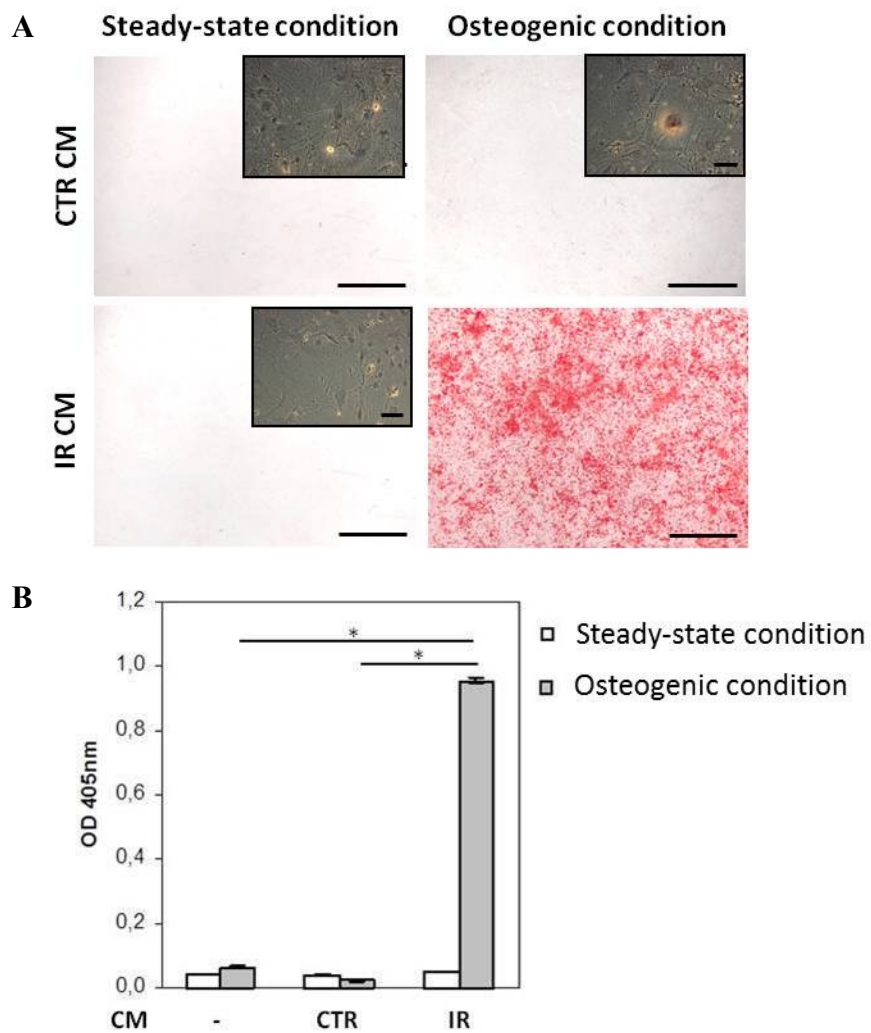
Figure 2. The secretome from senescent BM-SC fully restores mineralization capabilities to irradiated stromal cells. (A) Representative photographs showing mineralization potential (Alizarin Red S staining) of irradiated MSC cultured under steady-state (□) or osteogenic conditions (■) for 14-21 days, in presence of media alone (-) or conditioned media (CM) collected under steady-state conditions from 10 Gy-irradiated (IR) or not (CTR) stromal cells (scale bar 200 μm). Inserts show phase contrast photograph (scale bar 100μm). (B) Representative results (n = 4 independent MSC cultures) of Alizarin Red S quantification by optical density at 405 nm are shown. * $p < 0.05$ by Student *t* test.

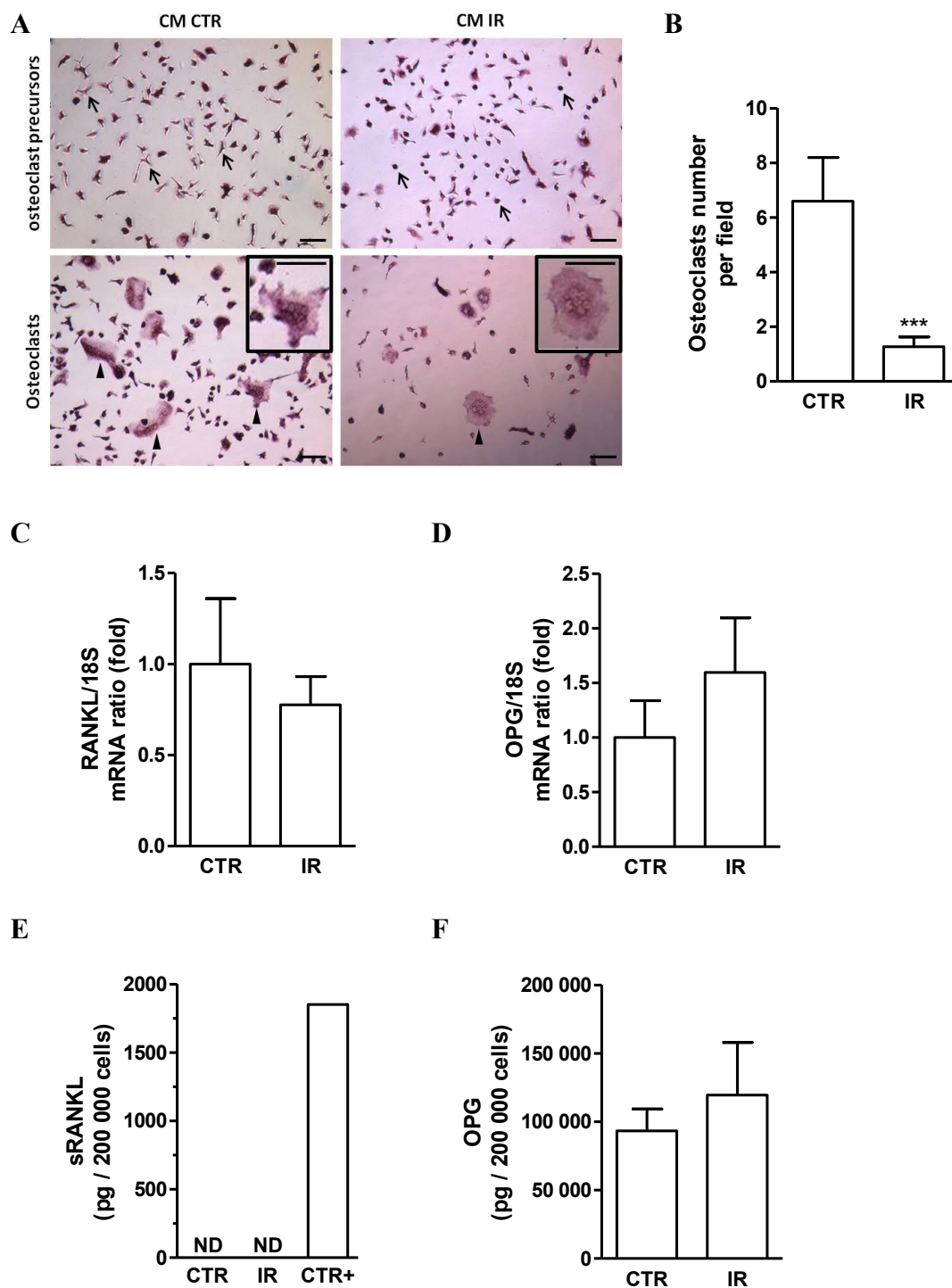
Figure 3. Osteoclastogenesis is delayed by conditioned media collected from senescent osteoblastic cells. (A) Representative photographs (n = 3) showing osteoclastogenesis after a 7-days culture in presence of CM collected from 10 Gy-

irradiated (IR) or not (CTR) osteoblastic stromal cells. Osteoclast precursors display distinct shapes according to the CM tested, as indicated by arrows. Arrow heads show osteoclasts whose number is reduced in presence of irradiated CM. Scale bar represents 100 μm . (B) Quantification of osteoclasts number produced in presence of CM collected from CTR or IR osteoblastic stromal cells. $n = 5-11$ fields per condition, each field covering 0.88 mm^2 . *** $p < 0.001$ by Student t test. (C-D) Differential mRNA expression levels of RANKL (C) and OPG (D) in CTR and IR osteoblastic stromal cells. Results from 12 independent stromal cell isolations are normalized to 18S rRNA and expressed in fold compared to CTR. (E-F) Soluble RANKL (E) and OPG (F) levels were measured in CM (normalized for 200 000 cells) from CTR or IR osteoblastic stromal cells. Cells were stimulated with vitamin D3 as a positive control (CTR+) for RANKL secretion. $n=3-6$ independent stromal cell cultures. ND, no detection.

Figure 4. Heterotopic bone mineralization from BM-SC is not diminished in aged mice. (A) Representative photographs revealing bone mineralization (green) in implants extracted from young or old mice 10 weeks after implantation. $n = 3-6$ mice per group. (B) Quantification in percentage of the mineralized surface of implants. $n = 3-6$ mice per group. ** $p < 0.01$ by Student t test. (C) Higher magnification reveals larger hematopoietic cavities (red) in implants extracted from old compared to young mice. Scale bar represents 125 μm . (D-E) RANKL/OPG ratio (D) and total deoxypyridinoline (tDPD) (E) levels were measured in serum from young and old mice. $n = 6-7$ and 7-10 mice per group, respectively. ** $p < 0.01$ by Student t test.

