

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

**WNT4 RÉGULE LE MÉTABOLISME MITOCHONDRIAL DES MACROPHAGES ET  
CONTRIBUE AU MAINTIEN DES CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES**

Par  
Mouna Tlili

Thèse présentée pour l'obtention du grade  
de Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
en virologie et immunologie

**Jury d'évaluation**

Président du jury et  
examineur interne

Maritza Jaramillo  
INRS-Institut Armand Frappier

Examineur externe

Frédéric Antoine Mallette  
Université de Montréal  
Département de biochimie et médecine  
moléculaire

Examineur externe

Simon-Pierre Gravel  
Université de Montréal  
Faculté de pharmacie

Directeur de recherche

Krista Heinonen  
INRS-Institut Armand Frappier

« Peu importe que la voie menant à l'objectif soit directe ou tortueuse »

Habib Bourguiba – 3 mars 1965

## REMERCIEMENTS

Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidé pendant l'élaboration de ma thèse notamment ma directrice de recherche la professeure Krista Heinonen de m'avoir offert l'opportunité de faire partie de son équipe. Je veux lui témoigner toute ma gratitude pour sa flexibilité dans l'orientation des projets et de m'avoir permis de mener les recherches dans des axes qui étaient dans certains cas différents de ce qui était établi au début. Je tiens aussi à la remercier pour son soutien, sa disponibilité et ses conseils durant l'élaboration de ma thèse.

Je remercie le professeur Marc Germain de l'Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR) pour sa collaboration dans le projet du métabolisme des macrophages. L'apport de son expertise a contribué à valider et à approfondir la partie métabolique et elle est grandement appréciée.

Je remercie le Pr Albert Descoteaux pour sa contribution dans l'élaboration de l'aspect expérimental des infections des macrophages aux *leishmanias* et je remercie également son étudiant au doctorat Hamlet Acevado Ospina de m'avoir aidé dans ce projet en prenant en charge la partie expérimentale des infections des macrophages.

Je remercie Jessy Tremblay le responsable de la plateforme de cytométrie en flux et de la microscopie confocale de m'avoir formé et assisté durant les expériences. Ainsi que toutes les personnes de l'INRS (étudiants / professeurs / employés) avec lesquelles j'ai partagé ces années et qui ont contribué de loin ou de près à la poursuite de mes projets de thèse.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mes parents qui sans eux rien ne serait possible. Je les remercie de m'avoir encouragée à entamer mes études universitaires en biologie médicale au Canada. Ensuite, de m'avoir soutenue dans la poursuite de mon cursus académique jusqu'au doctorat. Je remercie particulièrement ma mère pour son soutien inestimable. Je remercie également Ismaïl pour sa patience, son soutien et ses encouragements durant le doctorat.

Je finis en remerciant la Pre Maritza Jaramillo, le Pr Frédérick Antoine Mallette et le Pr Simon-Pierre Gravel d'avoir accepté de faire partie de mon jury d'évaluation de thèse.

## RÉSUMÉ

Les voies de signalisation des Wnt sont impliquées dans le développement embryonnaire, dans la régulation de la prolifération cellulaire et dans la différenciation tissulaire à forte capacité de renouvellement comme le système hématopoïétique. Les voies de signalisation des Wnt contribuent au maintien et à la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Cependant, la source et la fonction des ligands Wnt ainsi que les voies intracellulaires qu'ils activent dépendent du contexte et du type cellulaire. Par exemple les ligands Wnt5a et Wnt3a contribuent à l'activation des macrophages et dirigent leur polarisation en un profil inflammatoire (M1) ou anti-inflammatoire (M2), respectivement. De plus, Wnt3a est un prototype de la voie canonique (dépendante de la  $\beta$ -caténine), tandis que Wnt5a est un prototype de la voie non-canonique. Ces voies ont des effets opposés sur le maintien des CSH. Cette thèse se concentre sur l'étude du ligand non-canonique Wnt4. Il a été montré qu'une surexpression de Wnt4 augmente le nombre de précurseurs myéloïdes dans la moelle osseuse (MO). Cependant, le rôle de Wnt4 dans les macrophages et les CSH n'est pas encore connu.

Bien que les macrophages M1 sont glycolytiques et que les macrophages M2 ont un métabolisme mitochondrial actif, l'impact de Wnt4 dans ces changements métaboliques demeure inconnu. Afin de caractériser le rôle de Wnt4, nous avons généré des macrophages déficients en *Wnt4* (*Wnt4*<sup>-/-</sup>) qui présentent une diminution de l'activité des protéines AKT (Thr308) et ERK (Thr202/Tyr204) ainsi qu'une augmentation de l'activité mitochondriale décrite par une augmentation des niveaux ATP et une augmentation de la consommation d'oxygène. En outre, l'augmentation de l'activité de la lipase acide lysosomale (LAL) et la diminution des gouttelettes lipidiques indiquent que les lipides sont les principaux substrats utilisés par le métabolisme mitochondrial. D'un point de vue fonctionnel, les macrophages *Wnt4*<sup>-/-</sup> favorisent la survie du parasite *Leishmania donovani* qui est une fonction associée à un profil M2. Les macrophages sont aussi impliqués dans la rétention des CSH dans la MO. L'absence de Wnt4 dans les CSH ralentit leur cycle cellulaire menant à la diminution de leur autorenouvellement tandis que la délétion de Wnt4 dans les cellules myéloïdes n'altère pas la fonction des CSH, donc le rôle de Wnt4 est intrinsèque aux CSH.

En conclusion, nous avons montré un nouveau rôle métabolique et fonctionnel du ligand Wnt4 dans le contrôle du métabolisme des macrophages et du maintien des CSH dans la MO.

Mot clés : Wnt4, macrophages, CSH, métabolisme, lipide, hématopoïèse, autorenouvellement

## ABSTRACT

The Wnt signaling pathways are involved in cell fate decisions during embryogenesis, and remain important for the regulation of cell proliferation and differentiation in tissues with high turnover rate, such as the hematopoietic system. Wnt signaling contributes to the maintenance of haematopoietic stem cells (HSCs) and the development and maturation of most if not all different blood cell lineages. However, the source and identity of the most important Wnt ligands, and the specific intracellular signaling pathways they activate, are highly dependent on context and cell type. For example, the ligands Wnt5a and Wnt3a contribute to macrophage activation and direct their polarisation into an inflammatory (M1) or anti-inflammatory (M2) profile, respectively. Wnt5a and Wnt3 also activate different downstream signaling pathways: while Wnt3a is considered the prototypical canonical ( $\beta$ -catenin-dependent) ligand, Wnt5a activates a  $\beta$ -catenin-independent non-canonical pathway. Canonical and non-canonical Wnt signaling pathways have also opposing effects on HSC self-renewal. This thesis focuses on the non-canonical ligand Wnt4. It was previously shown that overexpression of Wnt4 increases the number of myeloid precursors in the bone marrow (BM), suggesting a potential increase in macrophage differentiation. However, the role of Wnt4 in macrophages or in HSCs remains unknown.

Macrophage polarization is associated with metabolic changes. Glycolysis is favored in the M1 profile, and mitochondrial metabolism is attributed to the M2 profile, but the impact of Wnt4 in regulating these processes is not well established. We therefore generated Wnt4-deficient (Wnt4<sup>-/-</sup>) macrophages and observed decreased AKT (Thr308) and ERK (Thr202/Tyr204) phosphorylation and an increased mitochondrial activity as seen by oxygen consumption and ATP production. In addition, the increase in lysosomal acid lipase (LAL) activity and decrease in intracellular lipid quantity indicate that lipids were the main substrates used by mitochondrial metabolism. The absence of Wnt4 also promoted parasite growth during infection with *Leishmania donovani*, which is normally associated with an M2 profile. Macrophages are also involved in HSC retention in the haematopoietic niche within the BM. Although the absence of Wnt4 in HSCs promoted the expression of cell cycle inhibitors and lead to decreased HSC self-renewal, myeloid-restricted Wnt4 deletion had no significant impact on HSC function, indicating that the role of Wnt4 in HSCs was more likely cell-intrinsic.

In conclusion, we have shown a new metabolic and functional role of Wnt4 ligand in the control of macrophage metabolism and HSC maintenance inside the BM.

Key words: Wnt4, macrophages, HSC, metabolism, lipid, haematopoiesis, self-renewal

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>iii</b>
<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>vi</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>x</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>xii</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1 INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
1.1 Les macrophages .....	1
1.2 Découverte des macrophages.....	1
1.3 Origines des macrophages.....	3
1.4 Polarisation des macrophages .....	8
1.4.1 Macrophages classiquement activés (M1) .....	13
1.4.2 Macrophages alternativement activés (M2).....	20
1.4.3 Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) .....	25
1.5 Le métabolisme énergétique .....	28
1.5.1 Métabolisme des macrophages M1 .....	30
1.5.2 Métabolisme des macrophages M2 .....	40
1.5.3 Le métabolisme des macrophages M1/M2.....	46
1.6 Les cellules souches hématopoïétiques .....	47
1.7 La niche hématopoïétique .....	49
1.7.1 La niche endostéale.....	51
1.7.2 La niche vasculaire .....	52
1.8 L'effet des ROS sur l'activité des cellules souches hématopoïétiques .....	55
1.9 Les cellules souches hématopoïétiques et l'inflammation .....	58
1.10 La famille des protéines Wnt .....	60
1.11 La sécrétion et le transport des protéines Wnt .....	61
1.12 Les voies de signalisation des ligands Wnt .....	63
1.12.1 La voie canonique ( $\beta$ -caténine dépendante) .....	63
1.12.2 La voie de signalisation PCP « planar cell polarity » .....	64

1.12.3	La voie Wnt/Ca <sup>2+</sup> .....	65
1.13	Les ligands Wnt dans les macrophages et les cellules souches hématopoïétiques .....	67
1.14	Les voies de signalisation de Wnt4/Fzd6 .....	71
1.15	Rôles physiologiques de Wnt4 .....	72
1.16	Hypothèses et objectifs .....	75
1.16.1	Premier projet .....	75
1.16.2	Deuxième projet.....	75
<b>2</b>	<b>WNT4 RÉGULE LE MÉTABOLISME MITOCHONDRIAL DES MACROPHAGES .....</b>	<b>77</b>
2.1	Introduction.....	78
2.2	Materials and methods .....	80
2.2.1	Experimental animals.....	80
2.2.2	Flow cytometry analysis .....	80
2.2.3	Cell culture.....	80
2.2.4	Immunofluorescence.....	81
2.2.5	Enzymatic activity .....	81
2.2.6	ATP and lactate assays .....	82
2.2.7	Elisa TNF $\alpha$ .....	82
2.2.8	Glucose consumption .....	82
2.2.9	Nitric oxide quantification .....	82
2.2.10	Mitosox .....	82
2.2.11	Tetramethylrhodamine, methyl ester (TMRM) .....	83
2.2.12	Extracellular flux analysis.....	83
2.2.13	<i>Leishmania donovani</i> culture and infections.....	83
2.2.14	Western Blot (WB) .....	84
2.2.15	Statistical analysis.....	84
2.3	Results .....	84
2.3.1	Wnt4 promotes AKT (Thr308) and ERK signaling .....	84
2.3.2	<i>Wnt4</i> deficiency increases ATP production through oxidative phosphorylation ..	88
2.3.3	Lipolysis is enhanced in <i>Wnt4</i> <sup><math>\Delta/\Delta</math></sup> macrophages .....	91
2.3.4	<i>Wnt4</i> <sup><math>\Delta/\Delta</math></sup> BMDM show increased $\beta$ -oxidation .....	94
2.3.5	Wnt4 is not required for the inflammatory response induced by LPS stimulation	97

2.3.6	Wnt4 deficiency promotes <i>Leishmania donovani</i> growth .....	99
2.4	Discussion .....	101
<b>3</b>	<b>WNT4 MAINTIENT L'AUTORENOUVELLEMENT DES CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES .....</b>	<b>105</b>
3.1	Introduction.....	106
3.2	Materials and methods .....	108
3.2.1	Experimental Animals .....	108
3.2.2	Flow cytometry.....	108
3.2.3	Cell sorting.....	109
3.2.4	qRT-PCR.....	109
3.2.5	Colony assays .....	110
3.2.6	Mitochondrial reactive oxygen and membrane potential.....	110
3.2.7	Real time metabolic analysis.....	110
3.2.8	Senescence-associated $\beta$ -galactosidase assay .....	110
3.2.9	Bone marrow cytokine analysis.....	111
3.2.10	Statistical analysis.....	111
3.3	Results .....	119
3.3.1	Hematopoietic <i>Wnt4</i> deficiency perturbs lymphocyte development .....	119
3.3.2	<i>Wnt4</i> <sup>Δ/Δ</sup> HSCs display impaired self-renewal and long-term reconstitution .....	125
3.3.3	Wnt4 deletion impairs CD150 <sup>+</sup> LSK expansion upon LPS stimulation .....	128
3.3.4	<i>Wnt4</i> deficiency in the myeloid lineage is not sufficient to interfere with lymphopoiesis or LPS-induced HSC expansion .....	131
3.3.5	<i>Wnt4</i> deficiency alters the expression of cell cycle regulators .....	134
3.3.6	Wnt4 is dispensable for short-term recovery but promotes the function of stem-cell-like progenitors after sub-lethal irradiation .....	136
3.4	Discussion .....	141
3.5	Conclusion.....	144
<b>4</b>	<b>DISCUSSION ET CONCLUSIONS .....</b>	<b>145</b>
4.1	Les systèmes LysM-Cre et Vav-iCre .....	145
4.2	Le rôle de Wnt4 dans les macrophages .....	147
4.3	Le rôle de Wnt4 dans les cellules souches hématopoïétiques .....	151
4.4	Conclusions générales .....	155



4.4.1	Les souris LysM-Cre .....	155
4.4.2	Les souris Vav-iCre.....	156
4.4.3	Conclusion générale .....	156
<b>5</b>	<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>157</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Ontogénie des macrophages dérivés des monocytes.....	5
Figure 1.2	Le développement de l'hématopoïèse dans un modèle murin.....	7
Figure 1.3	Les voies de signalisation activées par le complexe M-CSF/CSF-1R.....	10
Figure 1.4	La différenciation des Th0 et la polarisation des macrophages .....	13
Figure 1.5	La signalisation de l'IFN $\gamma$ dans les macrophages.....	15
Figure 1.6	La voie de sécrétion de TNF $\alpha$ .....	17
Figure 1.7	Le métabolisme de la L-arginine.....	19
Figure 1.8	Les macrophages M1.....	20
Figure 1.9	La voie de signalisation d'IL-4/IL-13 dans les M2a.....	22
Figure 1.10	Schéma illustrant les différents profils des macrophages alternatifs M2.....	25
Figure 1.11	Les marqueurs et les fonctions des TAM .....	28
Figure 1.12	La production d'ATP par le métabolisme mitochondrial et la glycolyse.....	29
Figure 1.13	Modélisation de la chaîne de transport d'électrons et des inhibiteurs des différents complexes .....	30
Figure 1.14	Le métabolisme du glucose .....	32
Figure 1.15	Le métabolisme mitochondrial des macrophages M1 .....	40
Figure 1.16	Le métabolisme mitochondrial des macrophages M2 .....	45
Figure 1.17	Résumé du métabolisme des M1 .....	46
Figure 1.18	Résumé du métabolisme des macrophages M1/M2 .....	47
Figure 1.19	L'hématopoïèse.....	49
Figure 1.20	Anatomie de l'os long.....	50
Figure 1.21	La niche hématopoïétique (Zhang et al., 2019a) .....	54
Figure 1.22	L'influence des ROS sur l'activité des cellules souches hématopoïétiques .....	57
Figure 1.23	L'activité des cellules souches hématopoïétiques dans un environnement inflammatoire .. .....	60
Figure 1.24	La voie de sécrétion et de transport des ligands Wnt.....	62
Figure 1.25	Les voies de signalisation des Wnt adapté de (Ruan et al., 2020).....	66
Figure 2.1	Endogenous Wnt4 promotes AKT (Thr308) and ERK1/2 phosphorylation in macrophages.....	87
Figure 2.2	Loss of Wnt4 does not significantly alter resting macrophage phenotype.....	87
Figure 2.3	Wnt4 deletion increases mitochondrial energy metabolism .....	90
Figure 2.4	Wnt4 deletion decreases glycolysis and intracellular lipid storage.....	92
Figure 2.5	Autophagy is not involved in lysosomal lipolysis in Wnt4-deficient BMDM .....	93
Figure 2.6	Wnt4 deletion enhances $\beta$ -oxidation.....	96
Figure 2.7	<i>Wnt4</i> <sup><math>\Delta/\Delta</math></sup> BMDM mount a strong metabolic and pro-inflammatory response to LPS. ....	98

Figure 2.8	Wnt4 deletion promotes <i>Leishmania donovani</i> survival.....	100
Figure 3.1	Hematopoietic Wnt4 is required for efficient lymphopoiesis .....	120
Figure 3.2	Wnt4 is efficiently ablated in hematopoietic cells but expressed in thymic stroma .....	121
Figure 3.3	<i>Wnt4<sup>Δ/Δ</sup></i> HSPCs are present in normal numbers but contain fewer functional lymphocyte precursors. ....	122
Figure 3.4	Steady-state progenitor cell analysis templates .....	123
Figure 3.5	Hematopoietic cell-intrinsic Wnt4 promotes BM reconstitution and HSC self-renewal ..	126
Figure 3.6	Post-transplant peripheral blood analysis template .....	127
Figure 3.7	LPS stimulation affects <i>Wnt4<sup>Δ/Δ</sup></i> HSC expansion .....	129
Figure 3.8	Cytokine profile in bone marrow supernatant .....	130
Figure 3.9	HSC expansion is independent of Wnt4 depletion in myeloid cells .....	132
Figure 3.10	Mice with myeloid-specific Wnt4-deletion have normal hematolymphopoiesis .....	133
Figure 3.11	Wnt4 depletion enforces p16INK4A expression and promotes HSC quiescence .....	135
Figure 3.12	Metabolic and cell cycle analysis. ....	136
Figure 3.13	Wnt4 promotes functional recovery of stem-like progenitors with high proliferative potential .....	138
Figure 3.14	Wnt4 is dispensable for short-term hematopoietic recovery after sub-lethal irradiation...	140

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Les différents facteurs produits par les macrophages en culture en présence de M-CSF ou de GM-CSF.....	8
Tableau 1.2	Le rôle des ligands Wnt dans la polarisation des macrophages .....	67
Tableau 1.3	Les fonctions des ligands Wnt dans les cellules souches hématopoïétiques.....	70
Tableau 3.1	Supplemental Table 1. List of antibodies used for flow cytometry. ....	111
Tableau 3.2	Supplemental Table 2. TaqMan gene expression assays used for qRT-PCR ..	117

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACO2	Aconitase 2
AKT	Protein kinase B
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
Atg	<i>Autophagy-related proteins</i>
ATGL	<i>Adipose triglyceride lipase</i>
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosine triphosphate
BCR	<i>B-cell receptor</i>
BID	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
CCL11	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 11</i>
CCL16	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 16</i>
CCL2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
CCL21	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 21</i>
CIC	<i>Citrate transporter</i>
CK-1 $\alpha$	Caseine kinase 1 alpha
CLP	<i>Common lymphoid progenitor</i>
CMH I	Complexe majeur d'histocompatibilité I
CMHII	Complexe majeur d'histocompatibilité II
CMP	<i>Common myeloid progenitor</i>
COL22A1	Collagène XXII
CpG	Cytosine–phosphate–guanine
CPT-1	Carnitine palmitoyltransferase I
CSF-1R	<i>Colony stimulating factor 1 receptor</i>

CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
Dally	<i>Division abnormally delayed</i>
DAP12	<i>DNAX-activation protein 12</i>
DARC	<i>Duffy antigen receptor for chimiokine</i>
Dly	<i>Dally-like</i>
ECAR	<i>Extracellular acidification rate</i>
ECSIT	<i>Evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways</i>
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
ETC	<i>Electron transport chain</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable region</i>
FCCP	Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
Fmi	Flamingo
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GEF	<i>Guanine Exchange Factor</i>
GLUT	<i>Glucose transporter</i>
GSH	<i>Reduced form of glutathion</i>
GSK-3 $\beta$	Glycogène synthase kinase 3 $\beta$
GSSG	<i>Oxydized form of glutathion</i>
HIF-1 $\alpha$	<i>Hypoxia-inducible factor 1 alpha</i>
HSL	<i>Hormone-sensitive lipase</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN $\gamma$	Interféron gamma
IFN- $\alpha$	Interféron alpha
IFN- $\beta$	Interféron bêta
IFN- $\omega$	Interféron omega
IFN- $\tau$	Interféron Thêta

IL-1 $\beta$	Interleukine 1 beta
IL-1RA	<i>Interleukin 1 receptor antagonist</i>
IL-4	Interleukine 4
IL-4R	Interleukine 4 receptor
IL-6	Interleukine 6
IL-10	Interleukine 10
IL-12	Interleukine 12
IL-13	Interleukine 13
IL-13R $\alpha$ 2	<i>Interleukin 13 receptor alpha 2</i>
IL-18	Interleukine 18
IL-23	Interleukine 23
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
IP-10	<i>Interferon <math>\gamma</math>-induced protein 10 kDa</i>
IRF1	<i>Interferon regulatory factor 1</i>
IRF4	<i>Interferon regulatory factor 4</i>
IRS-2	<i>Insulin receptor substrate 1</i>
JNK	N-terminale c-Jun
LAL	<i>Lysosomal acid lipase</i>
LAMP-1	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>
LC3-II	<i>Microtubule-associated protein light chain 3 phosphatidylethanolamine conjugate</i>
LEF	<i>Lymphoid enhancer-binding factor</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LysM	Lysozyme M
M-CSF	<i>Monocyte colony-stimulating factor</i>
MerTK	<i>Myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase</i>

MIG	<i>Monokine induced by gamma interferon</i>
MIP-1 $\beta$	<i>Macrophage inflammatory protein 1 beta</i>
MMP-2	<i>Matrix metalloproteinase 2</i>
MMP-7	<i>Matrix metalloproteinase 7</i>
MMP-8	<i>Matrix metalloproteinase 8</i>
MMP-9	<i>Matrix metalloproteinase 9</i>
MPL	<i>Myeloproliferative leukemia virus</i>
MTCH2	<i>Mitochondrial Carrier Homologue-2</i>
mTORC1	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
mTORC2	<i>Mammalian target of rapamycin complex 2</i>
NADPH	<i>Reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
Notch	<i>Neurogenic locus notch homolog protein</i>
OCR	<i>Oxygen consumption rate</i>
PDH	<i>Pyruvate dehydrogenase</i>
PDK2	<i>Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 2</i>
PDK4	<i>Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 4</i>
PFK	Phosphofructokinase
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
Pk	Prickle
PKM2	<i>Pyruvate kinase isozyme M2</i>
PLOD2	<i>Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2</i>
PPAR $\gamma$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptors gamma</i>



Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor Kappa-B ligand</i>
Rho	$\rho$ factor
Ror2	<i>Receptor tyrosine kinase-like orphan receptors 2</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RyK	<i>Receptor tyrosine kinase</i>
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SDH	Succinate dehydrogénase
SFRP	<i>Secreted frizzled- related protein</i>
SLAM	<i>Signaling lymphocyte activation molecule</i>
STAT1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
STAT6	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
SYNT4	Syntaxin 4
TCF	<i>T-cell factor</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TIMP-1	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase 1</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TRAF6	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
TYRO3	<i>Tyrosine-protein kinase receptor 3</i>
VAMP3	<i>Vesicle-associated membrane protein 3</i>
VANGL	Van Gogh-like
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VCAN	Versican
Wls/Evi	Wntless/evenness interrupted



# 1 INTRODUCTION

---

## 1.1 Les macrophages

Les macrophages sont des cellules mononucléaires myéloïdes appartenant à l'immunité innée. Ils sont à la première ligne de défense face aux pathogènes (Hirayama et al., 2017). De plus, les macrophages sont des cellules phagocytaires professionnelles, résidentes dans tous les organes, afin de maintenir l'intégrité des tissus. En raison de leur capacité de phagocytose, de destruction et de sécrétion, les macrophages sont aptes à participer à l'immunité innée et adaptative. En effet, ils sont des cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T naïfs, et permettent ainsi leur activation (Gordon and Pluddemann, 2017, Wang et al., 2013). De plus, ils amorcent le processus de réparation tissulaire à la suite d'une blessure ou d'une réponse à une infection (Gordon and Taylor, 2005). En outre, ils éliminent les débris cellulaires et les cellules apoptotiques résultant du remodelage tissulaire (Kono and Rock, 2008). Cependant, ils ont un rôle homéostatique indépendant de leur implication dans la réponse immunitaire. En effet, ils phagocytent  $\approx 2 \times 10^{11}$  érythrocytes chaque jour, ce qui équivaut à environ trois kilos de fer et d'hémoglobines recyclés chaque année par l'hôte. Ce processus a une contribution métabolique vitale (Mosser and Edwards, 2008). En résumé, la fonction des macrophages est indispensable aux processus immunitaires sans lesquels l'hôte ne peut survivre face aux menaces, qu'elles soient mineures ou de plus haute importance.

## 1.2 Découverte des macrophages

Les macrophages ont été découverts par Ilya Ilich Metchnikoff (1845-1916) (Tan and Dee, 2009). Zoologiste et embryologiste de formation (Korzh and Bregestovski, 2016, Cooper, 2008, Cavaillon, 2011), sa découverte fut fortuite. Il était intrigué par les relations phylogénétiques et voulait y apporter une plus grande compréhension à travers l'étude de l'embryologie des espèces invertébrées. Il affirmait qu'une compréhension des structures anatomiques des embryons et de leurs fonctions pourrait être une piste prometteuse pour la compréhension de l'anatomie adulte et de la physiologie. Ceci était le point de départ de la conceptualisation de sa théorie de phagocytose.

Metchnikoff a constaté que les cellules étaient en compétition les unes avec les autres. Par conséquent, il a déclaré que l'évolution doit être comprise par des processus sélectifs qui interviennent dans les interactions des lignées cellulaires entre elles et ceci dans l'intérêt de l'ensemble de l'organisme. Ce qu'il a reconnu plus tard comme étant une réponse au Darwinisme

pour lequel il avait une grande fascination (Cooper, 2008, Tauber, 2003). Chez les animaux supérieurs, Metchnikoff a observé que les cellules indifférenciées du parenchyme se différenciaient en deux couches, endoderme et mésoderme. L'endoderme a une fonction digestive alors que le mésoderme engendre les fonctions circulatoires, respiratoires et locomotives (Tauber, 2003, Korzh and Bregestovski, 2016).

Une matinée de 1882 à Messine (Italie), Metchnikoff observait au microscope des larves d'étoiles de mer où il a remarqué des cellules qui bougeaient librement tout le long des larves. Il a émis l'hypothèse que si ces cellules pouvaient manger des nutriments, elles étaient tout aussi capables de manger des microbes (Karnovsky, 1981). Afin de tester cette hypothèse, il a introduit des épines de roses dans les larves d'étoiles de mer. La journée suivante, il a remarqué que les cellules précédemment observées ne se déplaçaient plus sans but à l'intérieur des larves et qu'elles s'étaient regroupées autour des corps étrangers comme si elles essayaient de les conduire vers l'extérieur (Tan S Y, 1968). Il a également observé ce phénomène dans d'autres modèles comme les daphnies « puces d'eau » infectées par les spores d'un champignon infectieux, où les cellules étaient capables de bouger, ingérer et détruire les spores infectieuses (Korzh and Bregestovski, 2016). Plus tard, il observait le même processus chez des mammifères (lapins), mais qui étaient seulement exposés spécifiquement à la forme atténuée et la moins virulente du microbe (l'anthrax) (Tan and Dee, 2009).

À partir de ce moment-là, la théorie de phagocytose a pris forme. Il a émis l'hypothèse que dans des conditions appropriées, des cellules protectrices à l'intérieur d'un organisme réagissent avec une réponse immunitaire en attaquant et ingérant les corps étrangers. De plus, Metchnikoff a inventé le terme, phagocyte, des mots grecs « phages », voulant dire « manger », et « cite », voulant dire « cellule » (Tan and Dee, 2009). Sa principale contribution était la compréhension que la phagocytose était un mécanisme de défense, et que les phagocytes étaient un participant actif de l'inflammation, ce qui suggère que l'inflammation peut être utile et non pas juste délétère. De plus, il a conclu que l'inflammation chez les animaux supérieurs est un signe d'un corps en bonne santé (Cavaillon, 2011, Steven, 1892).

Elie Metchnikoff a reçu le Prix Nobel de médecine en partenariat avec Paul Ehrlich en 1908 (Cavaillon, 2011, Gordon, 2008, 1990). Ce dernier a contribué à la distinction entre les microphages (neutrophiles) et les macrophages par la coloration à l'aniline dans différents organes comme le foie, la rate, le poumon, les ganglions lymphatiques et l'intestin (Gordon, 2008). Metchnikoff a clairement identifié les neutrophiles en décrivant des petites cellules amiboïdes avec un noyau divisé en différents lobes avec la même capacité phagocytaire que les

macrophages. Toutefois, ils sont plus présents dans les phases aiguës de l'infection. Par ailleurs, les macrophages se distinguent par un large noyau volumineux. Metchnikoff a indiqué que les macrophages et microphages étaient des participants actifs au processus d'inflammation (Cavaillon, 2011). De plus, il a identifié deux fonctions bactéricides, une substance qui prépare le microbe sans l'endommager et une autre substance pour le détruire. Ehrlich a nommé la substance préparatoire *amboceptor* (anticorps) et a nommé *complément* la substance destructrice (Schmalstieg and Goldman, 2008).

Metchnikoff a subi de maintes critiques et réticences de la part de ses confrères face à l'apparition du nouveau concept de la phagocytose. Toutefois, l'évolution de la science à travers le temps a permis à Metchnikoff d'être considéré comme père fondateur de l'immunité innée.

### 1.3 Origines des macrophages

Anciennement, l'origine des macrophages était identifiée comme provenant seulement de la différenciation des monocytes circulants (van Furth and Cohn, 1968). La classification des monocytes repose sur l'expression du marqueur inflammatoire Ly6C. Ainsi, les monocytes sont divisés en deux groupes Ly6C<sup>+</sup> et Ly6C<sup>-</sup> qui expriment les marqueurs de surface et les récepteurs à chimiokines CD11b<sup>+</sup>, CD115<sup>+</sup>, CCR2<sup>high</sup>, CX<sub>3</sub>CR1<sup>low</sup> et CD11b<sup>+</sup>, CD115<sup>+</sup>, CCR2<sup>low</sup>, CX<sub>3</sub>CR1<sup>high</sup> respectivement (Auffray et al., 2007, Wolf et al., 2019, Auffray et al., 2009). Les monocytes Ly6C<sup>+</sup> ont une capacité de migration et d'infiltration plus importante que les Ly6C<sup>-</sup> par l'interaction CCL2-CCR2 (Si et al., 2010, Palframan et al., 2001). Fonctionnellement, les Ly6C<sup>+</sup> sont plus microbicides. Cette fonction est due à leur pouvoir phagocytaire et pro-inflammatoire (Serbina et al., 2008). Par conséquent, ils donnent naissance à des macrophages inflammatoires lors d'une infection bactérienne. Cependant, les monocytes Ly6C<sup>-</sup> se différencient en macrophages anti-inflammatoires qui contribuent à l'angiogenèse et atténuent les propriétés inflammatoires (Yang et al., 2014).

Les monocytes proviennent de précurseurs myéloïdes communs au niveau de la moelle osseuse (figure 1.1). Ensuite, ils circulent dans le sang pendant plusieurs jours avant de rentrer dans les tissus et les approvisionnent en macrophages lorsque la situation l'exige (Geissmann et al., 2010, Nahrendorf and Swirski, 2013). Plus tard, certaines études ont suggéré que cette notion n'est pas applicable à toutes les populations adultes de macrophages. Par exemple, une transplantation de moelle osseuse chez des souris irradiées n'affecte pas le maintien des cellules de Langerhans (macrophages de l'épiderme) (Merad et al., 2002). De la même manière, des études par la parabiose (une technique chirurgicale qui permet de connecter le sang périphérique

de deux souris) d'une souris en santé avec une souris souffrant d'une maladie neurodégénérative ou irradiée montrent que la microglie (les macrophages du système nerveux central) régénère localement par renouvellement sans recrutement des précurseurs de la moelle osseuse (Ajami et al., 2007, Ajami et al., 2011). Une analyse génétique a permis de cibler deux gènes présents exclusivement dans les monocytes (*Mx1* et *S100a4*). L'expression de ces gènes est prédominante dans la différenciation myéloïde. Par contre, leur expression est diminuée dans les macrophages provenant du poumon, de la rate, du péritoine, de la moelle osseuse et de la microglie, confirmant ainsi la diminution de la contribution des monocytes dans le développement de macrophages de certains tissus (Hashimoto et al., 2013). L'utilisation de souris ayant le système Cre recombinase dans le locus CX3CR1 croisées avec des souris R26-YFP (*Cx3cr1<sup>cre</sup> : R26-yfp*) a permis de déterminer l'origine des macrophages. Dans ce système le gène *Cx3cr1* est exprimé soit de façon constitutive (système Cre) ou conditionnelle (système CreERT2 inductible avec le tamoxifène). L'analyse de la population mononucléaire phagocytaire dans ces systèmes a identifié l'absence de l'expression de CX<sub>3</sub>CR1 dans les macrophages du poumon, de la rate, du péritoine ainsi que des cellules Kupffer du foie. En somme, les macrophages de ces tissus sont établis avant la naissance et leur maintien est indépendant de la différenciation des monocytes à l'âge adulte (Yona et al., 2013). De plus, il a été montré par parabiose que les macrophages du poumon, de la rate, de la MO, du péritoine ainsi que la microglie présentent un taux négligeable de chimérisme (Hashimoto et al., 2013). En résumé, les macrophages dérivent des monocytes circulant, cependant, dans certains tissus leur présence est déjà bien établie avant la naissance et leur renouvellement ne nécessite pas le recrutement de précurseurs.

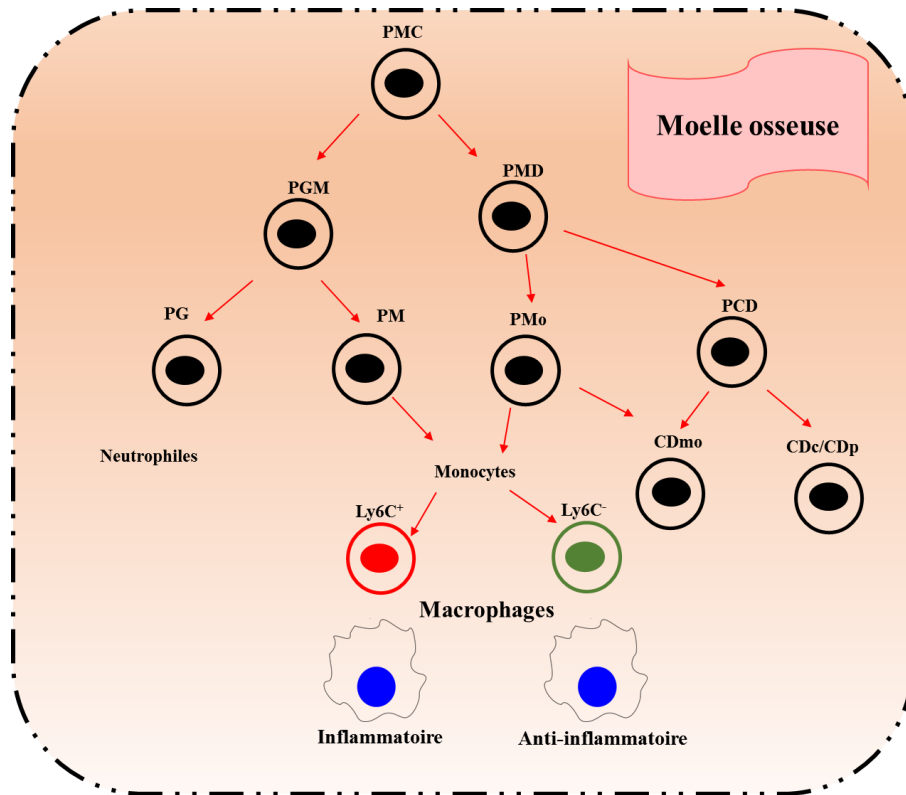


Figure 1.1 Ontogénie des macrophages dérivés des monocytes

Ce schéma décrit les différents progéniteurs myéloïdes qui donnent naissance aux macrophages. PMC : progéniteurs myéloïdes communs, PGM : progéniteurs granulocytes – monocytes, PG : progéniteurs de granulocytes, PM : progéniteurs de monocytes, PMD : progéniteurs — monocytes – dendritiques, PMo : progéniteurs monocytes, PCD : progéniteurs de cellules dendritiques, CDmo : cellules dendritiques dérivées des monocytes, CDc/CDp : cellules dendritiques conventionnelle/cellules dendritiques plasmacytoïdes.

Lors du développement embryonnaire, les macrophages ont deux origines distinctes, caractérisées par la phase primitive et la phase définitive de l'hématopoïèse (figure 1.2). Lors de la phase primitive, l'hématopoïèse se développe du mésoderme postérieur du sac vitellin autour du jour 7 de l'embryogenèse (E=7). Ce procédé donne naissance aux érythroblastes, mégacaryocytes et macrophages primitifs (Bertrand et al., 2005). Les macrophages sont les seuls globules blancs à cette étape et sont maintenus tout au long de la vie par autorenouvellement (Hashimoto et al., 2013, Yona et al., 2013, Ensan et al., 2016). Ces macrophages sont identifiés par les marqueurs CD45<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup>, CX<sub>3</sub>CR1<sup>-</sup> et sont exclusivement d'origine maternelle (Bertrand et al., 2005). Une seconde vague de progéniteurs hématopoïétiques émerge de l'endothélium hémogénique du sac vitellin entre E=8 et E=8.5 et migre par la suite vers le foie fœtal (E=9.5),

afin de générer des précurseurs avec un potentiel érythroïde et myéloïde large, mais non lymphoïde, ce sont des précurseurs érythro-myéloïdes (PEM) (Palis and Yoder, 2001). Les macrophages générés sont identifiés par les marqueurs suivants, CD45<sup>-</sup>, c-Kit<sup>+</sup> et CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> (Bertrand et al., 2005). Ces PEM sont incapables de persister. Par conséquent, cette étape est identifiée comme transitoire (Wolf et al., 2019, Hoeffel and Ginhoux, 2018).