Figure 1, Carbonneau *et al.*, in preparation

Figure 2, Carbonneau *et al.*, in preparation

Figure 3, Carbonneau *et al.*, in preparation

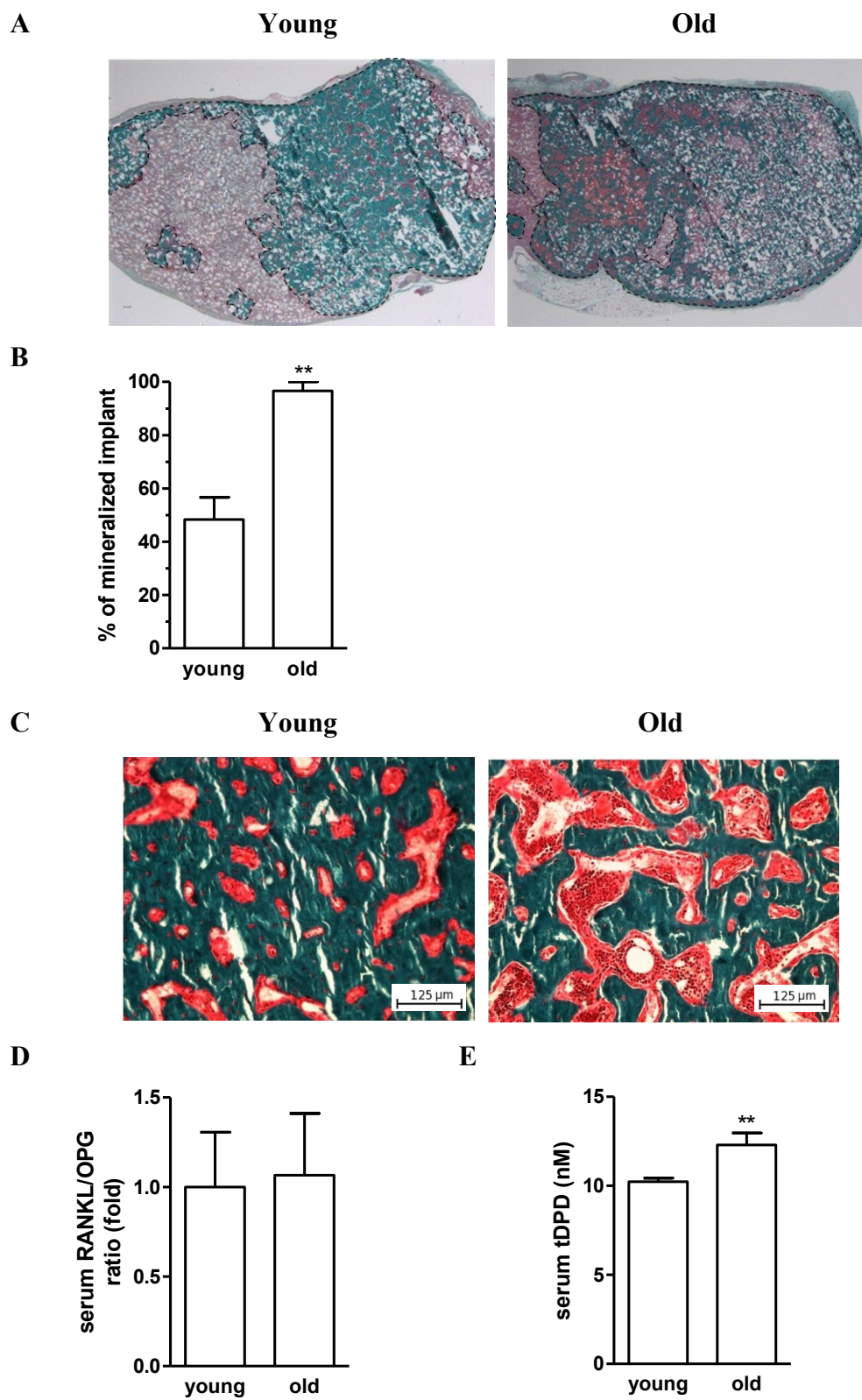
Figure 4, Carbonneau *et al.*, in preparation

Table 1. qPCR primers

GENES		PRIMERS	ACCESSION NUMBER
RANKL	forward	5'-CGTGCAGAAGGAACTGCAACACAT-3'	NM_011613.3
	reverse	5'-TTGATGGTGAGGTGTGCAAATGGC-3'	
OPG	forward	5'-AACCGAGTGTGTGAGTGTGAGGAA-3'	NM_008764.3
	reverse	5'-TTGCAAACCTGTGTTTCGCTCTGGG-3'	
18S	forward	5'-TCAACTTTCGATGGTAGTCGCCGT-3'	X00686
	reverse	5'-TCCTTGGATGTGGTAGCCGTTTCT-3'	

CHAPITRE III

DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

6.0. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

6.1. Discussion générale

Cette thèse comporte deux objectifs principaux visant à mieux comprendre les effets de la sénescence en utilisant un modèle murin de TBI, ainsi que des cultures primaires de cellules stromales. Nos travaux avaient pour but (1) d'étudier les effets de l'IR sur les cellules stromales de la moelle osseuse et (2) de déterminer l'impact des altérations du stroma sur les fonctions hématopoïétiques. Ainsi, nous avons démontré pour la première fois que l'IR induit la sénescence des cellules stromales de la moelle osseuse chez la souris. Huit semaines après l'irradiation, on a constaté une diminution du nombre de BM-SC. Cet effet était spécifique à cette population, car le nombre de OB-SC était inchangé. L'utilisation de souris déficientes pour INK4a/ARF a révélé l'implication de ces deux protéines dans ce processus. Enfin, nous avons démontré que l'IR altère la lymphopoïèse B de manière cellulaire non-autonome et dépendante de INK4a/ARF (Carbonneau *et al.*, 2012). Nous avons aussi démontré que les modifications systémiques qui résultent de l'IR ou du vieillissement compromettent l'homéostasie osseuse en augmentant la résorption de l'os, sans toutefois diminuer la formation de celui-ci. Cet effet cellulaire non-autonome de l'IR sur les ostéoclastes est indépendant du secrétome des ostéoblastes sénescents qui a plutôt l'effet inverse (Carbonneau *et al.*, en préparation). Ces résultats originaux montrent les effets néfastes de l'IR utilisée dans les protocoles de conditionnement pour les transplantations de moelle osseuse. Ils ouvrent la porte au développement de stratégies visant à réduire ces effets et à la recherche de nouveaux traitements moins dommageables pour le microenvironnement osseux.

6.2. Les modèles de sénescence

6.2.1. L'irradiation corporelle totale

Nous avons choisi d'utiliser l'irradiation corporelle totale (TBI) comme modèle expérimental d'induction de la sénescence parce qu'elle mime une condition retrouvée chez les patients. En effet, la TBI est largement utilisée dans les protocoles de conditionnement précédant les transplantations de moelle osseuse (BMT)²²⁵. Par ailleurs, la population touchée va en grandissant puisque la BMT est en première ligne de traitement pour plusieurs cancers et désordres hématologiques²²⁶. L'induction de la sénescence par l'irradiation dans les cellules stromales de la moelle osseuse *in vitro* était déjà documentée lorsque nous avons entrepris cette étude¹⁴⁸. Toutefois, nous avons dû la confirmer *in vivo*, ce qui était le premier objectif de cette thèse et qui a été fait dans le chapitre 4.

Le modèle de TBI comporte toutefois certaines lacunes telles que l'altération de l'intégralité des systèmes de l'organisme. En effet, de par sa distribution globale, la TBI affecte toutes les cellules et organes pouvant ainsi modifier l'environnement systémique. Dans ce contexte, il n'est pas possible de conclure à un effet spécifique du microenvironnement osseux. Par exemple, le retard de croissance observé dans la population pédiatrique ayant reçu une TBI n'est pas dû à un effet direct sur l'os, mais plutôt à une altération de la sécrétion d'hormones de croissance par l'hypothalamus et l'hypophyse²²⁷. Afin de mieux circonscrire les effets liés au microenvironnement osseux, il serait possible d'avoir recours à une IR localisée au niveau d'une patte postérieure de la

souris. Ce modèle a l'avantage de permettre la comparaison avec la patte contra-latérale non irradiée de l'animal, ce qui limite la variabilité interindividuelle.

6.2.2. Le vieillissement

Nous avons également utilisé le vieillissement comme modèle de sénescence dans notre deuxième étude. Son intérêt réside dans le fait qu'il est représentatif d'une très grande proportion de la population. De plus, l'induction de la sénescence y a été confirmée au niveau du système hématopoïétique, du cerveau et du pancréas²¹⁷⁻²¹⁹. Enfin, il a été démontré que l'environnement systémique de rats et de souris âgés altère le potentiel régénératif des cellules souches au niveau du muscle^{228,229}.

Tout comme pour la TBI, le modèle de vieillissement ne permet pas de cibler le microenvironnement osseux. Par ailleurs, il n'est pas possible de le transposer *in vitro* puisque les cellules stromales sénescents ne prolifèrent pas. À l'opposé, il est possible d'induire la sénescence *in vitro* en irradiant les cellules stromales. Enfin, nous aurions pu utiliser un modèle génétique de dysfonction des télomères, soit les souris déficientes pour la télomérase (*Terc*^{-/-}), qui a démontré des résultats similaires à ceux que nous avons obtenus sur la lymphopoïèse B avec notre modèle de TBI⁷¹. Ce modèle a l'avantage d'induire la sénescence dans la quasi-totalité des cellules, permettant d'amplifier les effets physiologiques et limitant ainsi le risque de passer à côté d'un effet de faible amplitude. Par contre, l'attrait de ce modèle serait plus grand si la mutation pouvait être exprimée uniquement par les cellules stromales de la moelle osseuse. Il serait donc

intéressant de le combiner avec la technique de recombinaison *Cre-lox* ciblée grâce à des promoteurs spécifiques à chaque type cellulaire.

6.3. L'altération du nichage : pistes mécanistiques

Dans le cadre de cette thèse, nous avons démontré que l'IR altère le microenvironnement osseux et entraîne des défauts hématopoïétiques cellulaires non-autonomes. Plus précisément, nous avons démontré que la lymphopoïèse B et l'homéostasie osseuse (via la résorption par les ostéoclastes) sont affectées. De ce fait, il serait intéressant de vérifier l'impact de l'induction de la sénescence des cellules stromales de la moelle osseuse sur d'autres fonctions hématopoïétiques telles que le nichage qui est essentiel à la prise de greffe.

L'importance des cellules stromales en tant que niche pour les HSC a été démontrée de plusieurs façons, entre autres à l'aide de manipulations génétiques modifiant le nombre d'ostéoblastes³⁹. Nous avons également démontré que le nichage des cellules hématopoïétiques à la moelle osseuse est réduit une semaine après la TBI (Carbonneau *et al.*, 2012, Figure S2). Dans un tel contexte, il est possible que la prise de greffe hématopoïétique soit retardée ou compromise. Ainsi, il semble pertinent d'étudier dans quelle mesure l'irradiation altère le nichage.

Le nichage peut être décortiqué en deux étapes. En premier lieu, les cellules hématopoïétiques migrent dans la niche en réponse à des chimiokines sécrétées par le microenvironnement osseux. En second lieu, elles sont maintenues dans la niche par des

interactions avec des molécules d'adhésion présentes dans ce microenvironnement. Enfin, un troisième facteur peut agir indirectement sur le nichage, soit la présence d'agents qui induisent la mobilisation des cellules hématopoïétiques dans le sang (Figure 15). On a donc étudié l'effet de la sénescence sur (1) le pouvoir chemoattractant des cellules stromales, (2) leur potentiel de rétention des cellules hématopoïétiques et (3) leur niveau de production de facteurs mobilisateurs.

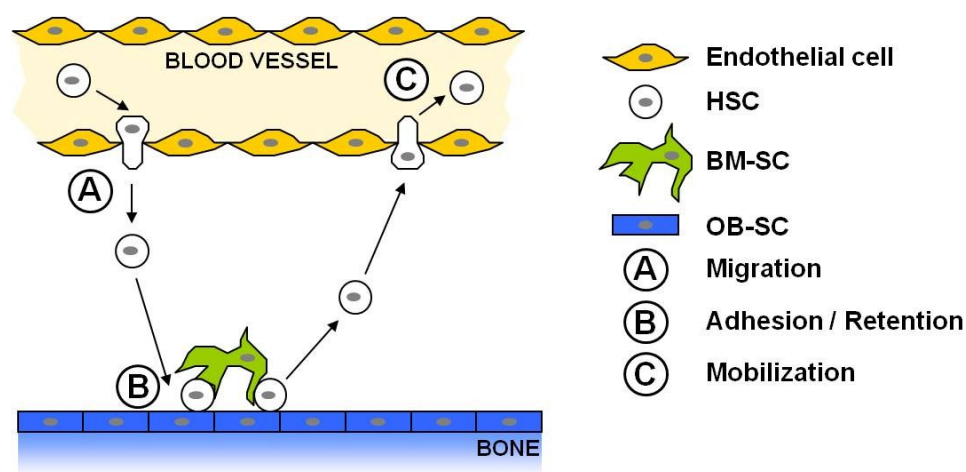


Figure 15: Étapes du nichage hématopoïétique

Le nichage est le résultat de (A) la migration des cellules hématopoïétiques en réponse à des chimiokines sécrétées par le microenvironnement osseux et de (B) leur rétention dans la niche par des interactions avec des molécules d'adhésion. Le nichage peut être contrôlé par (C) la présence d'agents induisant la mobilisation des cellules hématopoïétiques dans le sang.

6.3.1. La migration

Pour étudier le potentiel chemoattractant des cellules stromales de la moelle osseuse, nous avons recueilli le milieu conditionné (CM, en anglais pour *conditioned media*) produit pendant 24h par des cultures primaires de cellules stromales, 10 jours après qu'elles aient reçu ou non une IR de 10 Gy. Une attention particulière a été portée pour éliminer le sérum puisque ce dernier est un puissant inducteur de migration et aurait pu fausser les résultats. Nous avons aussi dilué les CM afin de normaliser la sécrétion pour un nombre de cellules donné. L'essai de migration consiste à mettre le CM dans un puits et à placer des cellules préalablement enrichies en KSL dans un insert à l'intérieur de ce puits (Figure 16A). Après 2 heures à 37°C, on compte le nombre de cellules ayant migré à travers la membrane poreuse pour se retrouver dans le puits du bas. Cette expérience a permis de constater que le pouvoir chemoattractant des cellules stromales sénescents était réduit de 66% (Figure 16B). Considérant les résultats de Wright et collègues selon lesquels les HSC ne migrent qu'envers le SDF-1 α ⁹¹, nous avons évalué les niveaux de cette chimiokine dans nos CM. Étonnamment, ils étaient inchangés (Figure 16C).

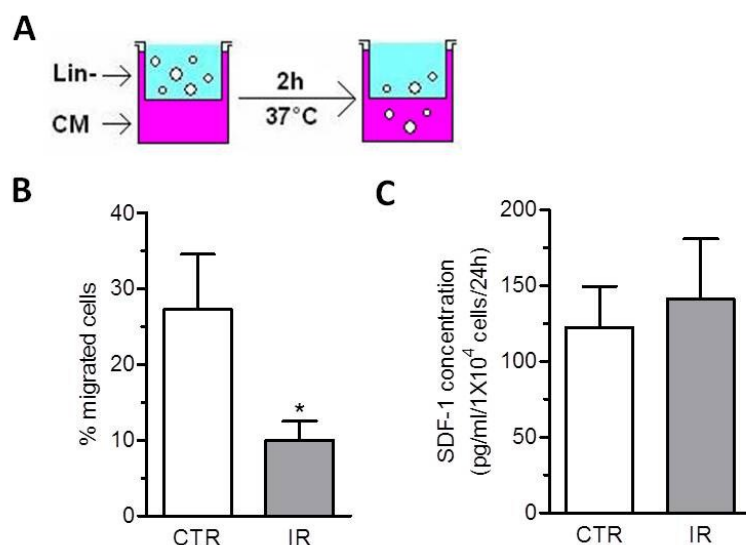


Figure 16: Réduction du pouvoir chemoattractant des cellules stromales sénescentes.

(A) Schéma représentatif de l'essai de migration. (B) Quantification (exprimée en pourcentage (%)) du nombre de cellules de type KSL (lin-) ayant migré après une incubation de 2 heures à 37°C envers du milieu conditionné (CM) de cellules stromales irradiées (IR) ou non (CTR). Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart-type à la moyenne (SEM, en anglais, pour *standard error of the mean*) de 7 cultures primaires de cellules stromales. La comparaison statistique avec le groupe témoin est indiquée par * $p < 0,05$. (C) Concentration (pg/ml) de SDF-1 α détectée dans le CM des cellules stromales CTR ou IR. Les données sont normalisées pour 10 000 cellules et exprimées sous forme de moyenne \pm SEM de 14 cultures primaires de cellules stromales.

Nous avons deux hypothèses pour expliquer cette situation. La première vient du fait que nous ne travaillons pas avec une population pure de HSC. Les travaux de Wright et collègues ont démontré la migration exclusive des LT-HSC et des ST-HSC envers le SDF-1 α ⁹¹. Par contre, nous travaillons avec des cellules enrichies ne contenant qu'environ 30% de KSL. Notre population contient des HPC et 70% de cellules matures qui sont connues pour migrer envers d'autres chimiokines telles que l'IL-8 et la protéine 1 chimiotactique des monocytes (MCP-1, en anglais, pour *monocyte chemotactic protein-1*) ⁹⁰. Il est possible que la réduction de migration observée soit effectivement indépendante du SDF-1 α et qu'elle reflète l'absence d'un autre facteur dans le CM des cellules sénescentes. Pour exclure l'implication du SDF-1 α , il serait envisageable de remplacer les cellules enrichies en KSL par des cellules hématopoïétiques qui ne migrent pas envers SDF-1 α comme les cellules de la lignée A001. On pourrait alors les transfecter avec le récepteur de cette chimiokine, le CXCR4, et observer les effets propres au SDF-1 α . Des résultats préliminaires ont démontré que les A001 modifiées pour exprimer le CXCR4 acquièrent la capacité de migrer envers du SDF-1 α (résultats non présentés).

La deuxième hypothèse est basée sur la production accrue d'enzymes protéolytiques dans le SASP ²³⁰. Celles-ci sont connues pour cliver le SDF-1 α et l'inactiver, causant ainsi une diminution de migration ^{231 232}. Comme l'anticorps utilisé en ELISA ne permet pas de discriminer entre la forme active et la forme inactive de la chimiokine (2-3 acides aminés en moins), ce phénomène est envisageable. Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions d'abord doser le SDF-1 α dans les CM de cellules

irradiées ou non. Il suffirait ensuite de diluer les CM pour obtenir la même concentration dans tous les échantillons et de tester leur pouvoir chemoattractant dans un essai de migration. Si le SDF-1 α présent dans le CM des cellules sénescents est effectivement inactif, on observera moins de migration. Nous ne pouvons toutefois pas exclure la possibilité de diluer une autre chimiokine et que ce soit cet effet que nous observons.

Alternativement, nous pourrions utiliser des inhibiteurs de protéases, ce qui devrait rétablir la migration envers le CM de cellules stromales sénescents. Le CD26 est connu pour inhiber la migration des HSC en clivant le SDF-1 α ²³¹ tandis que l'expression de plusieurs MMP est augmentée dans le SASP²³³. De plus, leur activité inhibe la migration des HSC²³⁴. Le Diprotin A et le GM-6001 pourraient donc être utilisés pour inhiber la peptidase CD26 et les métalloprotéinases (MMP), respectivement. Enfin, les carboxypeptidases M et N, la cathepsine G et l'élastase des neutrophiles clivent aussi le SDF-1 α ^{88,232,235,236}. Ainsi, avant de poursuivre avec des expériences impliquant plusieurs inhibiteurs, il serait important de déterminer les protéases qui sont surexprimées par les cellules stromales sénescents ou dans le microenvironnement osseux suite à l'irradiation.

6.3.2. L'adhésion

Pour étudier la capacité des cellules stromales à retenir les cellules hématopoïétiques dans la niche, nous avons effectué un essai d'adhésion. Brièvement, nous avons ensemencé des cultures primaires de cellules stromales à 100% de confluence, huit jours après qu'elles aient reçu ou non une IR de 10 Gy. Nous avons

ensuite attendu deux jours pour permettre aux molécules d'adhésion clivées par la trypsine d'être ré-exprimées à la membrane. Enfin, nous avons ajouté de la moelle osseuse fraîchement isolée et avons attendu 2 heures avant de récupérer délicatement les cellules non adhérentes. En comptant ces cellules, nous avons obtenu une lecture indirecte du nombre de cellules hématopoïétiques adhérentes aux stromas. Nous avons retrouvé 20% moins de cellules adhérentes aux cellules stromales sénescentes, un résultat qui est hautement significatif (Figure 17A). En marquant les cellules avec du PKH26, une molécule qui s'insère dans les membranes, il a été possible de visualiser cet effet (Figure 17B).

Nous nous sommes intéressés à deux molécules d'adhésion connues pour leur implication dans la rétention des HSC dans la niche, soit N-cad et VCAM-1. La délétion de N-cad entraîne une réduction du nichage²³⁷ tandis que le clivage de VCAM-1 induit la mobilisation des HSC⁸⁸. Par une réaction de polymérase en chaîne quantitative (qPCR, en anglais, pour *quantitative polymerase chain reaction*), nous avons constaté une diminution de 50% de l'acide ribonucléique messager (ARNm) de N-cad, mais pas de différence au niveau de VCAM-1 suite à l'induction de la sénescence dans les cellules stromales (Figure 16C). Par contre, au niveau protéique, il a été observé par immunobuvardage de type Western que ces deux molécules d'adhésion étaient réduites (Figure 16D). Ainsi, N-cad et VCAM-1 sont toutes deux diminuées à la membrane des cellules stromales sénescentes. Cet effet semble principalement survenir au niveau transcriptionnel pour N-cad, mais pas pour VCAM-1.