Le système hématopoïétique primitif est rapidement remplacé par l'hématopoïèse définitive (E=8.5-E=10.5). À E=8.5 une nouvelle vague de progéniteurs hématopoïétiques qui proviennent de l'endothélium hémogénique intraembryonnaire prend place. Ces progéniteurs génèrent des cellules souches hématopoïétiques immatures qui émergent de l'aorte-gonades-mésonephros (AGM) et migrent vers le foie fœtal (E=10.5) où elles donnent naissance à toutes les cellules immunitaires. Le foie fœtal est le site majeur de l'hématopoïèse lors du développement embryonnaire. Par contre, lors de la période périnatale, la moelle osseuse devient le principal site de l'hématopoïèse (Cumano and Godin, 2007, Schulz et al., 2012, Boisset et al., 2010). En conclusion, les macrophages ont un rôle d'immunosurveillance fonctionnel avant la naissance qui se poursuit tout au long de la vie.



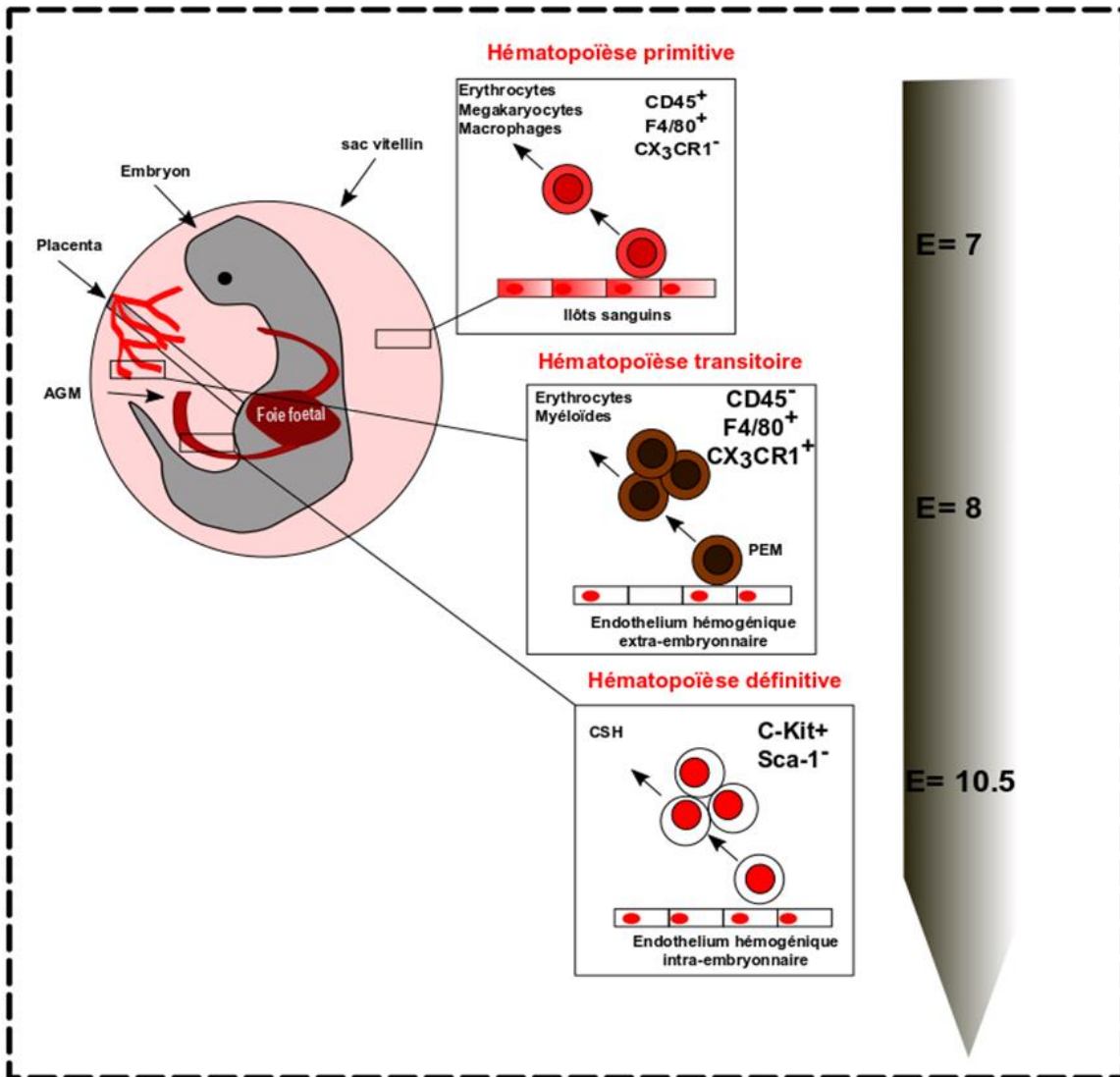


Figure 1.2 Le développement de l'hématopoïèse dans un modèle murin

L'hématopoïèse primitive se déroule dans le sac vitellin donnant naissance aux érythrocytes-mégacaryocytes et macrophages (E=7). L'hématopoïèse transitoire émerge de l'endothélium homogénique extraembryonnaire, donne naissance aux érythrocytes et cellules myéloïdes (E=8). L'hématopoïèse définitive est responsable de la production des cellules souches hématopoïétiques qui maintiennent le système sanguin et immunitaire (E=10.5).

## 1.4 Polarisation des macrophages

Afin de pouvoir exercer leur rôle de protection et de défense de l'hôte contre les pathogènes, les macrophages sont activés par des stimuli exogènes et/ou endogènes et aussi par des facteurs de croissance tels que M-CSF (CSF-1) et GM-CSF (CSF2). M-CSF et GM-CSF génèrent les macrophages et influencent leur comportement lors des réponses immunitaires (Hamilton, 2008, Hamilton, 2020, Popova et al., 2011). La culture de macrophages avec GM-CSF stimulés avec LPS induit la production de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires, contrairement au M-CSF qui induit la production de cytokines/chimiokines anti-inflammatoires (Fleetwood et al., 2007, Lacey et al., 2012, Popova et al., 2011) (Tableau 1.1). M-CSF est produit par différentes cellules telles que les ostéoblastes, les cellules endothéliales, les cellules stromales, les fibroblastes et les macrophages (Hamilton, 2008, Smith et al., 2013, Ushach and Zlotnik, 2016). Par ailleurs, son rôle dans la différenciation des macrophages a été bien défini par des études *in vivo* qui montrent une altération du nombre de plusieurs populations de macrophages chez des souris déficientes en M-CSF (Dai et al., 2004). De plus, M-CSF est aussi détecté dans des maladies inflammatoires. En effet, il induit l'expression de CCL2 afin de recruter les monocytes au site de l'inflammation et contribue donc à la différenciation des macrophages (Hamilton, 2008). En outre, M-CSF favorise la capacité phagocytaire des cellules mononucléaires (Smith et al., 2013, Mitrasinovic et al., 2003) ainsi que la survie, la prolifération et la différenciation des lignées myéloïdes (Otero et al., 2009, Mun et al., 2020, Davies et al., 2013).

**Tableau 1.1 Les différents facteurs produits par les macrophages en culture en présence de M-CSF ou de GM-CSF**

<u>GM-CSF</u>	<u>M-CSF</u>
TNF $\alpha$	IL-10
IL-12	CCL2
IL-6	
IL-23	
NF- $\kappa$ B	

En situation d'homéostasie le niveau de M-CSF peut être régulé par le récepteur CSF-1R qui est dégradé suite à son internalisation (Huynh et al., 2012). CSF-1R est exprimé faiblement dans les CSH mais il est fortement exprimé dans les monocytes, les différentes populations de macrophages, les ostéoclastes, la microglie et les cellules dendritiques myéloïdes (Sarrazin et al., 2009). La signalisation de M-CSF-CSF-1R joue un rôle majeur dans la prolifération, la

différenciation et la survie des macrophages. CSF-R est un récepteur à tyrosine kinase qui dimérise à la suite de son activation et entame une série d'autophosphorylations. Par la suite, il forme un complexe avec les protéines adaptatrices Grb2/SOS. Ce complexe se dissocie du récepteur et amorce une autre série de phosphorylations de tyrosines et serines. Ultiment, le complexe M-CSF/CSF-1R est internalisé et dégradé dans les lysosomes. L'activation du CSF-1R assure la prolifération et la survie cellulaire par l'activation des voies PI3K/AKT et des MAPK (ERK1/2, JNK, p38) (Stanley and Chitu, 2014, Bradley et al., 2008, Comalada et al., 2004). Plus spécifiquement, ERK1/2 s'avère particulièrement nécessaire à la prolifération et à la différenciation des macrophages (Comalada et al., 2003, Reddy et al., 2002, Comalada et al., 2004). En réponse à M-CSF, la signalisation ERK1/2 active les progéniteurs hématopoïétiques et induit l'expression du facteur de transcription PU.1, un régulateur myéloïde nécessaire à la maturation des macrophages (Mossadegh-Keller et al., 2013, Henkel et al., 2002). Ainsi, une activation prolongée de ERK1/2 promeut la différenciation des macrophages (Stanley and Chitu, 2014, Suzu et al., 2007). La prolifération et la survie des macrophages sont aussi maintenues indépendamment des voies PI3K/AKT et MAPK par la protéine DAP12. En effet, DAP12 est aussi impliquée dans ces processus en réponse à une stimulation par M-CSF. DAP12 est une protéine adaptatrice associée avec plusieurs récepteurs lymphoïdes/myéloïdes. DAP12 se compose d'une région extracellulaire courte, une région transmembranaire et un domaine cytoplasmique (Otero et al., 2009). La délétion de DAP12 (DAP 12<sup>-/-</sup>) dans des cellules de la moelle osseuse altère leur prolifération et augmente leur accumulation à la phase G1 du cycle cellulaire en diminuant l'expression des cyclines D1/D2. De plus, les cellules DAP 12<sup>-/-</sup> sont pré-apoptotiques ce qui diminue leur survie. DAP12 agit en réponse à une stimulation par M-CSF indépendamment des MAPK en activant la tyrosine kinase Pyk2 qui induit la translocation de la  $\beta$ -caténine au noyau. La  $\beta$ -caténine active les facteurs de transcription TCF/LEF responsables de la régulation du cycle cellulaire (Otero et al., 2009). Sans exclure l'interrelation entre les différentes voies, le contrôle des processus de la prolifération, de la survie et de la différenciation des cellules phagocytaires peut être résumé à l'implication de trois voies de signalisation majeures ERK1/2, PI3K/AKT et DAP12 (figure 1.3).

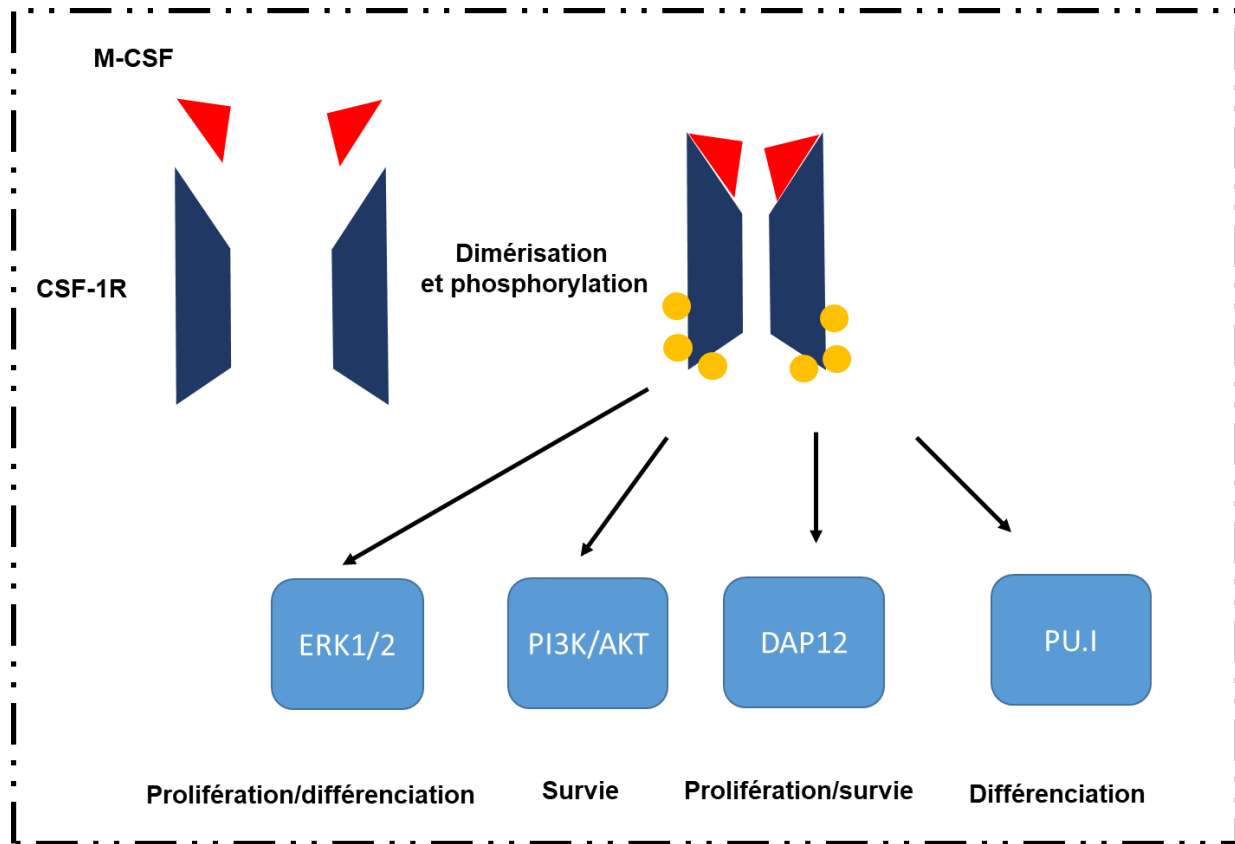


Figure 1.3 Les voies de signalisation activées par le complexe M-CSF/CSF-1R

À la suite de la liaison du ligand M-CSF, le récepteur tyrosine kinase CSF-1 dimérise et effectue une série d'autophosphorylations. Par la suite, le récepteur phosphorylé active différentes protéines qui contrôlent la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire.

Contrairement à l'effet du M-CSF, les souris déficientes en GM-CSF ne montrent ni perturbation de l'hématopoïèse ni modulation du développement myéloïde. Toutefois, la maturation des macrophages alvéolaires est altérée. Par conséquent, en absence de GM-CSF, les souris développent une pathologie pulmonaire (Shibata et al., 2001, Stanley et al., 1994, Schneider et al., 2014). L'expression de GM-CSF est très peu détectée à l'état basal mais elle est induite à la suite d'une stimulation inflammatoire. De plus, il est souvent utilisé pour le développement et la fonction des cellules dendritiques (Inaba et al., 1992). En plus des macrophages et des monocytes, GM-CSF agit sur les neutrophiles, éosinophiles et les basophiles. La liaison de GM-CSF à son récepteur active les principales voies des MAPK, PI3K/AKT et JAK-STAT (Hamilton, 2008). En somme, la présence de l'un ou l'autre de ces

facteurs dans l'environnement influence la réponse des macrophages aux stimuli. GM-CSF et M-CSF induisent la sécrétion de profils de cytokines différents par les macrophages ce qui détermine par la suite leur comportement.

Les macrophages associés à un profil inflammatoire sont appelés des macrophages classiquement activés, identifiés par M1. Et ceux associés à un profil anti-inflammatoire sont appelés des macrophages alternativement activés, identifiés par M2. La classification M1/M2 s'est faite par analogie aux réponses Th1 et Th2 engendrées lors de l'immunité adaptative (Muraille et al., 2014). L'immunité adaptative arrive après la réponse immunitaire innée qui est la première ligne de défense contre les pathogènes. L'immunité innée œuvre par des cellules phagocytaires professionnelles telles que les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles. De plus, elle adopte la même réponse face à des pathogènes différents. En d'autres termes, l'immunité innée est un mécanisme général (Alberts B, 2002, Janeway CA Jr, 2001). Par contre, si le système n'arrive pas à bout de l'élimination complète du pathogène phagocyté, l'immunité adaptative prend le relais. À cette étape, les cellules phagocytaires deviennent des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) aux lymphocytes T naïfs (Th0). Les Th0 prolifèrent, se différencient et deviennent des cellules effectrices. Selon le signal reçu, ils adoptent une réponse Th1 ou Th2. Plusieurs facteurs peuvent polariser les Th0, tels que les cytokines, les hormones, la dose d'antigènes et les CPA (Mikhailkevich et al., 2006, Spellberg and Edwards, 2001) (figure 1.4).

Les CPA fournissent deux signaux différents pour l'activation des Th0 (Abbas et al., 1996, Mosmann and Coffman, 1989, Su et al., 2015). Le premier signal consiste en une présentation antigénique. Les CPA présentent l'antigène à leur surface via le complexe d'histocompatibilité II (CMHII). Le complexe peptide-CMHII se lie au récepteur (TCR) à la surface de Th0 (Mosmann and Coffman, 1989, Tai et al., 2018). Le deuxième signal est l'activation de la signalisation intracellulaire. Dans ce but, les CPA induisent la signalisation par les protéines co-stimulatrices exprimées à leur surface, les protéines B7 (CD80/CD86) qui sont reconnues par les protéines CD28 à la surface des Th0. Ce signal amplifie en retour l'expression des protéines B7 (Tai et al., 2018, Eiz-Vesper and Schmetzer, 2020). En plus du récepteur TCR, les Th0 expriment le complexe CD3 qui à la suite de la liaison du complexe peptide-CMHII active un signal intracellulaire. En effet, le complexe TCR-CD3-CMHII recrute la protéine kinase LCK qui phosphoryle le motif ITAM sur le CD3. Cette phosphorylation induit le recrutement de la protéine kinase ZAP70 et permet ainsi sa phosphorylation par LCK et son activation. ZAP70 activée induit la formation d'un complexe multiprotéique appelé le signalosome. Le signalosome propage le

signal à trois voies de signalisation majeures, la  $Ca^{2+}$ , les MAPK et la NF- $\kappa$ B. L'activation de ces voies de signalisation mène à la croissance et à la différenciation des Th1 (Brownlie and Zamoyska, 2013). À la suite de la liaison des Th aux CPA et leur activation, les lymphocytes activent des protéines d'adhésion (LFA-1) pour renforcer cette liaison en s'attachant à la molécule d'adhésion (ICAM-1) à la surface du CPA. Ceci permet aux Th de rester liés assez longtemps aux CPA pour être activés. La polarisation en Th1 et Th2 s'accompagne de l'augmentation de l'expression des facteurs de transcription T-bet et GATA-3 respectivement (Szabo et al., 2000, Taha et al., 2003). Les Th activés peuvent inhiber le signal en exprimant la protéine CTLA-4 qui se lie aux protéines B7 (Abbas et al., 1996). Suivant les deux signaux, les Th0 deviennent des cellules effectrices.