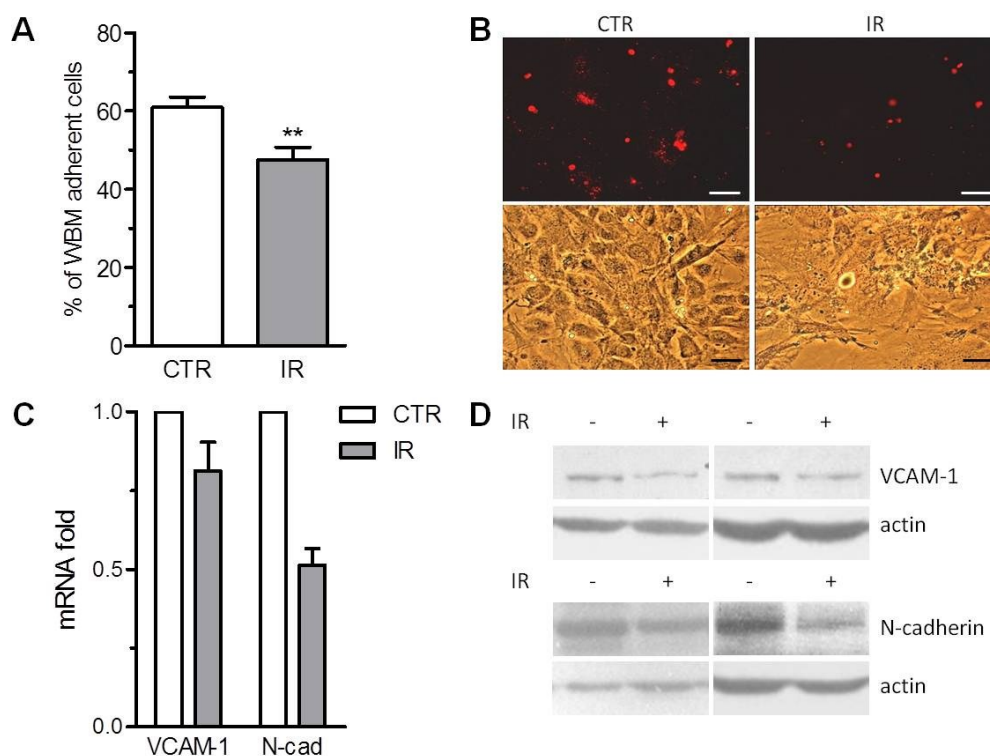


Figure 17: Réduction de la capacité de rétention des cellules hématopoïétiques par les cellules stromales sénescents.

(A) Quantification (exprimée en pourcentage (%)) du nombre de cellules hématopoïétiques adhérentes aux cellules stromales, irradiées (IR) ou non (CTR) 10 jours au préalable, après une incubation de 2 heures à 37°C. Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM de 6 cultures primaires de cellules stromales. La comparaison statistique avec le groupe témoin est indiquée par $**p < 0,01$. (B) Photographies représentatives de l'essai d'adhésion. Cellules hématopoïétiques marquées au PKH26 (rouge, panneaux supérieurs) qui sont adhérentes aux cellules stromales CTR ou IR (panneaux inférieurs) après les deux heures d'incubation. Échelle : 100

µm. (C) Niveaux d'expression d'ARNm de VCAM-1 et N-cad dans les cellules stromales CTR et IR. Les données sont normalisées en donnant la valeur arbitraire de 1 aux CTR et sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM de 6 et 8 cultures primaires de cellules stromales, respectivement. (D) Photos représentatives de la variation protéique de VCAM-1 et N-cad dans les cellules stromales irradiées (+) ou non (-). L'actine sert de contrôle interne pour la quantité totale de protéines utilisée dans l'essai.

Considérant l'augmentation des protéases associée au SASP, il serait intéressant d'investiguer la possibilité d'un clivage membranaire. Cette vérification pourrait être faite par cytométrie en flux, mais il est important de s'assurer que la technique utilisée pour décoller les cellules stromales adhérentes ne clivera pas VCAM-1. Une expérience préliminaire a démontré que l'utilisation d'accutase (un agent plus doux que la trypsine) permet la détection d'un signal positif sur les cellules stromales (résultats non présentés). Toutefois, très peu de cellules sont positives, ce qui crée un doute quant à l'éventualité d'un clivage partiel. Une confirmation par immunofluorescence serait donc souhaitable pour éviter toute ambiguïté. Il serait également intéressant de rétablir l'expression de ces deux protéines dans les cellules stromales sénescents pour confirmer leur implication dans la perte de rétention des cellules hématopoïétiques.

6.3.3. La mobilisation

Le G-CSF étant le principal agent mobilisateur endogène connu des HSC ²³⁸, nous nous y sommes attardés. En utilisant une technique ELISA, nous avons démontré une augmentation des niveaux circulants de G-CSF dans le plasma de souris, 12 semaines post-IR (Figure 18A). Une telle accumulation a aussi été notée dans un modèle de souris *Terc*^{-/-} ⁷¹. Elle a été associée à un effet de l'environnement, mais pas des cellules stromales. Il est toutefois probable qu'il s'agisse d'une limitation de la technique employée. En effet, Gupta et collègues ont démontré que les cellules stromales en culture ne sécrètent pas de G-CSF ²³⁹. Néanmoins, l'ajout de HSC stimule sa sécrétion par le stroma via un facteur soluble non identifié. Nous avons donc irradié ou non des cellules stromales à une dose de 10 Gy, puis nous avons attendu 10 jours pour l'installation du phénotype de sénescence. Ces cellules ont ensuite été mises en présence ou non de cellules hématopoïétiques enrichies en KSL et le CM a été recueilli. Enfin, nous avons dosé les niveaux de G-CSF sécrété. Tout comme les cellules *Terc*^{-/-}, nos cellules sénescents ne produisent pas ou très peu de G-CSF. Toutefois, la présence de cellules hématopoïétiques a stimulé sa sécrétion dans les deux conditions, mais davantage dans les cellules sénescents (Figure 18B). Ainsi, il est possible que les cellules stromales sénescents contribuent à l'accumulation de G-CSF vue dans le plasma des souris irradiées.

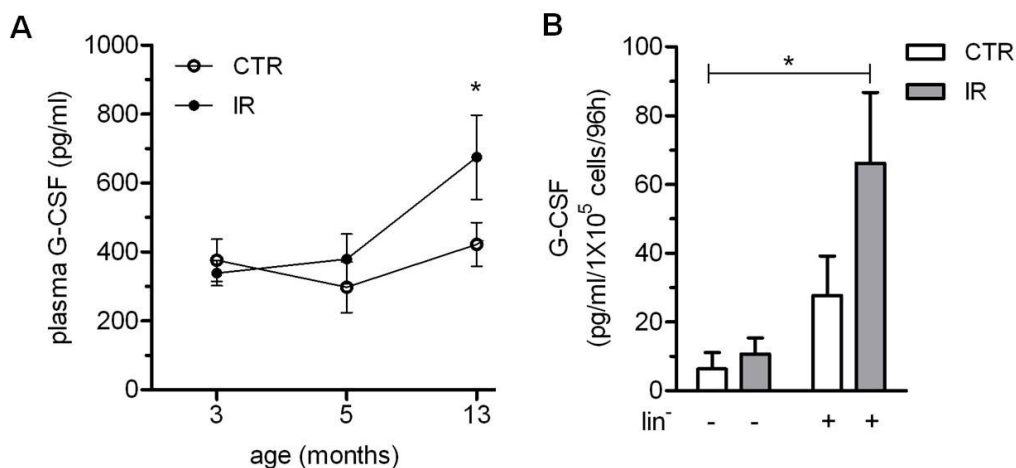


Figure 18: Accumulation de G-CSF dans le plasma de souris irradiées : possibilité d'une production par les cellules stromales sénescentes

(A) Suivi par ELISA des niveaux de G-CSF plasmatique (pg/ml) des souris irradiées (IR, ●) ou non (CTR, ○) à 8 Gy à l'âge de 2 mois. Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM de 7-9 souris par groupe. La comparaison statistique avec les souris de 3 mois est indiquée par * $p < 0,05$. (B) Quantification (pg/ml) des niveaux de G-CSF sécrété pendant quatre jours dans une culture de cellules stromales CTR ou IR en présence (+) ou non (-) de cellules de type KSL (lin⁻). Les données sont normalisées pour 100 000 cellules et exprimées sous forme de moyenne \pm SEM de 10 culture primaires de cellules stromales. La comparaison statistique avec le témoin est indiquée par * $p < 0,05$.

Il serait également intéressant d'étudier le mécanisme exact par lequel le G-CSF mobilise les HSC. Des études chez la souris²⁴⁰ et chez le singe rhésus²⁴¹ ont déterminé un pouvoir mobilisateur de l'IL-8. De plus, il a été démontré que cette chimiokine s'accumule en réponse au G-CSF²⁴². Enfin, l'IL-8 permettrait de mobiliser les HSC via la relâche de MMP par les neutrophiles matures²⁴³. Ce mécanisme semble prometteur dans le contexte de l'irradiation puisque l'IL-8 a été identifiée comme étant l'une des principales cytokines augmentée dans le SASP²³⁰. Par ailleurs, le G-CSF est aussi responsable de la formation des neutrophiles. Il est donc possible que l'augmentation chronique du G-CSF chez la souris entraîne une production accrue de ces cellules. Cette hypothèse est compatible avec l'observation d'une accumulation de cellules myéloïdes selon une cinétique comparable à celle de l'apparition du G-CSF dans le plasma de ces souris (Figure 19). L'effet de l'IL-8 sur les neutrophiles serait alors décupler, considérant l'accroissement de sa population cible. La production chronique et massive de MMP aurait pour effet de maintenir les HSC en circulation. Une telle accumulation de HSC n'a pas été démontrée suivant l'irradiation, mais elle est bien documentée dans le vieillissement¹⁰⁶.

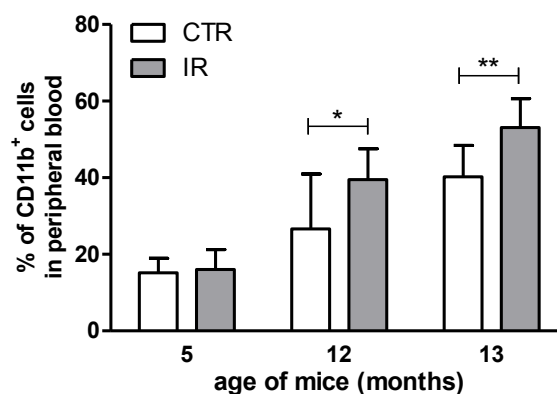


Figure 19: Accumulation de cellules myéloïdes dans le sang périphérique de souris irradiées depuis plus de 12 semaines

Suivi par cytométrie en flux de la proportion de cellules myéloïdes (CD11b⁺) dans le sang périphérique de souris irradiées (IR) ou non (CTR) à 8 Gy à l'âge de 2 mois. Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM de 7-9 souris par groupe. La comparaison statistique avec les souris de témoins est indiquée par * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

6.4. Stratégies pour favoriser le nichage

En condition physiologique, on retrouve des HSC en circulation dans le sang²⁰⁶. Il s'agit d'un processus dynamique de mobilisation et de nichage perpétuels. Ainsi, des HSC sont toujours disponibles pour combler une niche hématopoïétique déserte. Le nichage est également le concept qui sous-tend la BMT. Toutefois, indépendamment de la source de HSC injectées (sang de cordon, moelle osseuse, HSC mobilisées dans le

sang), très peu se retrouvent dans la moelle osseuse. Il est donc primordial d'optimiser cette fonction pour favoriser la prise de greffe et le maintien de l'hématopoïèse.