La réponse Th1 est spécifique à l'élimination des pathogènes intracellulaires. À cet effet, les cellules Th1 sécrètent la cytokine IFN $\gamma$  qui active les macrophages M1 pour finaliser la destruction du pathogène (Kidd, 2003, Murphy et al., 2000, Yang et al., 2018). La réponse Th2 est spécifique à l'élimination des pathogènes extracellulaires. En outre, elle active les lymphocytes B (LB), la production d'anticorps et stimule la production d'éosinophiles, de basophiles et de mastocytes (Spellberg and Edwards, 2001). Le récepteur des LB (BCR) lie l'antigène et forme un agrégat avec ses chaînes de protéines invariantes  $\alpha$  et  $\beta$ . Cette liaison amorce une série d'évènements de phosphorylation qui active une multitude de cascades signalétiques impliquant principalement les MAPK, PKC/ $Ca^{2+}$  et PI3K (Dal Porto et al., 2004). Par endocytose, les LB délivrent l'antigène au compartiment endosomal pour sa dégradation en peptides. Les peptides sont retournés à la surface des LB et sont présentés aux Th0 par le CMHII. Par le même processus que décrit précédemment, les Th0 s'activent et deviennent des Th2. La signalisation des LB est inhibée par le récepteur Fc (Chen and Jensen, 2008, Adler et al., 2017). Finalement, la réponse Th2 polarise les macrophages M2 en sécrétant les cytokines IL-4 et IL-13 (Kaiko et al., 2008, Spellberg and Edwards, 2001) (figure 1.4). En résumé, les cytokines, les hormones et la dose de l'antigène sont des facteurs qui influencent la réponse immunitaire adaptative. En outre, des cytokines spécifiques produites par les lymphocytes activés, les facteurs de croissance GM-CSF et M-CSF contribuent à la polarisation des macrophages M1 ou M2.






<b>Lymphocytes (Th0)</b>	
<u>Cytokines</u>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p><b>Th1</b></p>  <p>IL-12/IFN<math>\gamma</math> (macrophages/cellules NK/cellules dendritiques)</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p><b>Th2</b></p>  <p>IL-4 ( mastocytes/éosinophiles)</p> </div> </div>
<u>Hormones</u>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>Testostérone</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>Glucocorticoïdes Catecholamines Prostaglandins Estrogènes/progestines</p> </div> </div>
<u>Dose de l'antigène:</u>  	 <p>Nécrose</p>
<b>Cytokines produites</b>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <p>IFN<math>\gamma</math></p> <p>IL-4//IL-13</p> </div>
<b>Macrophages activés</b>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <p><b>M1</b></p> <p><b>M2</b></p> </div>

Figure 1.4 La différenciation des Th0 et la polarisation des macrophages

Plusieurs facteurs tels que les cytokines, les hormones, la quantité de l'antigène induisent l'activation des Th0 en Th1 ou Th2. La réponse Th1 ou Th2 polarise les macrophages en M1 ou M2

#### 1.4.1 Macrophages classiquement activés (M1)

Les macrophages M1 sont stimulés par l'IFN- $\gamma$  et les agonistes des récepteurs TLR tels que le lipopolysaccharide (LPS). Ils sont caractérisés par leur fonction microbicide ainsi que par leur pouvoir de sécréter différentes cytokines inflammatoires, telles que les IFN, l'IL-12, le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-18 et l'IL-1 $\beta$  (Martinez and Gordon, 2014, Murray, 2017, Atri et al., 2018, Palma et al., 2018). L'expression des cytokines inflammatoires est bénéfique pour l'hôte. En effet, elles contribuent à mettre le système en alerte afin de recruter les cellules immunitaires et les facteurs nécessaires à l'élimination du pathogène. Cependant, une expression exagérée des cytokines inflammatoires induit un choc septique et devient par conséquent néfaste pour l'hôte (Tisoncik et al., 2012).

Les IFN sont classés majoritairement en deux groupes, IFN de type I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$  et IFN- $\tau$ ) et de type II (IFN- $\gamma$ ) (Lee and Ashkar, 2018). L'IFN- $\gamma$  est un activateur endogène des macrophages. Il se lie à son récepteur spécifique à la surface du macrophage (IFNGR). IFNGR est constitué de deux chaînes IFNGR1 et IFNGR2. Une fois le récepteur activé par son ligand, il active la voie de signalisation JAK/STAT (figure 1.5). L'IFNGR active les protéines kinases associées à sa partie cytoplasmique JAK1/2. Une fois activées, JAK1/2 phosphorylent le résidu tyrosine 440 sur la protéine STAT1 dans le cytoplasme et permet sa dimérisation. Le dimère STAT1 est ensuite activé sur la tyrosine 701 ce qui permet sa translocation dans le noyau et sa phosphorylation subséquente à la serine 727 (Sadzak et al., 2008). Le dimère phosphorylé se lie à une séquence régulatrice sur l'ADN appelée GAS (*Gamma interferon activation site*) et adopte une configuration parallèle. Ainsi, STAT1 stimule la transcription de ses gènes cibles (*Socs*, *Bcl-2*, *p21*, *c-myc*, *Nos2*, etc.) (Rawlings et al., 2004, Murray, 2007, Seif et al., 2017). Par ailleurs, STAT1 subit un cycle d'activation-inactivation dans le noyau-cytoplasme par des modifications post-transcriptionnelles. Elle est acétylée à la lysine 410-413 par l'histone acétyltransférase (HAT) plus précisément CBP qui acétyle aux histones 3,4,2A,2B (H3, H4, H2A, H2B) (Kouzarides, 2007, Kramer et al., 2009) ce qui l'incite à adopter une configuration antiparallèle et facilite sa déphosphorylation par la phosphatase TCP45. Cette acétylation mène à son inactivation (Kramer et al., 2009). La forme déphosphorylée est recyclée au cytoplasme où elle déacétylée par l'histone déacétylase 3 (HDAC3). HDAC3 induit la reconfiguration de STAT1 menant à sa phosphorylation. De cette façon, un autre cycle de phosphorylation recommence (Stark, 2007, Hu and Ivashkiv, 2009).

L'activation des macrophages par l'IFN- $\gamma$  induit l'expression de gènes qui codent pour des chimiokines, protéines et facteurs de transcription (par exemple MIG, IP-10 et IRF-1) importants pour l'amplification de la réponse immunitaire nécessaire à combattre les menaces intracellulaires, telles que les infections virales, bactériennes ou encore la stimulation par les IFNs eux-mêmes. Cependant, la signalisation doit être contrôlée par un mécanisme d'inhibition. Une stimulation à forte dose de la voie JAK/STAT1 induit son inhibition par l'action de la protéine SOCS1. Cette inhibition peut se produire par trois mécanismes (Alexander, 2002): 1) en liant les phosphotyrosines des récepteurs, 2) en liant physiquement les kinases JAK et 3) en facilitant l'ubiquitination des JAK en interagissant avec le complexe elongine BC et cullin pour sa dégradation. Ces mécanismes empêchent la phosphorylation de STAT1 (Hu et al., 2002, O'Shea and Murray, 2008).



La signalisation IFN- $\gamma$  amplifie la réponse inflammatoire en activant les macrophages et en induisant l'expression de gènes inflammatoires par STAT1. En synergie avec les agonistes des TLR, il amorce la réponse TLR afin d'induire les médiateurs inflammatoires, tels que TNF $\alpha$  et IL-12 (Muller et al., 2017). De surcroît, l'IFN- $\gamma$  augmente le mécanisme de destruction du microbe par la voie PI3K/AKT et mTORC1. L'IFN- $\gamma$  inhibe l'expression du récepteur CSF-1R qui diminue par conséquent la voie AKT/mTORC1 (Su et al., 2015). L'inhibition de mTORC1 engendre un processus d'autodestruction appelé autophagie. Le mécanisme autophagique séquestre le pathogène dans des autophagosomes. Ensuite, il est détruit par la fusion des autophagosomes aux lysosomes ou encore en délivrant les particules cytosoliques du pathogènes aux TLR. Par conséquent, l'IFN- $\gamma$  participe aux mécanismes de destruction du pathogène et intensifie la réponse inflammatoire (Schmid et al., 2007, Paludan et al., 2005, Su et al., 2015).

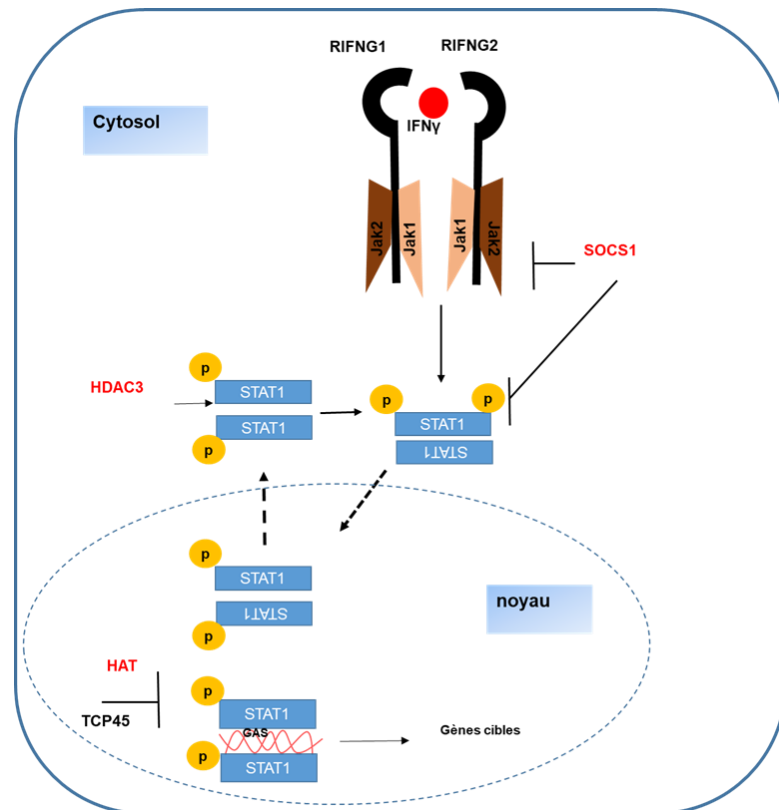


Figure 1.5 La signalisation de l'IFN $\gamma$  dans les macrophages

La voie JAK/STAT1 est activée par la liaison de l'IFN $\gamma$  à son récepteur. Les protéines Jak1/2 sont activées et induisent une trans-phosphorylation pour le recrutement de la forme latente de la protéine STAT1. Ensuite, STAT1 est phosphorylée et transloque dans le noyau sous forme de dimère. Le dimère de configuration parallèle se lie à la région GAS au noyau et transcrit ses gènes cibles. Cette étape est contrôlée par l'enzyme

**HAT. HAT acétyle le dimère et induit une configuration antiparallèle. Par la suite, le dimère est déphosphorylé par la phosphatase TCP45. Le dimère inactif est recyclé vers le cytoplasme où il est déacétylé par l'enzyme HDAC3. Finalement, il reprend une configuration parallèle et entreprend un autre cycle d'activation. RIFNG : récepteur à IFN- $\gamma$ . SOCS1 contrôle la signalisation en inhibant l'activation de JAK/STAT1**

Le TNF $\alpha$  est un facteur déterminant de la réponse inflammatoire. Les macrophages inflammatoires en sont les principaux et puissants producteurs. Le TNF $\alpha$  intervient dans la phase aiguë de la réponse immunitaire et elle est rapidement relâchée à la suite d'un traumatisme, d'une exposition au LPS ou par des infections. Cependant, une sécrétion excessive de TNF $\alpha$  peut causer des pathologies inflammatoires telles que l'asthme, les arthrites rhumatoïdes et les cancers si son expression n'est pas contrôlée (Montfort et al., 2019, Baugh and Bucala, 2001). Le TNF $\alpha$  est un régulateur clé dans la réponse immunitaire. Cette cytokine intervient dans le recrutement des neutrophiles au site d'inflammation. Pour ce fait, elle induit l'expression des chimiokines CXCL-1, CXCL-2 et CXCL-5 ainsi que l'expression des protéines endothéliales E-sélectine et P-sélectine qui permettent le roulement des neutrophiles tout au long de la paroi endothéliale afin d'atteindre le signal inflammatoire (Zarbock and Ley, 2009, Griffin et al., 2012). Ces effets sont amplifiés quand TNF $\alpha$  et IL-17 agissent en synergie (Griffin et al., 2012). Dans les macrophages, TNF $\alpha$  est sécrétée dans le milieu extracellulaire. Une fois synthétisée le TNF $\alpha$  est transportée du réticulum endoplasmique au Golgi où elle est glycosylée. Le transport de TNF $\alpha$  post-Golgi à la membrane se fait par des vésicules ou des porteurs tubulo-vésiculaires qui se lient avec les endosomes avant d'être délivrés et relâchés à la surface de la cellule. Les endosomes sont par la suite recyclés et passent d'un état exocytique à un état endocytique (Stow and Murray, 2013). Une fois que le TNF $\alpha$  atteint la surface, il sera clivé par la protéase TACE. Ce clivage dissocie une fraction protéique de 17KDa et garde très peu de TNF $\alpha$  détectable à la surface. Après sa sécrétion le TNF $\alpha$  peut agir à un endroit spécifique et il y est donc délivré par l'intermédiaire d'endosomes/lysosomes ou encore il peut agir de façon multidirectionnelle. De plus, la Syntaxine 4 (Synt4), une protéine membranaire a démontré un rôle actif dans le transport et dans la régulation de la sécrétion de TNF $\alpha$ . En effet, une stimulation par LPS, augmente le niveau protéique de Synt4 qui corrèle avec une augmentation de TNF $\alpha$  à la membrane plasmique 24H suivant un traitement au LPS (Pagan et al., 2003). Une autre protéine a aussi été identifiée, la VAMP3, une protéine exprimée sur les membranes des organelles cytoplasmiques et sur la membrane de surface. VAMP3 a un rôle limitant dans la sécrétion de TNF $\alpha$ . L'expression du domaine cytoplasmique inhibiteur de la VAMP3 bloque la sécrétion de TNF $\alpha$  à la surface (Murray

et al., 2005). Pour conclure, Synt4 et VAMP3 ont tous deux un rôle fonctionnel dans la sécrétion de TNF $\alpha$  sans pour autant compromettre sa synthèse (figure 1.6)

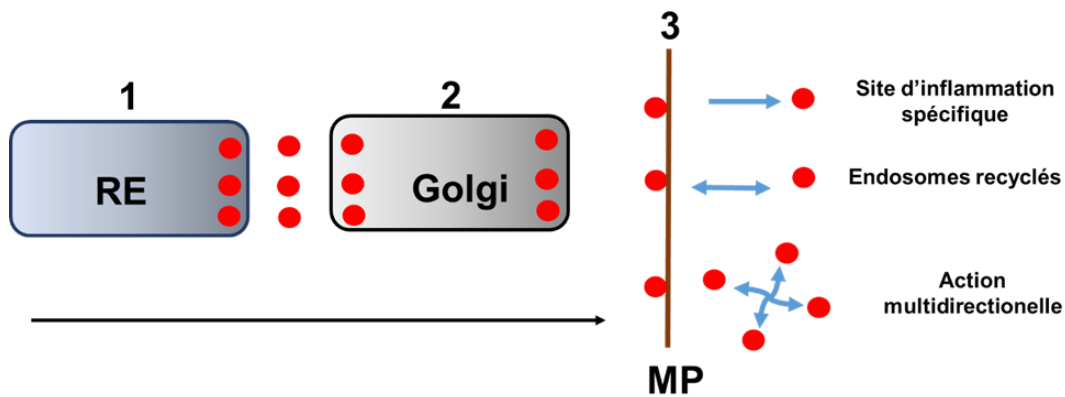


Figure 1.6 La voie de sécrétion de TNF $\alpha$

Le transport de TNF $\alpha$  du RE à la surface cellulaire en passant par le Golgi se déroule dans des endosomes. Ces endosomes fusionnent à la MP. TNF $\alpha$  peut agir de deux façons : soit son transport se fait directement à un site spécifique ou elle opère de façon multidirectionnelle. RE : réticulum endoplasmique, MP : membrane plasmique.

La reconnaissance des pathogènes par les macrophages induit la synthèse des cytokines IL-12 et IL-1 $\beta$  qui jouent des rôles importants dans l'établissement de la réponse inflammatoire (Dinarello, 2018, Sun et al., 2015). Une stimulation par IL-12 stimule la production de l'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T et une stimulation en combinaison avec IL-18 intensifie la production de l'IFN- $\gamma$  par les cellules NK (Chaix et al., 2008). Cette activation soutient la polarisation M1 (Pien et al., 2000, Darwich et al., 2009). Par contre, l'IL-1 $\beta$  agit sur le système nerveux central et induit l'apparition de la fièvre. Elle est aussi responsable de la sécrétion de prostaglandines et de l'expression de la protéine d'adhésion VCAM-1, pour l'attachement des monocytes à l'endothélium lors de son roulement afin d'atteindre le site d'inflammation (Arango Duque and Descoteaux, 2014). En outre, elle régule aussi l'expression de la chimiokine MIP1 $\beta$ , responsable du recrutement des monocytes, des cellules NK et d'autres cellules mononucléaires en réponse à l'infiltration de microbes (O'Grady et al., 1999, Zhang et al., 2003). IL-6 est une autre cytokine

inflammatoire qui une fois sécrétée, elle active la différenciation des monocytes. Cependant, cette cytokine a un double rôle. Bien qu'inflammatoire elle a montré un rôle dans l'induction des macrophages M2 (Guerrero et al., 2012, Lerin Lockett-Chastain, 2016), ce qui lui confère un rôle dans la promotion de la tumorigénicité (Chen et al., 2018a). De plus, IL-6 induit la différenciation des Th0 et amplifie la réponse immunitaire (Linterman and Vinuesa, 2010). En résumé, l'implication de toutes ces cytokines inflammatoires est tout aussi importante dans la réponse immunitaire que leur mode d'action soit directe ou indirecte.

La fonction principale des macrophages M1 dans la défense de l'hôte est la destruction du pathogène. Les macrophages M1 y procèdent par la production d'oxyde nitrique (NO). Cette production est orchestrée par l'enzyme iNOS. En plus de son rôle dans l'élimination des microorganismes, NO régule la réponse inflammatoire (Xue et al., 2018b). Des souris déficientes en iNOS ont une production intensifiée de cytokines inflammatoires IL-12, TNF $\alpha$  et IL-6 (Giordano et al., 2011). En outre, NO contrôle la réponse immunitaire par l'inhibition de l'expression d'IL-12 (Xiong et al., 2004) et régule la polarisation des macrophages. L'inhibition ou l'absence de NO promeut la polarisation M1 et induit une sévère inflammation avec un phénotype M1 en réponse à un choc d'endotoxines (Lu et al., 2015). La production de NO est catalysée par l'enzyme iNOS qui agit par le métabolisme de la L-arginine. En effet, la L-arginine peut être convertie par iNOS en L-citrulline et NO et l'arginase en L-ornithine et urée (Stuehr, 2004) (figure 1.7). L'arginase et iNOS sont en compétition pour la biodisponibilité de la L-arginine. Si la quantité de la L-arginine est limitée, la L-citrulline peut être convertie en L-arginine (Stuehr, 2004, Bansal and Ochoa, 2003). Il a été aussi montré que les macrophages infectés par des mycobactéries et cultivés avec la L-citrulline produisent plus de NO (Rapovy et al., 2015). Ce qui suggère que la production de NO est favorisée lorsque la L-arginine est synthétisée à partir de la L-citrulline. Quatre facteurs de transcription contrôlent l'expression de iNOS : AP-1, NF- $\kappa$ B, IRF-1 et le dimère STAT1 phosphorylé. L'expression de ces facteurs de transcription est induite par l'action de l'IFN $\gamma$  sur la voie JAK/STAT et par l'action de TNF $\alpha$  sur la MAPK qui tous deux aboutissent à la transcription de *inos* (Salim et al., 2016, Ratajczak-Wrona et al., 2013). Il est effectivement connu que l'activation des protéines MAPK JNK et p38 induisent l'expression de iNOS en activant le facteur de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B qui se lie au promoteur du gène de *inos*. L'activation de NF- $\kappa$ B induit la dissociation et la dégradation de la sous unité I- $\kappa$ B de NF- $\kappa$ B. Ensuite, NF- $\kappa$ B transloque dans le noyau où il active la transcription de *inos* (Ratajczak-Wrona et al., 2013). En conclusion, la synergie entre IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$  intensifie la production de NO et par conséquent amplifie la réponse immunitaire (Salim et al., 2016).

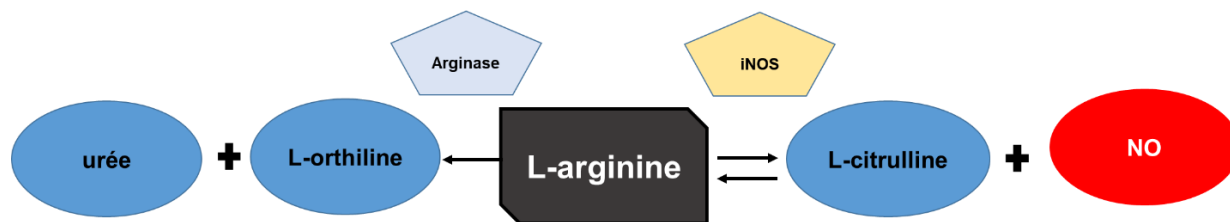


Figure 1.7 Le métabolisme de la L-arginine

La L-arginine est un substrat commun pour les enzymes iNOS et arginase. Selon les paramètres environnementaux, la L-arginine peut être catalysée soit par iNOS ou par l'arginase et génère L-citrulline et NO ou L-ornithine et l'urée.

Les macrophages M1 se distinguent aussi par l'expression de marqueurs de surface spécifiques. Les marqueurs de surface classiques de M1 sont le CD86 et le CMHII. CD86 est une protéine de surface exprimée en abondance sur les phagocytes professionnels. Étant donné que ce marqueur fait partie des protéines B7, il contribue par conséquent à l'activation des Th1. De plus, son expression augmente rapidement suite à une activation inflammatoire (Sansom, 2000, Rubio-Navarro et al., 2016, Veremeyko et al., 2018). Quant au CMHII, il active la réponse Th1 par la présentation antigénique (Cunha et al., 2016, Misharin et al., 2013). Récemment de nouveaux marqueurs de surfaces ont été identifiés, CD38, Fpr2 et Gpr18. Cependant, cette identification est le résultat d'études *in vitro*, à l'exception du marqueur CD38, dont la présence dans l'identité des M1 a été aussi confirmé *in vivo* 12h post-stimulation par LPS (Jablonski et al., 2015, Funes et al., 2018).

En définitive, l'activation des macrophages inflammatoires se distingue par plusieurs facteurs comme la production de cytokines/chimiokines spécifiques, la production de NO et l'expression de marqueurs de surface (figure 1.8). Ainsi, les macrophages M1 sont des alliés de prédilection dans la génération de la réponse inflammatoire et des partenaires essentiels dans la destruction des pathogènes.

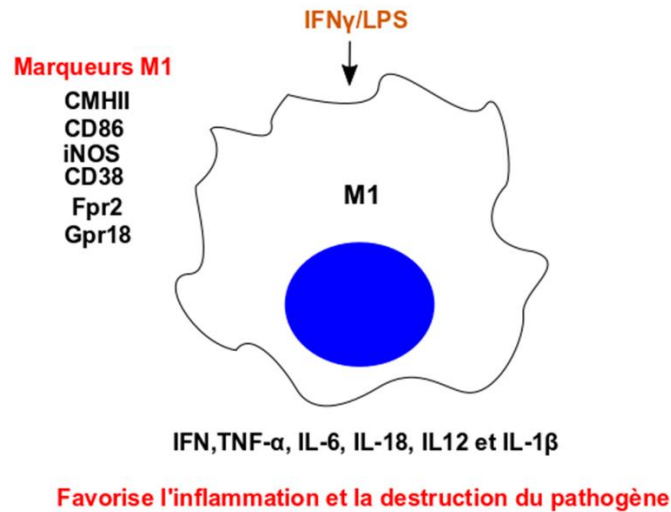


Figure 1.8 Les macrophages M1

La stimulation par IFN $\gamma$ /LPS polarise les macrophages M1. L'identité des macrophages M1 se caractérise par les marqueurs spécifiques CMHII, CD86, CD38, Fpr2, Gpr18 et iNOS ainsi qu'une production des cytokines IFN, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-18 et IL-1 $\beta$

#### 1.4.2 Macrophages alternativement activés (M2)

La cicatrisation tissulaire est par définition un programme de réparation et de rétablissement de l'homéostasie, suivant un traumatisme mécanique ou en réponse à une infection. Ceci se déroule en trois étapes : 1) la coagulation sanguine et l'inflammation, 2) la résorption de l'inflammation et la régénération et 3) la vascularisation tissulaire. Ces processus sont communs à tous type cellulaire et aux différents types de blessures. D'ailleurs, ces étapes sont contrôlées et régulées par les macrophages. Les macrophages M1 sont responsables de la destruction des pathogènes et les macrophages M2 limitent l'inflammation, éliminent les cellules apoptotiques et orchestrent la réparation tissulaire (Kim and Nair, 2019). Les macrophages M2 sont classés en quatre groupes selon la nature des stimuli et les marqueurs générés soit M2a, M2b, M2c et M2d (Roszer, 2015).

La polarisation M2a est générée à la suite d'une stimulation par les interleukines IL-4 et IL-13 (Zhang et al., 2017, Mantovani et al., 2004). En effet, IL-4 et IL-13 sont produites par les cellules Th2, éosinophiles, basophiles et par les macrophages eux-mêmes. L'IL-4 est reconnue par deux récepteurs différents, de type I et de type II. Le récepteur de type I se compose du récepteur IL-4R $\alpha$  qui forme une paire avec une chaîne commune gamma ( $\gamma$ c), qui permet la liaison d'IL-4 (Heller et al., 2012). Le récepteur de type II se compose de la paire IL4-R $\alpha$ -IL-13R $\alpha$ 1

et reconnaît IL-4 ou IL-13. La liaison d'IL-4 à IL-4R $\alpha$  recrute soit  $\gamma_c$  ou IL-13R $\alpha_1$  ce qui déterminera la voie de signalisation à emprunter. L'activation du récepteur de type I induit la phosphorylation de JAK1/3 qui à son tour phosphoryle les résidus tyrosines dans le domaine cytoplasmique du IL4-R $\alpha$ . Cette phosphorylation crée un site de fixation pour les protéines STAT6 et/ou IRS-2 et leur phosphorylation subséquente (Luzina et al., 2012, Heller et al., 2008, Jiang et al., 2000). La phosphorylation de STAT6 favorise son homodimérisation et sa translocation dans le noyau. La phosphorylation d'IRS-2 active les voies de PI3K/AKT et de ERK1/2 nécessaires à l'activation du cycle cellulaire, la prolifération et la survie cellulaire (Sun et al., 1995, Ruckerl et al., 2012, Chambard et al., 2007, Yu and Cui, 2016).

Le récepteur de type II peut reconnaître soit IL-4 ou IL-13. Néanmoins, l'affinité d'IL-4 pour IL-4R $\alpha$  est plus élevée que l'affinité d'IL-13 pour IL-13R $\alpha_1$ . De ce fait, IL-4 et IL-13 compétitionnent pour la disponibilité de la sous-unité de liaison à la surface cellulaire. L'activation du récepteur de type II active les protéines JAK1 ou Tyk2, ce qui phosphoryle STAT6 et induit leur dimérisation et leur translocation au noyau (Junttila, 2018). IL-13 lie aussi le récepteur IL-13R $\alpha_2$ . Cependant, l'activité d'IL-13R $\alpha_2$  est atypique en raison de l'absence de sa partie terminale cytosolique, donc il ne peut intervenir dans l'activation de la voie de signalisation. En effet, il est exprimé à la surface de la cellule sous forme soluble ou peut être recyclé au compartiment intracellulaire. Son rôle reste encore à élucider, mais l'avancement des recherches démontre son rôle régulateur de la signalisation induite par IL-4/IL-13 (Lupardus et al., 2010). IL-13R $\alpha_2$  lie IL-13 et prévient sa signalisation à travers STAT6 et atténue partiellement la signalisation IL-4 en empêchant la dimérisation de STAT6 (McCormick and Heller, 2015). Le mécanisme par lequel IL-13R $\alpha_2$  procède est encore sous investigation (figure 1.9).

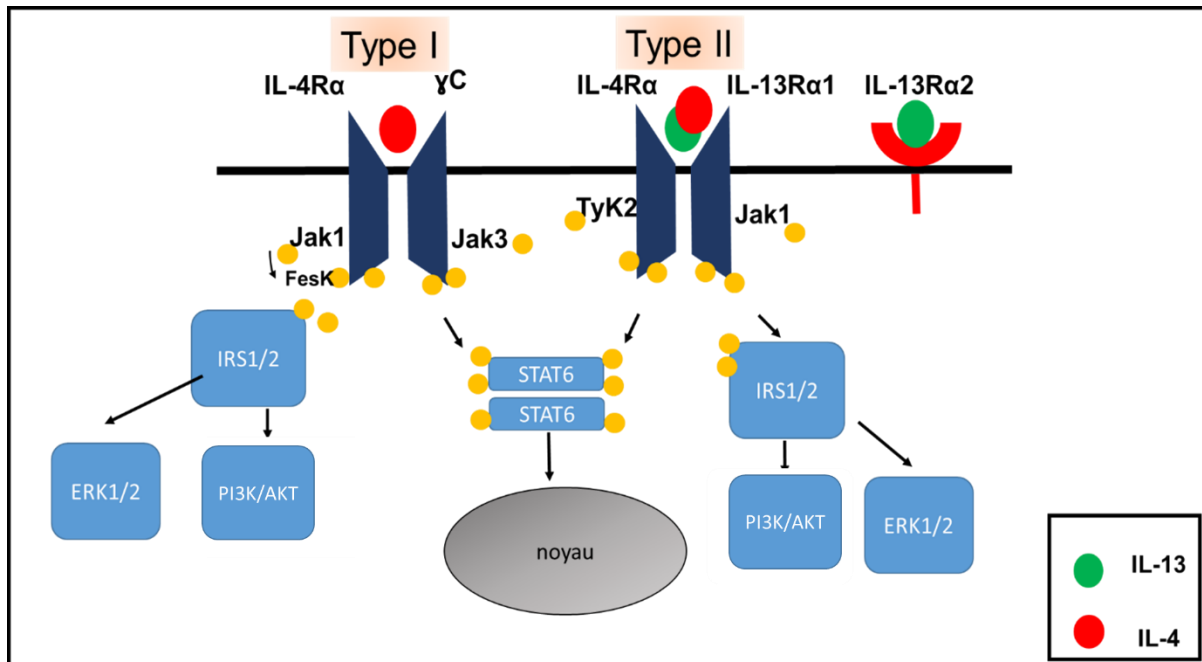


Figure 1.9 La voie de signalisation d'IL-4/IL-13 dans les M2a

L'activation du récepteur de type I induit la phosphorylation de JAK1/3 et Fes kinases. Fes phosphorylée phosphoryle à son tour IRS1/2 qui active PI3K/AKT et ERK1/2. JAK3 activé phosphoryle STAT6 ce qui induit sa dimérisation et sa translocation dans le noyau pour la transcription de ces gènes cibles. L'activation du récepteur de type II par IL-4 ou IL-13 phosphoryle TyK2 et JAK1 et induit la phosphorylation et l'activation de STAT6 et de IRS1/2. La liaison d'IL-13 au IL-13Rα2 n'induit pas de signal (Hershey, 2003, McCormick and Heller, 2015).

Le sous-type M2a est principalement impliqué dans les réactions allergiques (asthme) (Abdelaziz et al., 2020). Ces macrophages reconnaissent les sucres associés aux membranes des pathogènes (N-acetyl-D-glucosamine, L-fucose et D-mannose) par l'expression des marqueurs de surface CD206 (MRC1) et le galactose présent sur certains allergènes par CD301 (Raes et al., 2005). Cette reconnaissance induit leur phagocytose et leur élimination (Martinez and Gordon, 2014). Les M2a se démarquent aussi par l'expression de certaines protéines spécifiques comme Ym1 et Fizz1 (Retnlα) ainsi que par l'expression des enzymes arginase-1 et transglutaminase-2 (Yamaguchi et al., 2016) et par l'induction des chimiokines CCL17 et CCL22 pour le recrutement et la différenciation des cellules Th2 (Abdelaziz et al., 2020). De plus, les M2a contrecarrent l'inflammation par l'expression de l'IL-1RA, un antagoniste du récepteur IL-1R (Arend, 1990, Martinez et al., 2009, Pechkovsky et al., 2010). IL-1R est activé par l'interleukine inflammatoire IL-1, par conséquent les M2a inhibe cette signalisation. De plus, les M2a activent



les facteurs de transcription KLF4 et IRF-4 qui inhibent la polarisation M1 en bloquant l'activation NF- $\kappa$ B (Kapoor et al., 2015) et promeuvent la polarisation M2 par l'induction de l'expression de CD206, respectivement (Li et al., 2018). Finalement, les M2a contribuent à la réparation tissulaire par l'expression du facteur de croissance tissulaire, TGF- $\beta$  et favorisent la fibrose et la cicatrisation des plaies. Ainsi, ils sont appelés des macrophages cicatrisants (Abdelaziz et al., 2020, Martinez et al., 2013).

La polarisation M2b est induite à la suite d'une stimulation par un complexe immunitaire en combinaison avec des agonistes des TLR ou par des agonistes du récepteur IL-1 (Mosser and Edwards, 2008, Martinez and Gordon, 2014). Cette catégorie exprime à forte dose IL-10 et à faible dose IL-12. Mais IL-10 seul n'est pas un facteur déterminant pour distinguer les M2b, considérant que d'autres sous-catégories des M2 l'expriment. Par contre, les M2b sont les seuls qui expriment la chimiokine CCL1. En effet, CCL1 recrute les monocytes, les lymphocytes NK, les lymphocytes B immatures et les cellules dendritiques (Mantovani et al., 2004, Atri et al., 2018, Ito et al., 2016). En outre, un autre facteur soluble nommé LIGHT est produit lors de la stimulation des M2b. Cependant, sa présence doit être associée avec d'autres marqueurs M2b car il est aussi exprimé par d'autres cellules comme les lymphocytes T (Edwards et al., 2006, Zhu and Fu, 2011). L'expression du marqueur de surface CD86 peut discriminer entre les différentes catégories des M2 (Zhang et al., 2015a). Mais son expression sur les cellules présentatrices d'antigènes qui stimulent l'activation des Th1 fait de lui un marqueur M1 également (Matsui et al., 2017, Mulder et al., 2014). De la même façon, les M2b expriment TNF $\alpha$  et IL-6 ce qui permet de les distinguer des autres sous-types des M2. Cependant, ces marqueurs doivent être également utilisés en combinaison avec d'autres marqueurs M2b pour pouvoir conclure étant donnée leur expression par les M1 (Wang et al., 2019). La fonction primaire des M2b est de moduler et de limiter l'inflammation, pour cette raison ils sont considérés comme régulateurs (Ito et al., 2017). Dans un contexte tumoral, les M2b prédisposent à la néoplasie (Mosser and Edwards, 2008).

Les M2c sont activés par une stimulation par IL-10, par des glucocorticoïdes ou par TGF- $\beta$  (Roszer, 2015, Ferrante and Leibovich, 2012). Les M2c sont aussi appelés « deactivated macrophages ». Cette terminologie est survenue lors d'une étude *in vitro* qui montre la capacité des macrophages à adopter un profil M2 après un profil M1 en réponse à une stimulation par IL-10. Par conséquent, ils ont la capacité d'inactiver les gènes associés aux M1 comme TNF $\alpha$  et IL-12. Dans la même optique, une surexpression d'IL-10 chez des souris transgéniques met en évidence le rôle autocrine/paracrine d'IL-10 à désactiver la réponse inflammatoire résultant en

une augmentation de la charge bactériale chez les souris infectées par *Mycobacterium bovis* *bacille Calmette-Guérin* (Lang et al., 2002, Porcheray et al., 2005). M2c se caractérisent par une fonction d'angiogenèse et une capacité phagocytaire élevée pour les cellules apoptotiques (Roszer, 2015). Une analyse génétique des gènes exprimés dans la polarisation M2c a montré une augmentation de l'expression de certains gènes dans les M2c comparée aux contrôles tels que, CD163 qui est impliqué dans la phagocytose et certains gènes impliqués dans la régulation de la matrice extracellulaire, les plus fortement exprimés sont : *VCAN*, *MMP7*, *MMP8*, *TIMP1*, *PLOD2* et *COL22A1*. Bien que leur fonction reste peu connue, leur capacité d'induire l'expression d'enzymes impliqués dans le remodelage de la matrice tels que, *MMP7*, *MMP8* et *TIMP1* leur confère un rôle fibrolytique et confirme leur implication dans la cicatrisation tissulaire (Lurier et al., 2017). À la suite d'une blessure, les neutrophiles sont les premiers à se rendre au site de l'inflammation et au fur et à mesure du processus de la guérison et la migration des macrophages au site de l'inflammation, les neutrophiles entreprennent alors l'apoptose (Singer and Clark, 1999). Dans ce contexte les M2c ont été montrés ayant une importante capacité phagocytaire pour les neutrophiles apoptotiques (Zizzo et al., 2012) ce qui est confirmé par l'expression de gènes associés à la phagocytose (Lurier et al., 2017). Les marqueurs murins connus des M2c sont CD206, YM1, B7-H4, Arg-1, CD163, MerTK (Loegl et al., 2016, Lu et al., 2013, Shao et al., 2010) et les facteurs de transcription HIF-1 $\alpha$  et IRF4 (Lu et al., 2013) et l'expression de STAT3, IL-10, TGF- $\beta$  et TIMP-1 (Koscso et al., 2013).

La dernière catégorie des M2 est les M2d. Le profil M2d est engendré par la stimulation de macrophages avec des agonistes des TLR 2/4/7/9 et des agonistes des récepteurs à adénosine (A2AR et A2BR) (Wang et al., 2010, Wang et al., 2019, Roszer, 2015). L'adénosine est un métabolite généré par la dégradation de l'ATP cellulaire dans des conditions de stress comme l'hypoxie ou l'ischémie ou par les cellules apoptotiques (Pinhal-Enfield et al., 2003). Les M2d activés expriment le facteur de croissance endothéliale vasculaire VEGF qui par conséquent stimule l'angiogenèse et la perméabilité vasculaire (Yao et al., 2019) et diminuent l'expression de la cytokine inflammatoire TNF $\alpha$  (Ferrante et al., 2013). Leur spécificité est leur capacité à changer du profil M1 à M2d. Cependant, une stimulation des TLR est requise au préalable pour augmenter l'expression du récepteur A2R. Toutefois, ils n'expriment pas les marqueurs classiques du phénotype M2a (Ym1, Fizz1 ou CD206). Par contre, ils expriment fortement IL-10 et iNOS (Ferrante et al., 2013). Les M2d sont polarisés dans l'environnement tumoral par IL-6, ils suppriment la réponse immunitaire et promeuvent l'angiogenèse (Cheng et al., 2019).