Plusieurs approches sont à l'étude pour améliorer le nichage. Certains ont développé des techniques d'expansion *ex vivo* des HSC afin de pouvoir injecter un plus grand nombre de cellules ²⁴⁴. D'autres ont traité les HSC avec un inhibiteur de CD26 pour diminuer le clivage de SDF-1 α ²⁴⁵. D'autres encore ont injecté les HSC directement dans la moelle osseuse pour éviter le besoin de nichage ²³⁸. Enfin, certains ont co-transplanté des cellules stromales avec les HSC en espérant restaurer le microenvironnement osseux et ses fonctions ²⁴⁶. Ces différentes techniques ont démontré une certaine efficacité, mais laissent toutefois place à l'amélioration.

Nous avons voulu développer une nouvelle stratégie pour favoriser le nichage. Comme l'IR altère le microenvironnement osseux, nous croyons qu'il est tout à fait indiqué de tenter de le restaurer. Étonnamment, les groupes qui ont travaillé sur la thérapie cellulaire à base de cellules stromales n'ont pas déterminé à quel point les améliorations observées rétablissent la fonction initiale. Dans un premier temps, nous avons confirmé que les cellules stromales améliorent le nichage par l'injection de OB-SC. Toutefois, l'effet observé dans les souris irradiées est loin de rétablir le nichage à des niveaux comparables à ceux obtenus normalement lors d'une BMT dans des souris non irradiées.

Nous avons donc cherché une façon de bonifier l'effet des cellules stromales injectées. Ce faisant, nous avons observé une augmentation des niveaux de G-CSF dans les éluats de fémurs de souris irradiées depuis 2 jours. Comme cette cytokine a un effet

mobilisateur, son élimination pourrait favoriser le nichage. Sur cette base, nous avons modifié génétiquement des OB-SC pour qu'ils expriment une forme soluble du récepteur du G-CSF. Une fois injectées, ces cellules sécrètent le récepteur inhibiteur qui emprisonne le G-CSF et l'empêche d'avoir un effet biologique. Cela se traduit par une amélioration du nichage de 90% comparativement à seulement 37% pour les OB-SC non modifiées. Ainsi, l'inhibition du G-CSF par un récepteur inhibiteur soluble semble une stratégie intéressante pour améliorer le nichage, Ces résultats originaux ont été soumis pour publication dans la revue *Blood* (Voir en annexe, section 15.0, Fortin *et al.*, 2012).

6.5. Le modèle d'ossification primaire

Nous avons utilisé un modèle d'implant sous-cutané composé de MSC adhérentes à des particules HA/TCP et mélangées à un gel de collagène de type I. Ce choix minimaliste a été fait afin que les effets observés puissent être attribuables aux cellules stromales uniquement. Ainsi, bien que l'ajout de cellules endothéliales ait démontré un effet bénéfique sur l'ossification¹³, nous avons volontairement exclu cette possibilité. En outre, nous aurions pu apporter certaines améliorations pour favoriser l'ossification. Par exemple, la réduction du volume de l'implant aurait pu permettre une vascularisation plus rapide et ainsi favoriser la survie des MSC. Il aurait aussi pu être avantageux d'augmenter la densité des MSC dans l'implant, un facteur qui s'est avéré essentiel pour la formation osseuse dans le modèle de chambre de diffusion¹⁰. D'ailleurs, il est possible que ce facteur est eu un impact sur nos résultats qui ont démontré une ossification non-uniforme dans plusieurs implants. En effet, l'implant était pipeté dans la cavité sous-

cutanée alors qu'il était encore sous forme liquide. Ainsi, il est fort probable que la densité cellulaire n'ait pas été homogène à travers tout l'implant au moment de sa solidification. Si tel est le cas, l'utilisation de *scaffolds* solides permettrait de remédier à cette limitation. Dans un autre ordre d'idées, l'hétérogénéité de la population de MSC pourrait aussi expliquer l'ossification non-uniforme. En effet, malgré leur capacité à former des CFU-F *in vitro*, certaines MSC n'ont pas la capacité de former de l'os *in vivo*⁵⁸. Ainsi, les zones non minéralisées pourraient être peuplées par ces cellules.

7.0. CONCLUSION

En conclusion, nous avons démontré, à l'aide d'un modèle de TBI chez la souris et de cultures primaires de cellules stromales irradiées, un/une :

1. Induction de la sénescence dans les cellules stromales de la moelle osseuse *in vivo*.
2. Sensibilité distincte des différentes populations de cellules stromales de la moelle osseuse à l'IR.
3. Implication de INK4a/ARF dans la diminution du nombre de BM-SC huit semaines après l'IR et dans l'altération de la lymphopoïèse B par les cellules stromales du microenvironnement osseux.
4. Effet cellulaire autonome de l'IR sur la formation osseuse par les cellules stromales.
5. Effet cellulaire non-autonome de l'IR et du vieillissement sur la résorption osseuse par les ostéoclastes. Cet effet est dû à l'environnement, mais est indépendant du sécrétome des cellules stromales ostéoblastiques sénescents.

RÉFÉRENCES

- 1 Hall, S. *Basic Biomechanics*. 5th edn, p.88 (2007).
- 2 Legros, R., Balmain, N. & Bonel, G. Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone. *Calcif Tissue Int* **41**, 137-144 (1987).
- 3 Mohan, S. & Baylink, D. J. Bone growth factors. *Clin Orthop Relat Res*, 30-48 (1991).
- 4 Young, M. F., Kerr, J. M., Ibaraki, K., Heegaard, A. M. & Robey, P. G. Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop Relat Res*, 275-294 (1992).
- 5 Henriksen, K., Neutzsky-Wulff, A. V., Bonewald, L. F. & Karsdal, M. A. Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone* **44**, 1026-1033 (2009).
- 6 Karsenty, G. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev* **13**, 3037-3051 (1999).
- 7 Brighton, C. T. & Hunt, R. M. Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **73**, 832-847 (1991).
- 8 Encyclopaedia-Britannica-Online. (2012).
- 9 Erlebacher, A., Filvaroff, E. H., Gitelman, S. E. & Derynck, R. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* **80**, 371-378 (1995).
- 10 Friedenstein, A. J., Piatetzky, S., II & Petrakova, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of embryology and experimental morphology* **16**, 381-390 (1966).
- 11 Petrakova, K. V. [Heterotopic Ossification in the Rat Kidney in Ischemia]. *Arkhiv anatomii, gistologii i embriologii* **44**, 112-116 (1963).
- 12 Chen, Y. *et al.* Human extramedullary bone marrow in mice: a novel in vivo model of genetically controlled hematopoietic microenvironment. *Blood* **119**, 4971-4980 (2012).
- 13 Kaigler, D. *et al.* Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential. *FASEB J* **19**, 665-667 (2005).
- 14 Sacchetti, B. *et al.* Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* **131**, 324-336 (2007).
- 15 Yin, T. & Li, L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest* **116**, 1195-1201 (2006).
- 16 Huang, X., Cho, S. & Spangrude, G. J. Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal. *Cell Death Differ* **14**, 1851-1859 (2007).
- 17 Muench, M. O. & Barcena, A. Stem cell transplantation in the fetus. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* **11**, 105-118 (2004).
- 18 Kondo, M., Weissman, I. L. & Akashi, K. Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow. *Cell* **91**, 661-672 (1997).
- 19 Morrison, S. J., Uchida, N. & Weissman, I. L. The biology of hematopoietic stem cells. *Annual review of cell and developmental biology* **11**, 35-71 (1995).
- 20 Morrison, S. J. & Kimble, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **441**, 1068-1074 (2006).
- 21 Wilson, A. & Trumpp, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* **6**, 93-106 (2006).
- 22 Muller-Sieburg, C. E., Sieburg, H. B., Bernitz, J. M. & Cattarossi, G. Stem cell heterogeneity: implications for aging and regenerative medicine. *Blood* **119**, 3900-3907 (2012).
- 23 Muller-Sieburg, C. E., Cho, R. H., Karlsson, L., Huang, J.-F. & Sieburg, H. B. Myeloid-biased hematopoietic stem cells have extensive self-renewal capacity but generate

- diminished lymphoid progeny with impaired IL-7 responsiveness. *Blood* **103**, 4111-4118 (2004).
- 24 Sudo, K., Ema, H., Morita, Y. & Nakauchi, H. Age-Associated Characteristics of Murine Hematopoietic Stem Cells. *The Journal of Experimental Medicine* **192**, 1273-1280 (2000).
- 25 Rossi, D. J. *et al.* Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9194-9199 (2005).
- 26 Spangrude, G. J., Heimfeld, S. & Weissman, I. L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* **241**, 58-62 (1988).
- 27 Schroeder, T. Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity: Subtypes, Not Unpredictable Behavior. *Cell Stem Cell* **6**, 203-207 (2010).
- 28 Suda, T., Takubo, K. & Semenza, G. L. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell* **9**, 298-310 (2011).
- 29 Passegue, E., Wagers, A. J., Giuriato, S., Anderson, W. C. & Weissman, I. L. Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J Exp Med* **202**, 1599-1611 (2005).
- 30 Larsson, J. & Karlsson, S. The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene* **24**, 5676-5692 (2005).
- 31 Nijweide, P. J., Burger, E. H. & Feyen, J. H. Cells of bone: proliferation, differentiation, and hormonal regulation. *Physiological reviews* **66**, 855-886 (1986).
- 32 Theill, L. E., Boyle, W. J. & Penninger, J. M. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annual review of immunology* **20**, 795-823 (2002).
- 33 Suda, T. *et al.* Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine reviews* **20**, 345-357 (1999).
- 34 Coetzee, M. & Kruger, M. C. Osteoprotegerin-receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand ratio: a new approach to osteoporosis treatment? *South Med J* **97**, 506-511 (2004).
- 35 Kiel, M. J. *et al.* SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells. *Cell* **121**, 1109-1121 (2005).
- 36 Coffman, R. L. & Weissman, I. L. B220: a B cell-specific member of the T200 glycoprotein family. *Nature* **289**, 681-683 (1981).
- 37 Solovjov, D. A., Pluskota, E. & Plow, E. F. Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. *J Biol Chem* **280**, 1336-1345 (2005).
- 38 Schofield, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**, 7-25 (1978).
- 39 Calvi, L. M. *et al.* Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**, 841-846 (2003).
- 40 Arai, F. *et al.* Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* **118**, 149-161 (2004).
- 41 Zhang, J. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**, 836-841 (2003).
- 42 Avecilla, S. T. *et al.* Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med* **10**, 64-71 (2004).