En conclusion, le profil anti-inflammatoire des macrophages dans la guérison et la cicatrisation des plaies est hétérogène et ambigu. Certes, les macrophages anti-inflammatoires sont référés à des macrophages M2 dans la plupart du temps pour des raisons pratiques, néanmoins, leur divergence de profil (figure 1.10) est importante et requise dans le processus de guérison tissulaire.

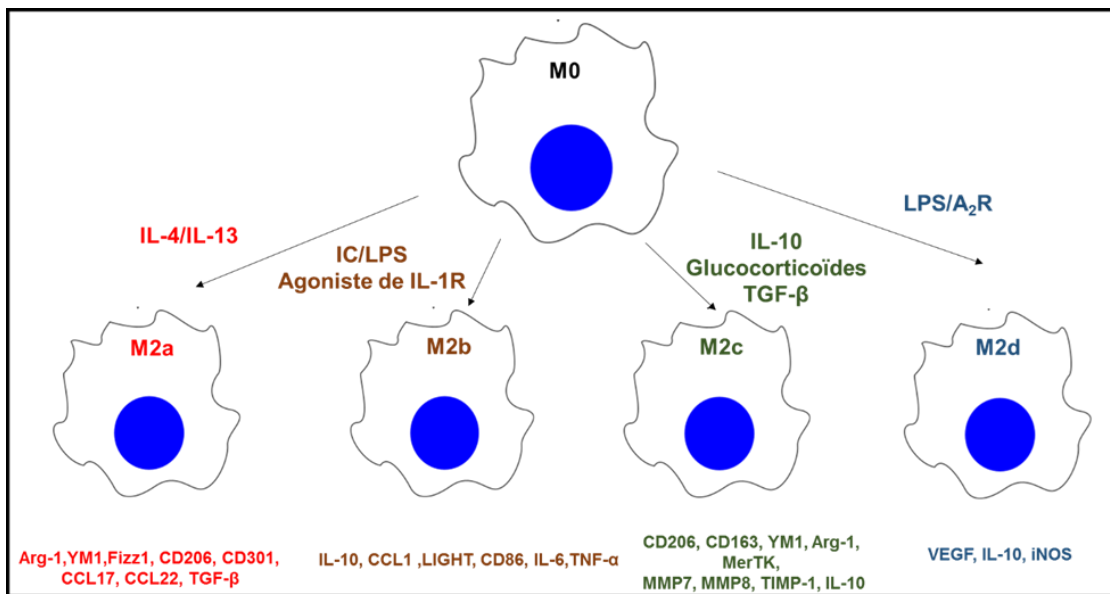


Figure 1.10 Schéma illustrant les différents profils des macrophages alternatifs M2

### 1.4.3 Les macrophages associés aux tumeurs (TAM)

Le contexte environnemental influence le comportement et la destinée des macrophages. Il s'avère que dans un environnement tumoral, la polarisation des macrophages est plus étendue et plus complexe que les deux extrêmes M1 et M2. En effet, une autre catégorie voit le jour. Les macrophages infiltrant les tumeurs solides sont appelés TAM (Ruffell et al., 2012, Singh et al., 2017). La fonction des TAM est pro-tumorale, elle favorise notamment l'invasion tumorale et l'angiogenèse. Étant donné que la présence des TAM est aussi associée à un mauvais pronostic, ils sont alors sujets à plusieurs études dans le but de les identifier comme une cible thérapeutique. En plus de leur fonction dévastatrice pour l'hôte, leur expression de marqueurs de surfaces communs aux M1 et aux M2 amplifie leur ambiguïté (Chavez-Galan et al., 2015, Haque

et al., 2019, Jayasingam et al., 2019) (figure 1.11). Il est certes établi que la présence de certaines chimiokines telles que CCL2, CCL11, CCL16 et CCL21 dans plusieurs cancers (des poumons, du sein, de l'œsophage et des ovaires) indique l'infiltration des macrophages et l'angiogenèse (Santoni et al., 2014, Qiu et al., 2018). Par ailleurs, les TAM y contribuent en produisant CCL2 de sorte qu'ils recrutent à leur tour les monocytes au site tumoral. De plus, la densité de CCL2 est associée à la densité des TAM et à l'étendue de l'invasion tumorale (Mantovani et al., 2010, Roca et al., 2009). En outre, les TAM expriment certains récepteurs kinases tels que Tyro3, AXL, MerTK qui sont importants pour leur interaction avec les cellules tumorales (Myers et al., 2019). Les TAM partagent des caractéristiques des macrophages M1 et M2, mais considérant leur fonction de maintien de la survie tumorale, ils sont par conséquent appelés « M2-like » (Laoui et al., 2011, Mantovani et al., 2002, Henze and Mazzone, 2016). Par leur sécrétion de cytokines, les TAM promeuvent la progression tumorale. Par exemple, IL-6 augmente la transition épithélio-mésenchymateuse qui est une caractéristique des tumeurs des cellules souches par la voie JAK/STAT3/Snail. IL-8 intensifie la métastase en augmentant l'expression de la protéine ELMO1 exprimée sur les cellules tumorales qui leur permettent de migrer (Zhang et al., 2015b, Zhou et al., 2020). IL-10, TGF- $\beta$  et MMP-7 contrecarrent l'inflammation et inhibent le processus de présentation antigénique en favorisant l'homéostasie tissulaire. Par conséquent, les lymphocytes T perdent leur capacité de reconnaissance et de destruction (Gao et al., 2018, Yadav et al., 2011, Shao et al., 2015, Zhou et al., 2020).

L'hostilité de l'environnement tumorale est certes néfaste pour l'hôte mais bénéfique pour les cellules cancéreuses. Plus encore, l'hypoxie dans les cancers est corrélée avec un mauvais présage. L'hypoxie tumorale se produit lors d'une prolifération cellulaire aberrante induisant une croissance des vaisseaux sanguins, donc l'approvisionnement en oxygène devient limité (Carmeliet and Jain, 2000). Quand les TAM infiltrerent des régions hypoxiques, ils adoptent un profile « M1-like ». N'empêche, dans l'environnement tumoral, l'aspect pro-inflammatoire des « M1-like » favorise tout de même la transformation maligne des cellules (Elinav et al., 2013, Leifler et al., 2013) et il est associé à une augmentation de la sévérité des cancers ovariens (Maccio et al., 2020). L'absence d'oxygène mène à une production des ROS par l'effet Warburg (Sabharwal and Schumacker, 2014) ou par le complexe III de l'ETC qui est nécessaire à l'induction du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  qui est stabilisé lors de l'hypoxie (Guzy and Schumacker, 2006, Viola and Hool, 2010). La production des ROS provoque des dommages à l'ADN. Cette instabilité génomique mène à une accumulation d'oncogènes donc favorise l'agressivité tumorale (Sabharwal and Schumacker, 2014). De plus, les TAM sécrètent des facteurs de croissance tels que, FGF2, PDGF et VEGF qui supportent la croissance tumorale,

ainsi que des enzymes protéolytiques (MMP-7, MMP-2 et MMP-9) pour la destruction de la matrice extracellulaire ce qui intensifie l'invasion tumorale (Kuwabara et al., 1995, Harmey et al., 1998, Burke et al., 2003, Henze and Mazzone, 2016). De surcroît, l'expression de HIF-1 $\alpha$  par les TAM induit l'expression de la protéine PD-L1 par les macrophages (Shan et al., 2020). Par la suite, PD-L1 inhibe le récepteur PD-1 sur les lymphocytes T ce qui aboutit à la suppression de la réponse immunitaire (Zhu et al., 2020, Shan et al., 2020).

La survie tumorale est régulée par l'interaction entre les cellules tumorales et les TAM. Cette interaction ne permet pourtant pas la phagocytose par les TAM. Pour que le processus phagocytaire soit entamé, les cellules malignes doivent exprimer des ligands spécifiques au message « mange moi » comme la calréticuline, les anticorps opsonisés, SLAMF7 et les phosphatidylsérines etc. Dans le cas contraire, les cellules expriment les ligands « ne me mange pas » tels que CD47, PD-L1 et le CMHI qui empêchent leur destruction (Barkal et al., 2018, Gordon et al., 2017, Feng et al., 2019). L'équilibre entre les signaux « mange moi » et « ne me mange pas » dicte le devenir de la cellule tumorale. Dans la majorité des cas, il y a une prévalence de ligands qui n'induisent pas la phagocytose (Lecoultre et al., 2020). Dans cet intérêt, une stratégie a été élaborée pour induire la phagocytose des cellules tumorales par les TAM en inhibant le ligand CD47 ou son récepteur SIRP $\alpha$ . En effet, l'utilisation d'anticorps antagonistes stimule la phagocytose et diminue la croissance tumorale dans des modèles précliniques de glioblastomes (Gholamin et al., 2017).

En conclusion, la présence des TAM dans les tumeurs solides est encore une autre preuve du pouvoir d'adaptation de notre système et de l'efficacité des cellules tumorales à en tirer profit. La polarisation des macrophages en TAM n'est jamais de bon augure. Ils privilégient la métastase et inhibent les réponses immunitaires. C'est pourquoi considérer les TAM comme des cibles thérapeutiques est de première nécessité. Fort heureusement, certains agents thérapeutiques ont été développés. Ces médicaments ont soit été approuvés ou sont en cours d'évaluation tels que Trabectedin (induit l'apoptose des TAMs) (Germano et al., 2013), Zoledronic (renverse la polarisation de M2-like à M1-like en bloquant les cytokines anti-inflammatoires) (Gnant et al., 2011) et le Emactuzumab (inhibe le recrutement des TAM en bloquant CSF-1R (Pradel et al., 2016).

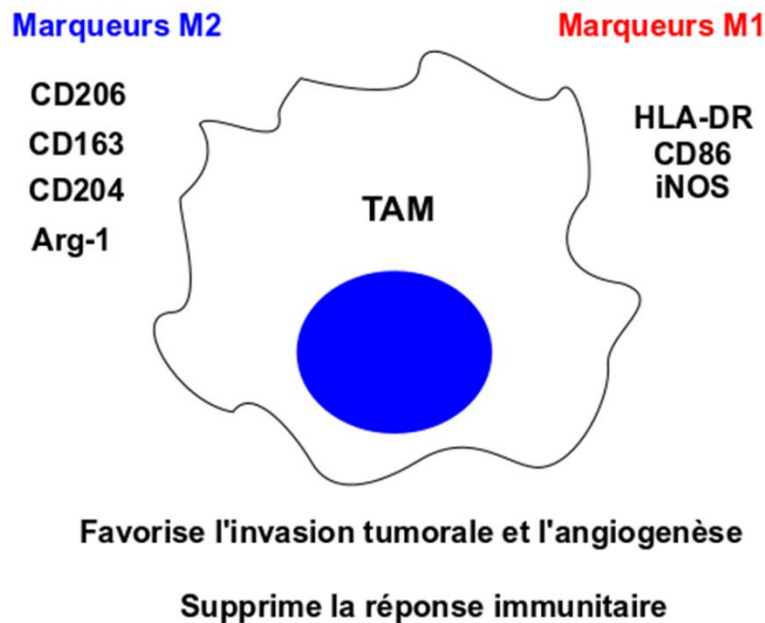


Figure 1.11 Les marqueurs et les fonctions des TAM

## 1.5 Le métabolisme énergétique

La distinction entre les différents profils des macrophages engendrés par une polarisation inflammatoire ou anti-inflammatoire repose sur l'association de marqueurs de surfaces et l'expression de gènes spécifiques. De ces paramètres se dessine un phénotype particulier. En revanche, d'autres changements métaboliques peuvent y être associés. La compréhension du métabolisme permet de prévoir l'adaptation de la cellule aux changements environnementaux et d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques.

Les processus métaboliques sont toujours définis comme une relation entre la production, l'utilisation et la distribution de ressources. Aussi, il est important que la coordination entre l'utilisation et l'approvisionnement en métabolites soit contrôlée, afin de satisfaire les besoins de biosynthèse et d'énergie (Ye and Medzhitov, 2019). Une défaillance dans la production et/ou la consommation peut mener à des troubles métaboliques qui sont à l'origine de certaines maladies telle que le diabète (Kotas and Medzhitov, 2015). Les voies métaboliques qui sont impliquées dans le métabolisme énergétique nécessaire au maintien de la prolifération, de la survie et de la fonction cellulaire, dépendent de deux paramètres principaux, la glycolyse et la respiration

mitochondriale (O'Neill et al., 2016) (figure 1.12). Lors de la glycolyse, le glucose est converti en pyruvate. Le pyruvate intègre la mitochondrie où il sera converti en acétyl-coenzyme A (Acétyl-CoA). L'acétyl-CoA intègre le cycle de Krebs (nommé aussi cycle de l'acide tricarboxylique ou cycle de l'acide citrique) où il est oxydé. NADH et FADH<sub>2</sub> qui sont produits du cycle de Krebs alimentent la chaîne de transport d'électrons mitochondriale (ETC), ce qui aboutit à la production d'ATP. L'ETC se compose de cinq complexes où se déroule une série de transport d'électrons. Les réactions d'oxydo-réduction générées par NAD<sup>+</sup>/NADH et FAD/FADH<sub>2</sub> induisent la consommation d'O<sub>2</sub> par le complexe IV et une production d'ATP par le complexe V (figure 1.13). Ce processus est appelé la phosphorylation oxydative (OXPHOS). La respiration mitochondriale se déroule en aérobie (Martinez-Reyes and Chandel, 2020). En absence d'oxygène, la production d'ATP est exclusivement générée par la conversion du pyruvate en lactate sans l'intervention du métabolisme mitochondrial. Toutefois, cette voie est aussi active en aérobie dans des conditions tumorales. De surcroît, les deux voies peuvent compenser le déficit énergétique lors d'un dysfonctionnement dans la glycolyse ou dans la respiration mitochondriale (Shiratori et al., 2019). La génération de l'ATP par la glycolyse en présence d'oxygène est appelée l'effet Warburg (détaillé plus loin) (Zheng, 2012).

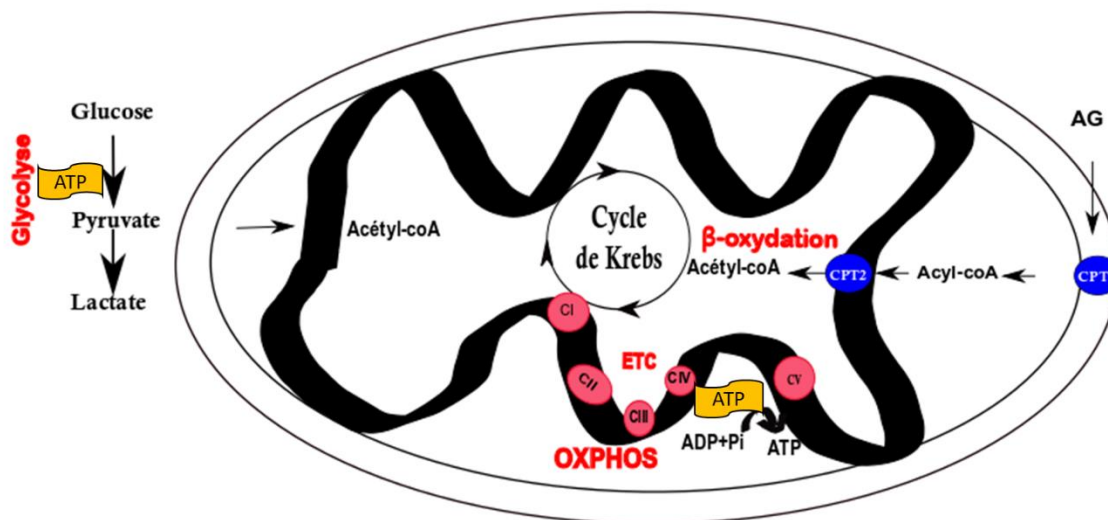


Figure 1.12 La production d'ATP par le métabolisme mitochondrial et la glycolyse

Le pyruvate issu de la glycolyse intègre le cycle de Krebs dans la mitochondrie. Son oxydation alimente l'ETC et génère l'ATP par l'OXPHOS. Les acides gras rentrent dans la mitochondrie par les protéines CPT1 et CPT2. Ils sont par la suite convertis en Acétyl-CoA par la β-oxydation et intègrent le cycle de Krebs qui stimule la production d'ATP par l'OXPHOS. La conversion du pyruvate en lactate génère de l'ATP par la glycolyse

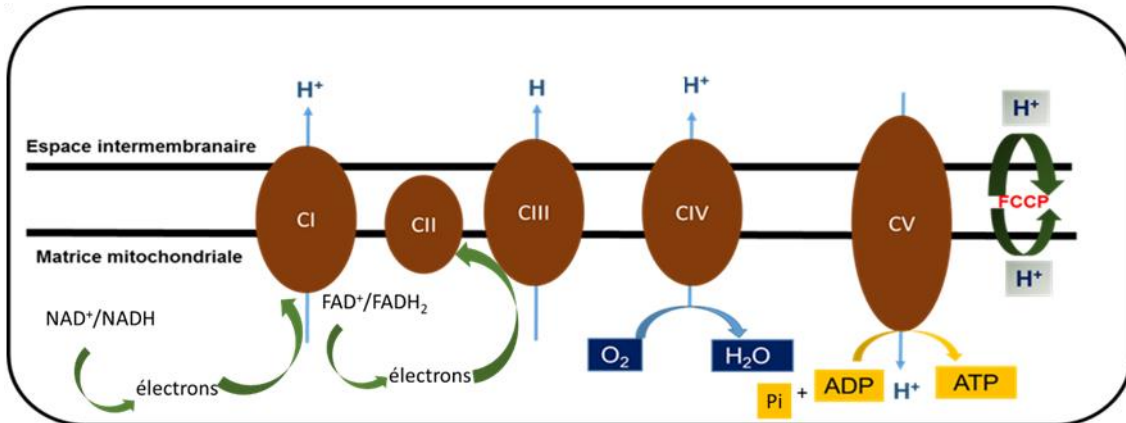


Figure 1.13 Modélisation de la chaîne de transport d'électrons et des inhibiteurs des différents complexes

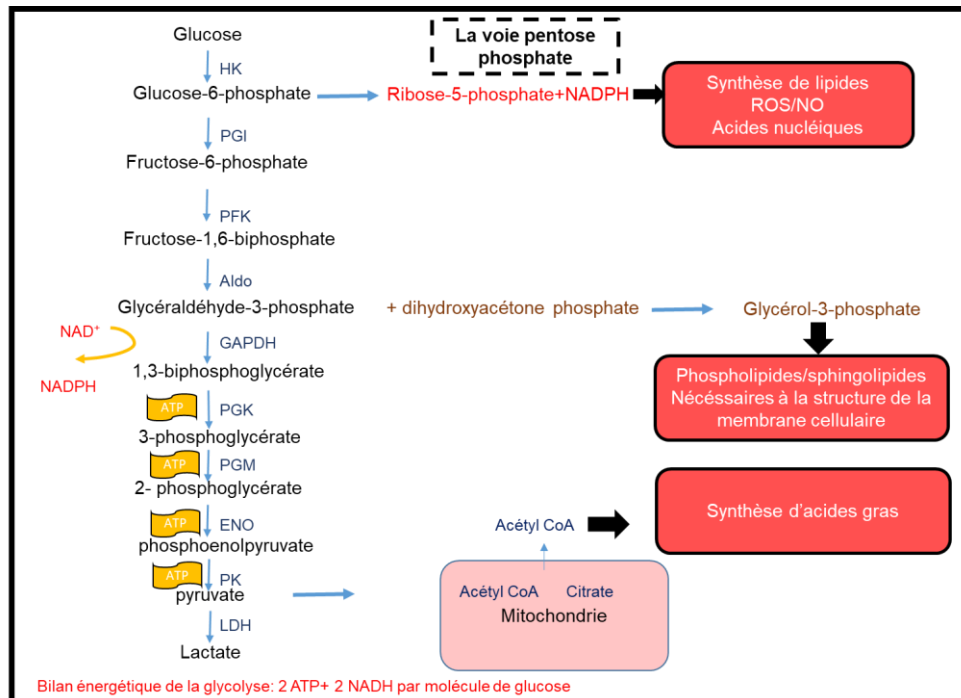
La roténone et l'antimycine bloquent l'activité de l'ETC, l'oligomycine inhibe la production d'ATP et le FCCP perturbe le potentiel mitochondrial membranaire générant une consommation d'oxygène maximale.

### 1.5.1 Métabolisme des macrophages M1

Les macrophages inflammatoires M1, se caractérisent par un métabolisme glycolytique (Zhu et al., 2015, Zlotnik and Yoshie, 2000, Liu et al., 2021, Tannahill et al., 2013). Ceci se traduit par leur capacité à produire de l'ATP par la production de lactate issu de la glycolyse en condition aérobie. Ce mécanisme est appelé l'effet Warburg. L'effet Warburg est défini comme la production de l'ATP par la glycolyse en présence d'oxygène. Cependant, il est aussi important de souligner que le métabolisme glycolytique n'est pas autant efficace que le métabolisme mitochondrial dans la biosynthèse d'ATP (Epstein et al., 2014, DeBerardinis and Chandel, 2020). En effet, par la glycolyse deux molécules d'ATP sont générées par molécule de glucose, contrairement à la phosphorylation oxydative qui génère plus de 36 molécules d'ATP par molécule de glucose. Par contre, la voie de la glycolyse répond aux demandes énergétiques plus rapidement (Vander Heiden et al., 2009). De plus, le maintien du niveau glycolytique dans les cellules en prolifération est primordial. Le glucose est non seulement un carbohydrate précurseur de la biosynthèse de constituants essentiels pour la division, mais aussi une source de carbone pour la synthèse d'acides nucléiques. En effet, il y contribue par un minimum de cinq carbones (Lunt and Vander Heiden, 2011, Luke A. J. O'Neill, 2016). Il intervient aussi dans la synthèse d'acides gras (AG) par l'intermédiaire d'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA est généré par la conversion du pyruvate dans la mitochondrie avant d'intégrer le cycle de Krebs, ce qui ne le rend pas accessible



pour la synthèse de lipides dans le cytosol. Pour ce faire, après sa conversion en citrate, il est exporté dans le cytosol où il redevient acétyl-CoA par l'enzyme ATP citrate lyase (AclY) (Lin et al., 2013). De plus, les intermédiaires glycolytiques (dihydroxyacétone de phosphate et glycérol-3-phosphate) jouent un rôle important dans la synthèse de phospholipides et de triacylglycérols, qui sont des lipides structuraux majeurs de la membrane cellulaire, de la cardiolipine nécessaire à la membrane mitochondriale (Dudek, 2017, Kiebish et al., 2008, Schlame, 2008) et des sphingolipides qui sont impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire (Futerman and Hannun, 2004). En outre, le premier intermédiaire de la glycolyse, le glucose-6-phosphate (G6P), est un substrat limitant pour la voie du pentose phosphate (PPP). À l'opposé de la glycolyse, la PPP ne génère pas d'ATP, mais fournit deux métabolites vitaux pour la prolifération cellulaire, NADPH et ribose-5-phosphate (R5P). R5P est un précurseur à tous les nucléotides et NADPH est un agent réducteur essentiel pour la synthèse d'acides gras, d'acides aminés non essentiels et de nucléotides. La voie PPP se divise en deux branches, la voie oxydative et la voie non oxydative (Polat et al., 2021, Wamelink et al., 2008). La voie oxydative implique la conversion du G6P en 6-phosphogluconolactone et NADPH. Ensuite, le 6-phosphogluconolactone est converti en 6-phosphogluconate. Enfin, le 6-phosphogluconate produit le ribulose-5-phosphate et NADPH. En revanche, la voie non oxydative aboutit à la production de R5P et xylulose-5-phosphate. Grâce aux enzymes TKT et TALDO et par des réactions réversibles, cette voie approvisionne la PPP en métabolites et peut aussi approvisionner la glycolyse en fructose-6-phosphate et en glycéraldéhyde-3-phosphate alors que la voie oxydative contribue majoritairement à la production du NADPH cytosolique (Xue et al., 2018a, Polat et al., 2021). D'ailleurs, NADPH est un substrat pour l'enzyme NADPH oxydase (NOX) et l'enzyme oxyde nitrique synthase (NOS). Ces enzymes génèrent les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'oxyde nitrique (NO) respectivement (Wei-Chen Yena and Shih-Hsiang Cheng, 2019, Ge et al., 2020, Lunt and Vander Heiden, 2011) (figure 1.14).



**Figure 1.14 Le métabolisme du glucose**

L'implication de la glycolyse et l'utilisation du glucose comme substrat sont décrites dans la régulation et le contrôle des fonctions des macrophages M1 (Tannahill et al., 2013). En effet, les macrophages stimulés au LPS montrent une augmentation du taux d'acidification extracellulaire (ECAR) et une diminution du taux de consommation d'oxygène (OCR). De plus, ceci est confirmé par l'augmentation de l'expression de gènes glycolytiques (*Hk2*, *Ldha*, *Pfk1*) ainsi qu'une augmentation de la consommation de glucose (Wang et al., 2018, Baseler et al., 2016). En outre, l'absence du transporteur du glucose GLUT1 dans les macrophages (*Slc2a1<sup>-/-</sup>*) diminue l'utilisation du glucose lors d'une stimulation inflammatoire par LPS/IFN- $\gamma$ . Ceci corrèle avec une diminution de l'ECAR (Van den Bossche et al., 2015, Freemerman et al., 2019). Par conséquent, ces macrophages sont moins glycolytiques. Cette observation est aussi confirmée par la diminution d'autres intermédiaires glycolytiques, tels que le glucose-6-phosphate et le fructose 6-phosphate ainsi que la diminution du R5P de la voie PPP, Plus encore, la fonction des macrophages *Slc2a1<sup>-/-</sup>* activés par des stimuli inflammatoires est aussi altérée. Effectivement, ils montrent une diminution du ratio citrulline/ornithine ce qui indique que l'activité de l'arginase est favorisée par rapport à celle de iNOS. Cette observation est aussi accompagnée d'une diminution des ROS et de NO ainsi qu'une augmentation du ratio des formes réduites du glutathion (GSH/GSSG). Ces paramètres indiquent une diminution du stress oxydatif dans les macrophages

*Slc2a1*<sup>-/-</sup>. Ainsi la déficience de la glycolyse dans les macrophages affecte leur potentiel inflammatoire. Il est à noter aussi que la délétion de GLUT1 dans les macrophages n'incite pas de compensation par d'autres transporteurs de glucose mais une augmentation de l'utilisation des acides gras ce qui suggère que les macrophages compensent par ce substrat (Freemerman et al., 2019).

Le profil glycolytique des macrophages M1 dénote de l'implication d'intermédiaires et d'enzymes de la glycolyse dans l'établissement de la fonction inflammatoire. Le glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) de la voie PPP est un enzyme limitant dans l'induction de NADPH qui est un cofacteur essentiel à la production de NO et ROS, ce qui fait de lui un acteur clé dans l'établissement du profil inflammatoire (Luzzatto et al., 2016, Stanton, 2012). Une surexpression de G6PD dans des macrophages activés par LPS engendre une augmentation des gènes pro-inflammatoires (IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP-1) et de la production des ROS et iNOS. L'expression de ces gènes est abolie lors de la suppression ou du blocage de l'activité de G6PD. De plus, le blocage de ROS après une stimulation au LPS diminue l'expression des gènes inflammatoires. À l'opposé, l'ajout de NADPH les augmente. Ces données mettent en relief l'activité pro-inflammatoire du G6PD dans les macrophages. En induisant une augmentation de la concentration intracellulaire de NADPH, G6PD contrôle l'expression des gènes pro-inflammatoires par l'intermédiaire des ROS (Ham et al., 2013).

Le Pyruvate kinase M2 (PKM2) est un autre enzyme important dans la régulation de l'effet Warburg et dans l'apparition du profil M1. PKM2 est responsable de la dernière étape de la glycolyse en produisant le pyruvate (Boxer et al., 2010, Zhang et al., 2019b, Su et al., 2019). De plus, l'isoforme PKM2 favorise l'utilisation du pyruvate pour produire du lactate au lieu de son utilisation par le cycle de Krebs (Christofk et al., 2008). Dans le cytosol, PKM2 est sous forme active et adopte une configuration tétramérique. Son inactivation suite à sa phosphorylation à la tyrosine 105 lui confère une configuration monomérique ou dimérique. Ensuite, sous sa nouvelle configuration PKM2 transloque dans le noyau (Hitosugi et al., 2009). L'activation des macrophages par LPS/IFN- $\gamma$  induit l'expression de marqueurs M1 HIF-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF $\alpha$ . L'ajout de DASA-58 et de TEPP-46, activateurs de PKM2 (Anastasiou et al., 2012) précédant la stimulation, abolit l'expression de HIF-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , mais n'a pas d'effet sur IL-6 et TNF $\alpha$  ce qui montre le rôle étroit de PKM2 dans la régulation de l'expression de HIF-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$ . En effet, la liaison de PKM2 endogène au HIF-1 $\alpha$  endogène plus spécifiquement au promoteur d'IL-1 $\beta$ , augmente suite à la stimulation par LPS. À l'inverse, l'activation de PKM2 diminue le niveau protéique de HIF-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$ . Donc, PKM2 régule négativement l'expression de ces gènes.

Cependant, une délétion conditionnelle de *Pkm2* diminue aussi l'expression de HIF-1 $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  dans les macrophages activés ce qui confirme que PKM2 à un rôle déterminant dans le contrôle de l'effet Warburg (Luo and Semenza, 2011, Alves-Filho and Palsson-McDermott, 2016). Ces données mettent en relief l'importance de l'activation/inactivation de PKM2 dans la glycolyse. En définitive, sa forme active tétramérique prévient sa liaison avec HIF-1 $\alpha$  et inhibe l'induction d'IL-1 $\beta$ . En revanche, sous sa forme monomère/dimère inactive, le PKM2 transloque au noyau et active l'activité transcriptionnelle de HIF-1 $\alpha$  en se liant au promoteur d'IL-1 $\beta$  (Palsson-McDermott et al., 2015). Tout bien considéré, G6PD et PKM2 sont deux enzymes de la glycolyse qui contribuent à l'apparition du profil inflammatoire des macrophages.

Le métabolisme des macrophages M1 se caractérise par des dysfonctionnements au niveau du cycle de Krebs. La stimulation par LPS induit des perturbations au niveau de la quantité des métabolites produits par le cycle de Krebs. Ceci se présente par une accumulation de citrate, de cis-aconitate, de succinate et d'itaconate ainsi qu'une diminution de l' $\alpha$ -kétoglutarate ( $\alpha$ -KG) (Jha et al., 2015a, Strelko et al., 2011). En effet, le cycle de Krebs des M1 se caractérise par deux arrêts à deux niveaux principaux. En raison d'une diminution du niveau de l'enzyme IDH1, le cycle s'arrête une première fois résultant à l'accumulation de citrate et une diminution de l' $\alpha$ -KG. Une augmentation de l'expression de l'enzyme IRG1 est aussi notée dans les M1. L'IRG1 convertit le cis-aconitate en d'itaconate. L'itaconate induit un deuxième arrêt du cycle en inhibant l'enzyme succinate déshydrogénase (SDH). L'inactivation du SDH inhibe l'oxydation du succinate menant à son accumulation (Viola et al., 2019) (figure 1.16). L'accumulation des métabolites du cycle de Krebs incite leur utilisation et influence par conséquent le profil inflammatoire des macrophages. L'excès de citrate est transporté de la matrice mitochondriale au cytosol par la protéine mitochondriale CIC qui l'échange avec un malate. Le malate s'incorpore au cycle de Krebs et stimule l'OXPPOS (Catalina-Rodriguez et al., 2012) . Par la suite le citrate est clivé par l'enzyme citrate lyase pour produire l'acétyl-CoA et l'oxaloacétate. L'acétyl-CoA est responsable de biosynthèse des AG et sert aussi de groupe acyle pour l'acétylation des histones pour l'expression de gènes glycolytiques (Shi and Tu, 2015). Quant à l'oxaloacétate, il est réduit en malate et il est ensuite décarboxylé. Cette réaction génère le NADPH nécessaire à la production de NO et des ROS (Iacobazzi et al., 2017). L'inhibition de la CIC dans les macrophages précédant leur activation par LPS engendre une diminution de NO et des ROS ce qui confirme que leur production dépend de l'expression de CIC. Plus encore, l'analyse du promoteur du CIC révèle deux sites de liaison pour NF- $\kappa$ B et leur blocage induit une diminution de l'ARNm de CIC (Infantino et al., 2011). Donc CIC est la cible de NF- $\kappa$ B et contrôle la production de NO et des ROS qui sont des marqueurs principaux de l'inflammation. Une étude plus poussée a démontré que

l'expression de CIC est induite par la TNF $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  par NF- $\kappa$ B et STAT1 respectivement (Infantino et al., 2014). En résumé, l'accumulation de citrate produit du premier arrêt du cycle de Krebs a une fonction majeure dans le maintien de la fonction microbicide des macrophages M1 en générant le stress oxydatif par la production de NO et ROS. De la même manière, l'excès du succinate issu du deuxième arrêt du cycle de Krebs est transporté de la mitochondrie au cytosol où il induit la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  en inhibant PHD (Harber et al., 2020). Il n'est pas surprenant que HIF-1 $\alpha$  soit exprimé dans les macrophages M1. Il est en effet bien établi que HIF-1 $\alpha$  est impliqué dans la régulation du métabolisme des M1, une surexpression de HIF-1 $\alpha$  dans les macrophages stimulés avec LPS induit une augmentation des marqueurs M1 et de l'ECAR et ainsi qu'une diminution de l'OCR. La surexpression de HIF-1 $\alpha$  induit plus spécifiquement l'augmentation de métabolites de la voie PPP et l'expression des gènes de la glycolyse (*Pdk1*, *Pgk1*, *Glut1*, *Gck* et *Pkm2*) ainsi que la diminution de l'oxydation mitochondriale (Wang et al., 2017). La stimulation par LPS et l'inhibition de la glycolyse par le 2-DG des macrophages bloque l'expression de HIF-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  confirmant leur implication dans la polarisation M1 et dans l'induction de l'IL1- $\beta$  par HIF-1 $\alpha$  (Tannahill et al., 2013). Par conséquent, HIF-1 $\alpha$  est exprimé même en normoxie. Ce phénomène est appelé pseudo-hypoxie (Hayashi et al., 2019). Cependant, l'activité des facteurs de transcriptions HIF est généralement associée à l'état hypoxique de la cellule et elle est régulée par la présence d'oxygène. Les HIF se composent de deux sous unités, HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$  qui sont respectivement des sous-unités régulatrice et consécutive. Leur activité est régulée par des senseurs à oxygènes, les PHD 1-3 (Prolyl Hydroxylase Domain containing protein) et l'inhibiteur de HIF, FIH. En présence d'oxygène, les PHD inactivent HIF par des modifications post-transcriptionnelles (hydroxylation) ce qui permet le recrutement du complexe ubiquitine ligase (VHL E3) qui en collaboration avec l'elongin-1/2 et RBX1 polyubiquitinent HIF-1 $\alpha$  pour sa subséquente dégradation par le protéosome (Albanese et al., 2020). De plus, FIH hydroxyle l'asparagine un résidu conservé sur HIF ce qui bloque son interaction avec le co-activateur transcriptionnel, p300 et inhibe par conséquent la transcription des gènes cibles (Fraisl et al., 2009, Rabinowitz, 2013). Outre sa régulation par l'oxygène, HIF-1 $\alpha$  peut être stabilisé par d'autres facteurs comme le succinate. Par conséquent, l'accumulation de succinate est considérée comme le lien entre le cycle de Krebs dysfonctionnel et HIF-1 $\alpha$  (Selak et al., 2005, Koivunen et al., 2007). L'ajout du succinate exogène induit une augmentation de l'expression de HIF1- $\alpha$  par les macrophages activés au LPS sans pour autant moduler l'expression d'autres facteurs inflammatoires tels que TNF $\alpha$  et NF- $\kappa$ B. Donc le succinate stimule l'expression de HIF-1 $\alpha$  spécifiquement (Tannahill GM, 2013). D'ailleurs, le succinate stabilise HIF-1 $\alpha$  en inhibant l'activité des PHD (Selak et al., 2005). De plus, une stimulation avec le

succinate en combinaison avec le LPS contrôle le profil M1 en diminuant l'expression de l'ARNm de la cytokine anti-inflammatoires IL-10 et de la protéine antagoniste au récepteur de la cytokine inflammatoire IL-1, IL-1RA (Mills et al., 2016). Par contre, l'inhibition de l'oxydation du succinate mitochondriale par le SDH engendre un effet opposé. Elle favorise un profil anti-inflammatoire par l'augmentation de l'expression d'IL-10 et la diminution d'IL-1 $\beta$  et HIF-1 $\alpha$ . De la même façon, un profil similaire est induit lors d'une délétion conditionnelle de SDH dans les macrophages ou lors de l'ajout de l'itaconate exogène (Mills et al., 2016, Lampropoulou et al., 2016). En somme, l'oxydation du succinate par le SDH dans les mitochondries est requise pour stimuler l'expression de gènes pro-inflammatoires. Par ailleurs, l'accumulation de succinate dans les macrophages M1 ne provient pas seulement du deuxième arrêt du cycle de Krebs. En effet, un traçage du métabolisme de la glutamine dans des macrophages M1, montre une augmentation de la production de succinate qui provient de la glutamine marquée, et aussi une augmentation du transporteur de la glutamine, SLC3A2 (Tannahill et al., 2013, Jha et al., 2015a). En conclusion, le métabolisme de la glutamine contribue à l'accumulation de succinate par des réactions anaplérotiques qui œuvrent pour rétablir le déficit en  $\alpha$ -KG menant à la production de succinate. Finalement, les dysfonctionnements au niveau du cycle de Krebs provoqués lors d'une polarisation M1 participent activement à l'apparition de l'aspect et de la fonction inflammatoire, essentiellement par l'amplification de l'expression de gènes stimulant la glycolyse et par la production de NO et des ROS.