- 43 Parmar, K., Mauch, P., Vergilio, J.-A., Sackstein, R. & Down, J. D. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 5431-5436 (2007).
- 44 Li, J. Quiescence regulators for hematopoietic stem cell. *Exp Hematol* **39**, 511-520 (2011).
- 45 Kaplan, R. N., Psaila, B. & Lyden, D. Niche-to-niche migration of bone-marrow-derived cells. *Trends Mol Med* **13**, 72-81 (2007).
- 46 Becker, A. J., Mc, C. E. & Till, J. E. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* **197**, 452-454 (1963).
- 47 Siminovitch, L., McCulloch, E. A. & Till, J. E. The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Physiol* **62**, 327-336 (1963).
- 48 Friedenstein, A. J. *et al.* Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* **2**, 83-92 (1974).
- 49 Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F. & Kulagina, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* **4**, 267-274 (1976).
- 50 da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C. & Nardi, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* **119**, 2204-2213 (2006).
- 51 Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H. & Bieback, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* **24**, 1294-1301 (2006).
- 52 Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A. & McKercher, S. R. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* **290**, 1779-1782 (2000).
- 53 Ross, S. E. *et al.* Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* **289**, 950-953 (2000).
- 54 Caplan, A. I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of Cellular Physiology* **213**, 341-347 (2007).
- 55 Block, G. J. *et al.* Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1. *Stem Cells* **27**, 670-681 (2009).
- 56 Landry, Y., Lê, O., Mace, K. A., Restivo, T. E. & Beauséjour, C. M. Secretion of SDF-1 α by bone marrow-derived stromal cells enhances skin wound healing of C57BL/6 mice exposed to ionizing radiation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **14**, 1594-1604 (2010).
- 57 Ferrari, G. *et al.* Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* **279**, 1528-1530 (1998).
- 58 Kuznetsov, S. A. *et al.* Single-Colony Derived Strains of Human Marrow Stromal Fibroblasts Form Bone After Transplantation In Vivo. *Journal of Bone and Mineral Research* **12**, 1335-1347 (1997).
- 59 Wan, C., He, Q., McCaigue, M., Marsh, D. & Li, G. Nonadherent cell population of human marrow culture is a complementary source of mesenchymal stem cells (MSCs). *J Orthop Res* **24**, 21-28 (2006).
- 60 Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147 (1999).
- 61 Mendez-Ferrer, S. *et al.* Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **466**, 829-834 (2010).
- 62 Simmons, P. J. & Torok-Storb, B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* **78**, 55-62 (1991).

- 63 Gronthos, S., Graves, S. E., Ohta, S. & Simmons, P. J. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* **84**, 4164-4173 (1994).
- 64 Morikawa, S. *et al.* Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med* **206**, 2483-2496 (2009).
- 65 Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S. & Robey, P. G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* **19**, 180-192 (2001).
- 66 Akune, T. *et al.* PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* **113**, 846-855 (2004).
- 67 Kawaguchi, H. *et al.* Distinct effects of PPARgamma insufficiency on bone marrow cells, osteoblasts, and osteoclastic cells. *J Bone Miner Metab* **23**, 275-279 (2005).
- 68 Ali, A. A. *et al.* Rosiglitazone causes bone loss in mice by suppressing osteoblast differentiation and bone formation. *Endocrinology* **146**, 1226-1235 (2005).
- 69 Bennett, C. N. *et al.* Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3324-3329 (2005).
- 70 Krishnan, V., Bryant, H. U. & Macdougald, O. A. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* **116**, 1202-1209 (2006).
- 71 Ju, Z. *et al.* Telomere dysfunction induces environmental alterations limiting hematopoietic stem cell function and engraftment. *Nature Medicine* **13**, 742-747 (2007).
- 72 Sun, S. *et al.* Isolation of Mouse Marrow Mesenchymal Progenitors by a Novel and Reliable Method. *Stem Cells* **21**, 527-535 (2003).
- 73 Trentin, J. J. Determination of bone marrow stem cell differentiation by stromal hemopoietic inductive microenvironments (HIM). *Am J Pathol* **65**, 621-628 (1971).
- 74 Lotinun, S., Evans, G. L., Turner, R. T. & Oursler, M. J. Deletion of membrane-bound steel factor results in osteopenia in mice. *J Bone Miner Res* **20**, 644-652 (2005).
- 75 Barker, J. E. Early transplantation to a normal microenvironment prevents the development of Steel hematopoietic stem cell defects. *Exp Hematol* **25**, 542-547 (1997).
- 76 Visnjic, D. *et al.* Conditional ablation of the osteoblast lineage in Col2.3deltat_k transgenic mice. *J Bone Miner Res* **16**, 2222-2231 (2001).
- 77 Visnjic, D. *et al.* Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* **103**, 3258-3264 (2004).
- 78 Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. & Nagasawa, T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* **25**, 977-988 (2006).
- 79 Nie, Y., Han, Y. C. & Zou, Y. R. CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J Exp Med* **205**, 777-783 (2008).
- 80 Del Fattore, A., Capannolo, M. & Rucci, N. Bone and bone marrow: The same organ. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **503**, 28-34 (2010).
- 81 Warr, M. R., Pietras, E. M. & Passegué, E. Mechanisms controlling hematopoietic stem cell functions during normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* **3**, 681-701 (2011).
- 82 Stier, S. *et al.* Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med* **201**, 1781-1791 (2005).
- 83 Nilsson, S. K. *et al.* Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* **106**, 1232-1239 (2005).

- 84 Mazzon, C. *et al.* The critical role of agrin in the hematopoietic stem cell niche. *Blood* **118**, 2733-2742 (2011).
- 85 Papayannopoulou, T. & Nakamoto, B. Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA4 integrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9374-9378 (1993).
- 86 Christopherson, K. W., 2nd, Cooper, S. & Broxmeyer, H. E. Cell surface peptidase CD26/DPPIV mediates G-CSF mobilization of mouse progenitor cells. *Blood* **101**, 4680-4686 (2003).
- 87 Christopherson, K. W., Cooper, S., Hangoc, G. & Broxmeyer, H. E. CD26 is essential for normal G-CSF-induced progenitor cell mobilization as determined by CD26^{-/-} mice. *Exp Hematol* **31**, 1126-1134 (2003).
- 88 Levesque, J. P., Takamatsu, Y., Nilsson, S. K., Haylock, D. N. & Simmons, P. J. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **98**, 1289-1297 (2001).
- 89 Levesque, J. P., Hendy, J., Winkler, I. G., Takamatsu, Y. & Simmons, P. J. Granulocyte colony-stimulating factor induces the release in the bone marrow of proteases that cleave c-KIT receptor (CD117) from the surface of hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* **31**, 109-117 (2003).
- 90 Lapidot, T. & Petit, I. Current understanding of stem cell mobilization: The roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Experimental Hematology* **30**, 973-981 (2002).
- 91 Wright, D. E., Bowman, E. P., Wagers, A. J., Butcher, E. C. & Weissman, I. L. Hematopoietic Stem Cells Are Uniquely Selective in Their Migratory Response to Chemokines. *The Journal of Experimental Medicine* **195**, 1145-1154 (2002).
- 92 Nilsson, S. K., Johnston, H. M. & Coverdale, J. A. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood* **97**, 2293-2299 (2001).
- 93 Takahashi, N. *et al.* Role of colony-stimulating factors in osteoclast development. *Journal of Bone and Mineral Research* **6**, 977-985 (1991).
- 94 Suda, T., Takahashi, N. & Martin, T. J. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocrine reviews* **13**, 66-80 (1992).
- 95 Takahashi, N. *et al.* Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* **123**, 2600-2602 (1988).
- 96 Kong, Y. Y. *et al.* Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* **402**, 304-309 (1999).
- 97 Nakashima, T. *et al.* Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* **17**, 1231-1234 (2011).
- 98 Xiong, J. *et al.* Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med* **17**, 1235-1241 (2011).
- 99 Normanno, N. *et al.* Gefitinib inhibits the ability of human bone marrow stromal cells to induce osteoclast differentiation: implications for the pathogenesis and treatment of bone metastasis. *Endocr Relat Cancer* **12**, 471-482 (2005).
- 100 Gori, F. *et al.* The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology* **141**, 4768-4776 (2000).
- 101 Li, Y. *et al.* B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood* **109**, 3839-3848 (2007).

- 102 Walkley, C. R. *et al.* A Microenvironment-Induced Myeloproliferative Syndrome
Caused by Retinoic Acid Receptor γ Deficiency. *Cell* **129**, 1097-1110 (2007).
- 103 Raaijmakers, M. H. G. P. *et al.* Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia
and secondary leukaemia. *Nature* **464**, 852-857 (2010).
- 104 Guerrouahen, B. S., Al-Hijji, I. & Tabrizi, A. R. Osteoblastic and vascular endothelial
niches, their control on normal hematopoietic stem cells, and their consequences on
the development of leukemia. *Stem cells international* **2011**, 375857 (2011).
- 105 Mayack, S. R., Shadrach, J. L., Kim, F. S. & Wagers, A. J. Systemic signals regulate
ageing and rejuvenation of blood stem cell niches. *Nature* **463**, 495-500 (2010).
- 106 Liang, Y., Van Zant, G. & Szilvassy, S. J. Effects of aging on the homing and
engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **106**, 1479-
1487 (2005).
- 107 Hayflick, L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*
37, 614-636 (1965).
- 108 Campisi, J. & d'Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to
good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 729-740 (2007).
- 109 d'Adda di Fagagna, F. *et al.* A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated
senescence. *Nature* **426**, 194-198 (2003).
- 110 Harley, C. B., Futcher, A. B. & Greider, C. W. Telomeres shorten during ageing of
human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-460 (1990).
- 111 Chan, S. W., Chang, J., Prescott, J. & Blackburn, E. H. Altering telomere structure
allows telomerase to act in yeast lacking ATM kinases. *Curr Biol* **11**, 1240-1250
(2001).
- 112 Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P., Chen, D. J. & Sedivy, J. M. Telomere shortening
triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and
p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* **14**, 501-513 (2004).
- 113 Takai, H., Smogorzewska, A. & de Lange, T. DNA damage foci at dysfunctional
telomeres. *Curr Biol* **13**, 1549-1556 (2003).
- 114 Beausejour, C. M. *et al.* Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and
p16 pathways. *EMBO J* **22**, 4212-4222 (2003).
- 115 Bartkova, J. *et al.* Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier
imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444**, 633-637 (2006).
- 116 Di Micco, R. *et al.* Oncogene-induced senescence is a DNA damage response
triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**, 638-642 (2006).
- 117 Mallette, F. A., Gaumont-Leclerc, M. F. & Ferbeyre, G. The DNA damage signaling
pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev* **21**, 43-48
(2007).
- 118 Wang, Y., Schulte, B. A., LaRue, A. C., Ogawa, M. & Zhou, D. Total body irradiation
selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. *Blood* **107**, 358-366
(2006).
- 119 Coppe, J. P. *et al.* Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-
nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS*
biology **6**, 2853-2868 (2008).
- 120 Wada, T. *et al.* MKK7 couples stress signalling to G2/M cell-cycle progression and
cellular senescence. *Nat Cell Biol* **6**, 215-226 (2004).
- 121 Olsen, C. L., Gardie, B., Yaswen, P. & Stampfer, M. R. Raf-1-induced growth arrest in
human mammary epithelial cells is p16-independent and is overcome in immortal
cells during conversion. *Oncogene* **21**, 6328-6339 (2002).

- 122 Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology* **11**, 298-300 (1956).
- 123 Sohal, R. S. & Orr, W. C. The redox stress hypothesis of aging. *Free Radic Biol Med* **52**, 539-555 (2012).
- 124 Ray, P. D., Huang, B. W. & Tsuji, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling* **24**, 981-990 (2012).
- 125 Kipling, D. & Cooke, H. J. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* **347**, 400-402 (1990).
- 126 Parrinello, S. *et al.* Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* **5**, 741-747 (2003).
- 127 Packer, L. & Fuehr, K. Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. *Nature* **267**, 423-425 (1977).
- 128 Bladier, C., Wolvetang, E. J., Hutchinson, P., de Haan, J. B. & Kola, I. Response of a primary human fibroblast cell line to H₂O₂: senescence-like growth arrest or apoptosis? *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* **8**, 589-598 (1997).
- 129 Chen, Q. & Ames, B. N. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 4130-4134 (1994).
- 130 Gao, F. H. *et al.* Oridonin induces apoptosis and senescence by increasing hydrogen peroxide and glutathione depletion in colorectal cancer cells. *International journal of molecular medicine* **29**, 649-655 (2012).
- 131 Lee, A. C. *et al.* Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem* **274**, 7936-7940 (1999).
- 132 Muteliefu, G. *et al.* Indoxyl sulfate promotes vascular smooth muscle cell senescence with upregulation of p53, p21 and prelamin A through oxidative stress. *American journal of physiology. Cell physiology* (2012).
- 133 Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. & Lowe, S. W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**, 593-602 (1997).
- 134 Huot, T. J. *et al.* Biallelic mutations in p16(INK4a) confer resistance to Ras- and Ets-induced senescence in human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* **22**, 8135-8143 (2002).
- 135 Lin, A. W. *et al.* Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* **12**, 3008-3019 (1998).
- 136 Zhu, J., Woods, D., McMahon, M. & Bishop, J. M. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev* **12**, 2997-3007 (1998).
- 137 Courtois-Cox, S. *et al.* A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* **10**, 459-472 (2006).
- 138 Chen, Z. *et al.* Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436**, 725-730 (2005).
- 139 Braig, M. *et al.* Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **436**, 660-665 (2005).
- 140 Sugrue, M. M., Shin, D. Y., Lee, S. W. & Aaronson, S. A. Wild-type p53 triggers a rapid senescence program in human tumor cells lacking functional p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9648-9653 (1997).
- 141 Ventura, A. *et al.* Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* **445**, 661-665 (2007).

- 142 Xue, W. *et al.* Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in
murine liver carcinomas. *Nature* **445**, 656-660 (2007).
- 143 Canadian-Nuclear-Association. *Canadian Nuclear Association*,
<[http://www.cna.ca/curriculum/cna_bio_effects_rad/introduction-
eng.asp?bc=Introduction&pid=Introduction](http://www.cna.ca/curriculum/cna_bio_effects_rad/introduction-eng.asp?bc=Introduction&pid=Introduction)> (2012).
- 144 USNRC, t. t. c. *Reactor concepts manual/biological effects of radiation*,
<<http://www.nrc.gov/reading-rm/basic-ref/teachers/09.pdf>> (
- 145 Piersma, A. H., Brockbank, K. G., Ploemacher, R. E. & Ottenheim, C. P. Recovery of
hemopoietic stromal progenitor cells after lethal total-body irradiation and bone
marrow transplantation in mice. *Transplantation* **40**, 198-201 (1985).
- 146 Galotto, M. *et al.* Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy
in bone marrow transplant recipients. *Exp Hematol* **27**, 1460-1466 (1999).
- 147 Rombouts, W. J. & Ploemacher, R. E. Primary murine MSC show highly efficient
homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia* **17**,
160-170 (2003).
- 148 Zhang, K. J. *et al.* [Mechanism of radiation induced premature senescence of bone
marrow stromal cells: experiment with murine bone marrow stromal cells].
Zhonghua Yi Xue Za Zhi **86**, 3431-3434 (2006).
- 149 Meng, A., Wang, Y., Van Zant, G. & Zhou, D. Ionizing radiation and busulfan induce
premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells. *Cancer Res* **63**,
5414-5419 (2003).
- 150 Bergonie, J. & Tribondeau, L. Interpretation of some results of radiotherapy and an
attempt at determining a logical technique of treatment. *Radiat Res* **11**, 587-588
(1959).
- 151 Coutard, H. The Results and Methods of Treatment of Cancer by Radiation. *Annals of
surgery* **106**, 584-598 (1937).
- 152 Barrett, A. Total body irradiation before bone marrow transplantation: a review. *Clin
Radiol* **33**, 131-135 (1982).
- 153 Mauch, P. *et al.* Hematopoietic stem cell compartment: acute and late effects of
radiation therapy and chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **31**, 1319-1339
(1995).
- 154 Laver, J. Radiobiological properties of human hematopoietic and stromal marrow
cells. *International journal of cell cloning* **7**, 203-212 (1989).
- 155 Alexander, K., Yang, H. S. & Hinds, P. W. Cellular senescence requires CDK5
repression of Rac1 activity. *Mol Cell Biol* **24**, 2808-2819 (2004).
- 156 Zhang, H., Pan, K. H. & Cohen, S. N. Senescence-specific gene expression fingerprints
reveal cell-type-dependent physical clustering of up-regulated chromosomal loci.
Proc Natl Acad Sci U S A **100**, 3251-3256 (2003).
- 157 Dimri, G. P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in
aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9363-9367 (1995).
- 158 Brunk, U., Ericsson, J. L., Ponten, J. & Westermarck, B. Residual bodies and "aging" in
cultured human glia cells. Effect of entrance into phase 3 and prolonged periods of
confluence. *Exp Cell Res* **79**, 1-14 (1973).
- 159 Robbins, E., Levine, E. M. & Eagle, H. Morphologic changes accompanying senescence
of cultured human diploid cells. *J Exp Med* **131**, 1211-1222 (1970).
- 160 Lee, B. Y. *et al.* Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-
galactosidase. *Aging Cell* **5**, 187-195 (2006).

- 161 Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y. & Erusalimsky, J. D. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* **113 (Pt 20)**, 3613-3622 (2000).
- 162 Chen, Q. M., Liu, J. & Merrett, J. B. Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H2O2 response of normal human fibroblasts. *Biochem J* **347**, 543-551 (2000).
- 163 Tepper, C. G., Seldin, M. F. & Mudryj, M. Fas-mediated apoptosis of proliferating, transiently growth-arrested, and senescent normal human fibroblasts. *Exp Cell Res* **260**, 9-19 (2000).
- 164 Hampel, B., Malisan, F., Niederegger, H., Testi, R. & Jansen-Durr, P. Differential regulation of apoptotic cell death in senescent human cells. *Exp Gerontol* **39**, 1713-1721 (2004).
- 165 Campisi, J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends in Cell Biology* **11**, S27-S31 (2001).
- 166 Mason, D. X., Jackson, T. J. & Lin, A. W. Molecular signature of oncogenic ras-induced senescence. *Oncogene* **23**, 9238-9246 (2004).
- 167 Shelton, D. N., Chang, E., Whittier, P. S., Choi, D. & Funk, W. D. Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol* **9**, 939-945 (1999).
- 168 Trougakos, I. P., Saridaki, A., Panayotou, G. & Gonos, E. S. Identification of differentially expressed proteins in senescent human embryonic fibroblasts. *Mech Ageing Dev* **127**, 88-92 (2006).
- 169 Yoon, I. K. *et al.* Exploration of replicative senescence-associated genes in human dermal fibroblasts by cDNA microarray technology. *Exp Gerontol* **39**, 1369-1378 (2004).
- 170 Braig, M. & Schmitt, C. A. Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development. *Cancer Res* **66**, 2881-2884 (2006).
- 171 Stein, G. H., Drullinger, L. F., Robetorye, R. S., Pereira-Smith, O. M. & Smith, J. R. Senescent cells fail to express cdc2, cycA, and cycB in response to mitogen stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11012-11016 (1991).
- 172 Wang, W. *et al.* Neural cell cycle dysregulation and central nervous system diseases. *Progress in neurobiology* **89**, 1-17 (2009).
- 173 Acosta, J. C. *et al.* Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* **133**, 1006-1018 (2008).
- 174 Kuilman, T. *et al.* Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell* **133**, 1019-1031 (2008).
- 175 Wajapeyee, N., Serra, R. W., Zhu, X., Mahalingam, M. & Green, M. R. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* **132**, 363-374 (2008).
- 176 Coppé, J.-P. *et al.* Tumor Suppressor and Aging Biomarker p16INK4a Induces Cellular Senescence without the Associated Inflammatory Secretory Phenotype. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 36396-36403 (2011).
- 177 Niida, H. & Nakanishi, M. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* **21**, 3-9 (2006).
- 178 Harper, J. W. & Elledge, S. J. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* **28**, 739-745 (2007).
- 179 Ciccia, A. & Elledge, S. J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* **40**, 179-204 (2010).
- 180 Costes, S. V., Chiolo, I., Pluth, J. M., Barcellos-Hoff, M. H. & Jakob, B. Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to

- chromatin organization. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **704**, 78-87 (2010).
- 181 Sikora, E., Arendt, T., Bennett, M. & Narita, M. Impact of cellular senescence
signature on ageing research. *Ageing Research Reviews* **10**, 146-152 (2011).
- 182 Le, O. N. L. *et al.* Ionizing radiation-induced long-term expression of senescence
markers in mice is independent of p53 and immune status. *Aging Cell* **9**, 398-409
(2010).
- 183 Rodier, F. & Campisi, J. Four faces of cellular senescence. *The Journal of Cell Biology*
192, 547-556 (2011).
- 184 Crescenzi, E., Palumbo, G. & Brady, H. J. Bcl-2 activates a programme of premature
senescence in human carcinoma cells. *Biochem J* **375**, 263-274 (2003).
- 185 Rebbaa, A., Zheng, X., Chou, P. M. & Mirkin, B. L. Caspase inhibition switches
doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene* **22**, 2805-2811 (2003).
- 186 Seluanov, A. *et al.* Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in
response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53. *Mol Cell Biol* **21**,
1552-1564 (2001).
- 187 Narita, M. *et al.* Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F
Target Genes during Cellular Senescence. *Cell* **113**, 703-716 (2003).
- 188 Coutu, D. L. & Galipeau, J. Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence
and aging. *Aging* **3**, 920-933 (2011).
- 189 NCBI. (2012).
- 190 NCBI. (2012).
- 191 Quelle, D. E., Zindy, F., Ashmun, R. A. & Sherr, C. J. Alternative reading frames of the
INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing
cell cycle arrest. *Cell* **83**, 993-1000 (1995).
- 192 Gil, J. & Peters, G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all
for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 667-677 (2006).
- 193 Serrano, M. *et al.* Role of the INK4a Locus in Tumor Suppression and Cell Mortality.
Cell **85**, 27-37 (1996).
- 194 Ohtani, N. *et al.* Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression
during cellular senescence. *Nature* **409**, 1067-1070 (2001).
- 195 Stein, G. H., Drullinger, L. F., Souldard, A. & Dulic, V. Differential roles for cyclin-
dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and
differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* **19**, 2109-2117 (1999).
- 196 Pavletich, N. P. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of
Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* **287**, 821-828
(1999).
- 197 Flemington, E. K., Speck, S. H. & Kaelin, W. G., Jr. E2F-1-mediated transactivation is
inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product.
Proc Natl Acad Sci U S A **90**, 6914-6918 (1993).
- 198 Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S. J. The p21 Cdk-
interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**,
805-816 (1993).
- 199 Xiong, Y. *et al.* p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701-704
(1993).
- 200 Zhang, H., Hannon, G. J. & Beach, D. p21-containing cyclin kinases exist in both active
and inactive states. *Genes Dev* **8**, 1750-1758 (1994).
- 201 Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. & Oren, M. Mdm2 promotes the rapid degradation of
p53. *Nature* **387**, 296-299 (1997).

- 202 Honda, R., Tanaka, H. & Yasuda, H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for
tumor suppressor p53. *FEBS Lett* **420**, 25-27 (1997).
- 203 Pomerantz, J. *et al.* The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with
MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* **92**, 713-723 (1998).
- 204 Weber, J. D., Taylor, L. J., Roussel, M. F., Sherr, C. J. & Bar-Sagi, D. Nucleolar Arf
sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* **1**, 20-26 (1999).
- 205 Dimri, G. P. What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell* **7**, 505-512
(2005).
- 206 Wright, D. E., Wagers, A. J., Gulati, A. P., Johnson, F. L. & Weissman, I. L. Physiological
migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* **294**, 1933-1936
(2001).
- 207 Gray-Schopfer, V. C. *et al.* Cellular senescence in naevi and immortalisation in
melanoma: a role for p16? *Br J Cancer* **95**, 496-505 (2006).
- 208 Michaloglou, C. *et al.* BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of
human naevi. *Nature* **436**, 720-724 (2005).
- 209 Dankort, D. *et al.* A new mouse model to explore the initiation, progression, and
therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev* **21**, 379-384 (2007).
- 210 Ha, L. *et al.* ARF functions as a melanoma tumor suppressor by inducing p53-
independent senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10968-10973 (2007).
- 211 Young, A. R. & Narita, M. SASP reflects senescence. *EMBO reports* **10**, 228-230
(2009).
- 212 Campisi, J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens,
bad neighbors. *Cell* **120**, 513-522 (2005).
- 213 Hornsby, P. J. Cellular senescence and tissue aging in vivo. *The journals of*
gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences **57**, B251-256 (2002).
- 214 Kim, W. Y. & Sharpless, N. E. The Regulation of INK4/ARF in Cancer and Aging. *Cell*
127, 265-275 (2006).
- 215 Jeyapalan, J. C., Ferreira, M., Sedivy, J. M. & Herbig, U. Accumulation of senescent cells
in mitotic tissue of aging primates. *Mech Ageing Dev* **128**, 36-44 (2007).
- 216 Krishnamurthy, J. *et al.* Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest*
114, 1299-1307 (2004).
- 217 Janzen, V. *et al.* Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor
p16INK4a. *Nature* **443**, 421-426 (2006).
- 218 Krishnamurthy, J. *et al.* p16INK4a induces an age-dependent decline in islet
regenerative potential. *Nature* **443**, 453-457 (2006).
- 219 Molofsky, A. V. *et al.* Increasing p16INK4a expression decreases forebrain
progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* **443**, 448-452 (2006).
- 220 Chang, E. & Harley, C. B. Telomere length and replicative aging in human vascular
tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11190-11194 (1995).
- 221 Hou, Z. *et al.* Osteoblast-specific gene expression after transplantation of marrow
cells: implications for skeletal gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7294-7299
(1999).
- 222 Price, J. S. *et al.* The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell* **1**,
57-65 (2002).
- 223 Vasile, E., Tomita, Y., Brown, L. F., Kocher, O. & Dvorak, H. F. Differential expression
of thymosin beta-10 by early passage and senescent vascular endothelium is
modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of
atherosclerosis. *FASEB J* **15**, 458-466 (2001).

- 224 Longo, V. D. & Finch, C. E. Evolutionary Medicine: From Dwarf Model Systems to Healthy Centenarians? *Science* **299**, 1342-1346 (2003).
- 225 Copelan, E. A. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med* **354**, 1813-1826 (2006).
- 226 Dumas, A. *et al.* Bone mass and microarchitecture of irradiated and bone marrow-transplanted mice: influences of the donor strain. *Osteoporosis International* **20**, 435-443 (2009).
- 227 Gupta, T., Kannan, S., Dantkale, V. & Laskar, S. Cyclophosphamide plus total body irradiation compared with busulfan plus cyclophosphamide as a conditioning regimen prior to hematopoietic stem cell transplantation in patients with leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* **4**, 17-29 (2011).
- 228 Carlson, B. M. & Faulkner, J. A. Muscle transplantation between young and old rats: age of host determines recovery. *The American journal of physiology* **256**, C1262-1266 (1989).
- 229 Conboy, I. M. *et al.* Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* **433**, 760-764 (2005).
- 230 Freund, A., Orjalo, A. V., Desprez, P. Y. & Campisi, J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med* **16**, 238-246 (2010).
- 231 Christopherson, K. W., 2nd, Hangoc, G. & Broxmeyer, H. E. Cell surface peptidase CD26/dipeptidylpeptidase IV regulates CXCL12/stromal cell-derived factor-1 alpha-mediated chemotaxis of human cord blood CD34+ progenitor cells. *J Immunol* **169**, 7000-7008 (2002).
- 232 Marquez-Curtis, L. *et al.* Carboxypeptidase M expressed by human bone marrow cells cleaves the C-terminal lysine of stromal cell-derived factor-1alpha: another player in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization? *Stem Cells* **26**, 1211-1220 (2008).
- 233 Coppe, J. P. *et al.* A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS ONE* **5**, e9188 (2010).
- 234 McQuibban, G. A. *et al.* Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem* **276**, 43503-43508 (2001).
- 235 Davis, D. A. *et al.* Identification of carboxypeptidase N as an enzyme responsible for C-terminal cleavage of stromal cell-derived factor-1alpha in the circulation. *Blood* **105**, 4561-4568 (2005).
- 236 Delgado, M. B. *et al.* Rapid inactivation of stromal cell-derived factor-1 by cathepsin G associated with lymphocytes. *Eur J Immunol* **31**, 699-707 (2001).
- 237 Hosokawa, K. *et al.* Knockdown of N-cadherin suppresses the long-term engraftment of hematopoietic stem cells. *Blood* **116**, 554-563 (2010).
- 238 Suarez-Alvarez, B., Lopez-Vazquez, A. & Lopez-Larrea, C. Mobilization and homing of hematopoietic stem cells. *Adv Exp Med Biol* **741**, 152-170 (2012).
- 239 Gupta, P., Blazar, B. R., Gupta, K. & Verfaillie, C. M. Human CD34(+) bone marrow cells regulate stromal production of interleukin-6 and granulocyte colony-stimulating factor and increase the colony-stimulating activity of stroma. *Blood* **91**, 3724-3733 (1998).
- 240 Hulstaert, F. *et al.* Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. II. Varying kinetics of percentage and absolute count measurements. *Clinical immunology and immunopathology* **70**, 152-158 (1994).

- 241 Laterveer, L. *et al.* Rapid mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by a single intravenous injection of interleukin-8. *Blood* **87**, 781-788 (1996).
- 242 Watanabe, T. *et al.* Endogenous interleukin-8 (IL-8) surge in granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral blood stem cell mobilization. *Blood* **93**, 1157-1163 (1999).
- 243 Fibbe, W. E. *et al.* Biology of IL-8-induced stem cell mobilization. *Ann N Y Acad Sci* **872**, 71-82 (1999).
- 244 Boitano, A. E. *et al.* Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science* **329**, 1345-1348 (2010).
- 245 Christopherson, K. W., 2nd, Hangoc, G., Mantel, C. R. & Broxmeyer, H. E. Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26. *Science* **305**, 1000-1003 (2004).
- 246 Chan, S. L. *et al.* Enhanced in vivo homing of uncultured and selectively amplified cord blood CD34+ cells by cotransplantation with cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. *Stem Cells* **25**, 529-536 (2007).

CHAPITRE IV

ANNEXE

8.0. ARTICLE 3**A SOLUBLE G-CSF DECOY RECEPTOR AS A NOVEL TOOL TO INCREASE HEMATOPOIETIC
CELL HOMING AND RECONSTITUTION IN MICE**

Audrey Fortin^{1,2}, Basma Benabdallah^{1,2}, Cynthia L. Carbonneau^{1,2}, Élie Haddad³ and
Christian M. Beauséjour^{1,2}

¹ Centre de recherche du CHU Ste-Justine, ² Département de pharmacologie, ³
Département de microbiologie-immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec,
Canada

*Correspondence: Christian M. Beauséjour

Accepted in *Stem Cells and Development* on 12/03/2012. MS ID#: SCD-2012-0438.R1

ABSTRACT

The relative ineffectiveness of hematopoietic stem cells in reaching the bone marrow upon transplantation combined with the limited number of these cells available is a major reason for graft failure and delayed hematopoietic recovery. Hence, the development of strategies that could enhance homing is of high interest. Here, we provide evidence that homing is severely impaired post exposure to ionizing radiation (IR) in mice, an effect we found was time-dependent and could be partially rescued using mesenchymal stromal cell (MSC) therapy. In an attempt to further increase homing, we took advantage of our observation that G-CSF, a cytokine known to induce cell mobilization, is increased in the marrow of mice shortly after their exposure to IR. As such, we developed a truncated, yet functional, soluble G-CSF receptor (solG-CSFR) which we hypothesized could act as a decoy and foster homing. Using MSC or conditioned media as delivery vehicles, we show that an engineered solG-CSFR has the potential to increase homing and hematopoietic reconstitution in mice. Altogether, our results provide novel findings at the interplay of IR and stromal cell therapy and present the regulation of endogenous G-CSF as an innovative proof of concept strategy to manipulate hematopoietic cell homing.

Keywords: mesenchymal stromal cells, hematopoietic homing, ionizing radiation, G-CSF, cell therapy