Certes, la production de NO est un indicateur clé des M1, mais son rôle ne se résume pas uniquement à la fonction microbicide. Son rôle a été bien caractérisé dans un modèle murin où iNOS est absent dans les macrophages (*iNOS*<sup>-/-</sup>). Les macrophages *iNOS*<sup>-/-</sup> activés montrent une augmentation de l' $\alpha$ -KG, de l'itaconate et du succinate. Ces observations attribuent à iNOS un rôle régulateur de la production de ces métabolites (Palmieri et al., 2020). La diminution de l' $\alpha$ -KG dans le métabolisme des M1 a été associée à une diminution de l'IDH1 qui est un enzyme du cycle de Krebs responsable de la conversion de l'isocitrate en l' $\alpha$ -KG (Jha et al., 2015a). Cependant, l'inhibition de iNOS n'a pas d'effet sur l'activité de l'IDH1 donc le dysfonctionnement observé est indépendant de l'IDH1. Contrairement à l'activité de l'IDH1, l'activité de l'enzyme mitochondriale aconitase 2 (ACO2), enzyme cible de NO est augmentée lors de l'inhibition de l'iNOS. Par conséquent, NO inhibe l'activité d'ACO2. À l'opposé, l'ajout de NO diminue l'activité de l'ACO2 dans des macrophages M1. Également, l'inhibition d'ACO2 dans les macrophages *iNOS*<sup>-/-</sup> activés montrent les mêmes changements que les contrôlent traités au LPS, soit une diminution de l' $\alpha$ -KG et une augmentation du citrate. Ces données concluent que le dysfonctionnement au niveau du cycle de Krebs est dû à l'ACO2 qui est régulé négativement par

NO (Palmieri et al., 2020). En outre, NO est un régulateur direct du flux du pyruvate entrant à la mitochondrie. Effectivement, l'ajout de NO en culture inactive l'enzyme pyruvate déshydrogénase (PDH) qui est responsable de la conversion du pyruvate en acétyl-CoA qui s'intègre par la suite au cycle de Krebs. NO y procède en induisant une modifications post-transcriptionnelle, la nitrosylation de la sous-unité PDH-E3 (Palmieri et al., 2020). Ces travaux mettent en évidence l'implication de NO dans la modulation du cycle de Krebs que ce soit par un effet direct ou indirect.

La production des ROS amplifie la capacité phagocytaire et la destruction des microbes des macrophages et favorise ainsi la polarisation des macrophages en M1 (Tan et al., 2016, Yuan et al., 2019). En plus des ROS cytosoliques, les ROS mitochondriaux (ROSmt) contribuent à la fonction bactéricide des macrophages. La stimulation des macrophages par des agonistes des TLR1/2/4 induit la translocation de la protéine médiatrice de la signalisation des TLRs, TRAF6 (Kawasaki and Kawai, 2014) à la fraction mitochondriale ce qui corrobore un rôle actif de la signalisation des TLR dans la production des ROSmt. En effet, ceci est confirmé par l'interaction de TRAF6 à la protéine ECSIT, qui est responsable de l'assemblage du complexe I de l'ETC. TRAF6 engendre la dégradation de ECSIT par ubiquitination ce qui induit la production de ROSmt. De plus l'infection par *S. typhimurium in vivo* de souris déficientes en ECSIT augmente la charge bactériale dans le foie et la rate de plus de cinq fois comparées aux souris contrôles (West et al., 2011). En d'autres termes, la présence d'ECSIT est requise pour le maintien de la fonction microbicide médiée par ROSmt et aussi une perturbation dans la production des ROSmt engendre une diminution d'IL-1 $\beta$ . En somme, les ROS mitochondriaux sont autant importants pour la fonction des M1 que les ROS cytosoliques ou NO (Mills et al., 2016).

Le métabolisme énergétique des M1 dépend essentiellement de la production de lactate. La production de lactate provient de la conversion du pyruvate. Étant donné que le pyruvate est impliqué dans l'activité du cycle de Krebs et dans la production de lactate, par conséquent sa destinée dépend de l'activité de certains enzymes. Pour sa conversion en lactate, le pyruvate nécessite la phosphorylation de l'enzyme pyruvate déshydrogénase (PDH) par la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK) ce qui l'inactive. Cette inactivation permet la conversion du pyruvate en lactate. PDK2 et PDK4 ont été spécifiquement identifiées primordiales dans la régulation de PDH. Des souris déficientes en PDK2/4 (*pdk2/4* KO) ayant subi une stimulation inflammatoire montrent une diminution de la production de lactate et une diminution de la douleur associée à l'inflammation. Étant donné que la production de lactate diminue le pH, il facilite par conséquent l'activation des nocicepteurs (Jha et al., 2015b). Dans des conditions inflammatoires, une délétion de PDK2/4 supprime l'induction de HIF1 $\alpha$  et iNOS mais cet effet est moindre dans

les conditions où PDK2 ou PDK4 sont enlevés séparément. Ce qui suggère que PDK2 et PDK4 compensent l'une pour l'autre. En outre, la diminution de l'expression de l'IDH1 est abolie dans les macrophages *pdk2/4*KO activés. De plus, une diminution de l'expression d'IRG1 est observée dans les mêmes conditions. Plus encore, la diminution de l'activité mitochondriale et l'augmentation de l'ECAR sont prévenues et deviennent comparables aux macrophages contrôles non stimulés. Ces effets sont aussi obtenus pareillement lors de l'inhibition de PDK (Min et al., 2019). Ainsi, PDK est devenue une cible thérapeutique dans le traitement des maladies métaboliques inflammatoires tel que le diabète de type 2. En effet, un inhibiteur a montré des effets favorables, KPLH1130 chez des souris ayant reçu une diète riche en gras qui induit la polarisation M1 et la résistance à l'insuline. À faible dose, cet inhibiteur diminue les marqueurs inflammatoires TNF $\alpha$ , IL-6, IL1 $\beta$ , iNOS, HIF1 $\alpha$  et augmente l'activité mitochondriale (Min et al., 2019). En somme, il semble que le contrôle de la voie d'utilisation du pyruvate par les PDK est primordial dans la détermination des changements métaboliques caractéristiques des M1.

Les voies de signalisation qui influencent la régulation du métabolisme des M1 demeurent sous investigation. Pourtant, l'interrelation entre l'inflammation et la voie des MAPK (ERK1/2, p38 et JNK) suscite de plus en plus d'intérêt. En effet, l'inhibition de ERK1/2 dans des macrophages activés au LPS entraîne une diminution de iNOS, de COX2, de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-6 et IL-1 $\beta$ ) et une augmentation du nombre des cellules apoptotiques. Au niveau métabolique l'inhibition de ERK1/2 dans les macrophages traités au LPS induit la diminution du niveau de l'enzyme PFK2 qui génère le métabolite Fructose-2,6-biphosphate responsable de stimuler le flux glycolytique, ainsi qu'une diminution de la consommation de glucose et de la production de lactate (Traves et al., 2012). Par conséquent, l'activation d'ERK1/2 dans les macrophages inflammatoires a certes un rôle dans la production de cytokines inflammatoires mais semble aussi être un régulateur du métabolisme des M1 en stimulant la glycolyse. En outre, la surexpression de l'enzyme G6PD active la voie de p38 qui est connue aussi d'être stimulé lors de stress oxydatif (Son et al., 2013, Son et al., 2011). Elle induit également l'activité de NF- $\kappa$ B. Or, la délétion de G6PD diminue significativement l'activation de la voie p38 et l'expression de NF- $\kappa$ B (Ham et al., 2013). En d'autres termes, le flux glycolytique induit l'expression des gènes inflammatoires par l'activation de la voie de la MAPK p38 et la stimulation de NF- $\kappa$ B.

La kinase mammalian target of rapamycin (mTOR) forme deux complexes,

et mTORC2 qui diffèrent par leur composition, leurs protéines cibles et leur sensibilité à la rapamycine. Notamment, mTORC1 and mTORC2 sont définis par l'interaction de mTOR avec



Raptor et Rictor, respectivement. (Hara et al., 2002, Sarbassov et al., 2004). Le métabolisme de M1 est aussi affecté par la signalisation de mTORC1. Étant donné que les acides aminés sont de puissants activateurs de mTORC1, les macrophages ont été stimulés au LPS dans un milieu dépourvu de sérine afin de déterminer son implication. Les macrophages M1 montrent non seulement une diminution de l'IL1- $\beta$  et de NF- $\kappa$ B, mais aussi une diminution de la glycolyse décrite par la diminution de l'ECAR et de l'enzyme PFK ainsi qu'une inhibition de mTORC1. Cependant, l'ajout de glucose/pyruvate ne renverse pas la diminution de l'expression des cytokines inflammatoires. Par conséquent, l'inhibition de mTORC1 altère le pouvoir inflammatoire des macrophages M1. Ce qui est aussi confirmé par l'inhibition de mTORC1 par la rapamycine en présence de sérine dans le milieu, mettant en évidence la spécificité de ce phénotype à mTORC1 (Chen et al., 2020, Jiang et al., 2014). Au contraire, l'activation constitutive de mTORC1 dans des macrophages induit une augmentation des cytokines au niveau protéique IL-6 et TNF $\alpha$  suite à l'activation par LPS (Paschoal et al., 2017, Byles et al., 2013, Jiang et al., 2014). À l'opposé, la délétion de mTORC2 augmente la polarisation M1 et la réponse inflammatoire des macrophages. Les souris déficientes en Rictor dans les cellules myéloïdes sont plus sensibles au développement d'un choc septique lors de la stimulation par LPS (Festuccia et al., 2014). Donc mTORC2 est un régulateur négatif de l'inflammation à l'opposé de mTORC1 qui a un rôle inducteur (Covarrubias et al., 2015). Les protéines AKT contribuent à la réponse inflammatoire dépendamment de l'isoforme impliqué. Une stimulation de macrophages déficients en AKT1 par LPS induit un profil M1, alors que les macrophages déficients en AKT2 adoptent un profil M2 lors d'une activation anti-inflammatoire par IL-4. Donc AKT1 a un rôle anti-inflammatoire à l'encontre d'AKT2 qui a un rôle pro-inflammatoire (Arranz et al., 2012, Androulidaki et al., 2009, Kuijl et al., 2007). En résumé, les avancements des recherches à ce jour, démontrent l'implication des voies de signalisation MAPK ainsi qu'AKT/mTORC1/2 dans la polarisation des macrophages M1.

Pour conclure, le métabolisme des macrophages M1 se distingue par des altérations au niveau du cycle de Krebs qui mettent en évidence l'implication des enzymes, ACO2, IDH1, SDH et des métabolites, citrate, itaconate,  $\alpha$ -KG et succinate ainsi qu'une augmentation de la glycolyse (figure 1.15, figure 1.17).

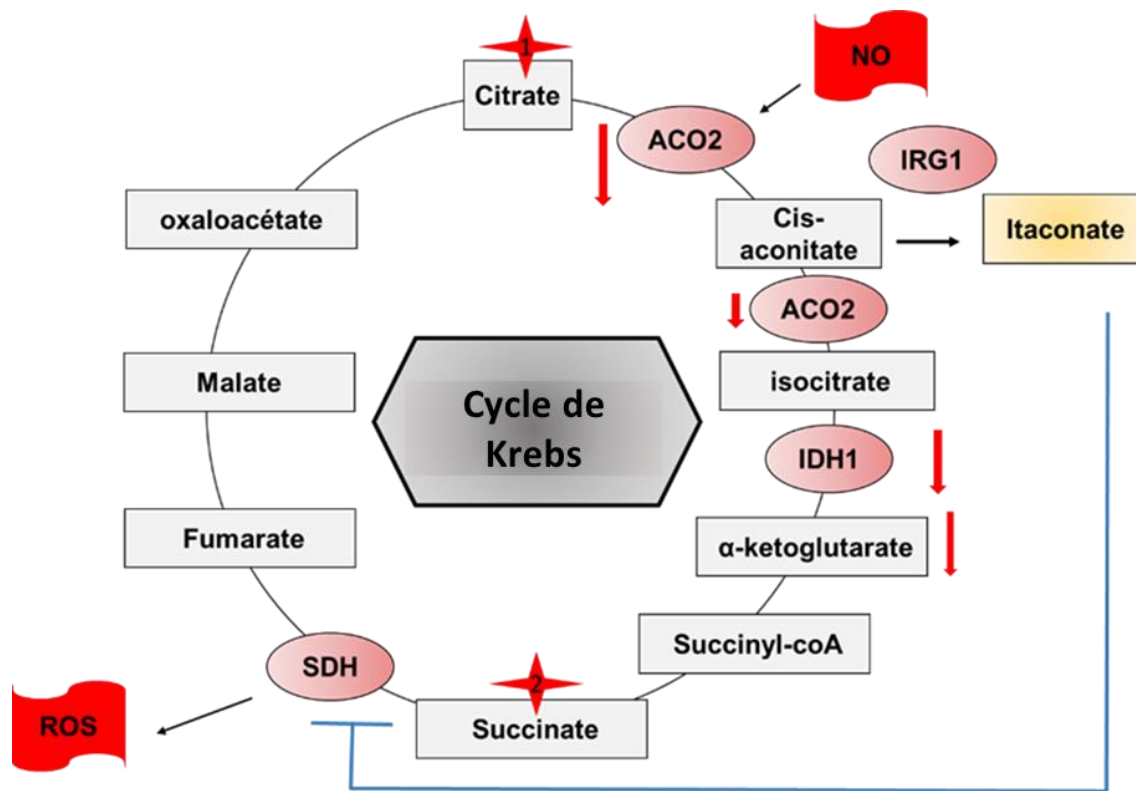


Figure 1.15 Le métabolisme mitochondrial des macrophages M1

1 : Premier arrêt, accumulation du citrate, diminution de l'activité l'ACO2, de l'IDH1 et de la quantité de l' $\alpha$ -KG aussi bien que la production d'itaconate. 2 : Deuxième arrêt, accumulation du succinate. Inhibition de SDH (complexe II de l'ETC) par itaconate menant à une production des ROS.

### 1.5.2 Métabolisme des macrophages M2

Contrairement aux macrophages M1, le métabolisme des macrophages M2 se distingue par une activité mitochondriale intacte. Précisément, les macrophages M2 bénéficient d'une activité d'OXPHOS intense et une augmentation de la  $\beta$ -oxydation (Vats et al., 2006, Huang et al., 2014, Nomura et al., 2016, Van den Bossche et al., 2015) (figure 1.16). L'implication de la glycolyse dans le processus métabolique mitochondriale n'est pas pour autant négligeable. Les produits de la glycolyse contribuent à approvisionner le cycle de Krebs. Par exemple le lactate est une source de carbone pour le cycle de Krebs (Hui et al., 2017). Aussi, le pyruvate est décarboxylé et intègre le cycle de Krebs sous forme d'acétyl-CoA et participe ainsi à l'activité du cycle (Diskin and Palsson-McDermott, 2018).

La polarisation des macrophages par IL-4 induit une diminution de l'ECAR et une augmentation de l'OCR à l'opposé de la stimulation par LPS. Afin de déterminer la contribution de la glycolyse dans la polarisation M2, des macrophages ont été mis en culture dans un milieu dépourvu de glucose ou en présence de galactose, qui tous deux diminuent le flux glycolytique. La stimulation par IL-4 dans ces conditions augmente l'OCR et la consommation de la glutamine. Par conséquent, l'atténuation du flux glycolytique induit la glutamine à compenser et approvisionner le cycle pour amplifier son activité en alternative au pyruvate (Wang et al., 2018). D'un autre côté, la suppression de la glutaminolyse par l'inhibition de la glutaminase-1 induit une diminution des marqueurs M2. Par conséquent, la glutamine est indispensable pour l'établissement du profil M2. Cependant, l'ajout de l' $\alpha$ -KG rétablit le phénotype M2 suite à la stimulation par IL-4 ce qui indique que l' $\alpha$ -KG du métabolisme de la glutamine est requis dans la polarisation M2. En effet, L' $\alpha$ -KG provenant du métabolisme de la glutamine contrôle l'expression des gènes M2 (*Arg1*, *ym1*, *Retnla*, *Mcr1*). Il y procède par l'induction de la déméthylase Jmjd3 qui contrecarre la triméthylation de l'histone H3 K27 (H3K27me3) des promoteurs correspondants aux gènes M2 et induit donc leur expression (Liu et al., 2017). En résumé, la glutamine a non seulement un rôle de compensation pour l'activité du cycle de Krebs mais elle est aussi nécessaire à l'induction du profil M2.

La participation de l'ETC mitochondriale dans la polarisation M2 n'est pas juste restreinte à la production d'ATP. Il s'avère que la suppression de la production d'ATP par le complexe V dans des macrophages cultivés sans glucose et activés diminue l'expression du marqueur CD36. En effet, l'expression de CD36 est contrôlée par la phosphorylation de STAT6 par JAK. Par contre l'activité des JAKs dépend de la disponibilité de l'ATP pour pouvoir fonctionner. L'inactivation de STAT6 engendre une diminution du facteur de transcription PPAR $\gamma$  qui régule l'expression de son gène cible, CD36 (Wang et al., 2018, Tontonoz et al., 1998). Ces observations renforcent l'implication des mitochondries dans le contrôle de la polarisation M2. CD36 est considéré comme un marqueur des macrophages M2 en raison de son implication dans la résorption de l'inflammation. Effectivement, CD36 reconnaît les phosphatidylsérines sur les cellules apoptotiques et permet leur phagocytose ce qui élimine l'inflammation et laisse place à une polarisation M2 (Woo et al., 2016). Outre son rôle dans la phagocytose, CD36 est une protéine translocase qui permet la pénétration des lipides dans la cellule (Qiao et al., 2008). L'absence de CD36 dans des macrophages M2 induit une diminution de l'activité de l'OXPPOS et des marqueurs M2 (Huang et al., 2014).

La lipolyse est un facteur déterminant dans l'orientation de la polarisation des macrophages. L'utilisation des AG comme substrats est non seulement primordiale pour l'activité du métabolisme M2, mais elle est aussi essentielle pour le maintien de la polarisation (Biswas and Mantovani, 2012, Odegaard and Chawla, 2011, Remmerie and Scott, 2018, Malandrino et al., 2015). Les triglycérides ne peuvent rejoindre la cellule sous une forme non hydrolysée. Pour ce faire, l'activité de lipases neutres (ATGL et HSL) et acides (LAL) est requise pour leur dégradation et permettre ensuite son utilisation par le métabolisme oxydatif (Zechner et al., 2012). En effet, une polarisation M2 est accompagnée d'une augmentation du métabolite glycérol indicateur de l'implication de la dégradation des lipides. De plus, l'inhibition spécifique de la lipase LAL aboutit à une diminution du glycérol, une diminution de l'OCR et une suppression des marqueurs M2 ainsi qu'une accumulation de gouttelettes lipidiques (Huang et al., 2014). En somme, les protéines CD36 et LAL sont tous deux requises pour la polarisation M2 en régulant l'utilisation des lipides comme substrats ainsi que leur oxydation par le métabolisme mitochondrial afin de produire de l'énergie.

L'oxydation des acides gras (FAO) par la  $\beta$ -oxydation est une partie intégrante du métabolisme des M2. En effet, son activité est corrélée avec la polarisation M2 (Pearce and Pearce, 2013, Vats et al., 2006, Huang et al., 2014). Cependant, plusieurs étapes sont nécessaires avant d'obtenir le substrat adéquat pour entamer la FAO. Les triglycérides sont hydrolysés en AG par des lipoprotéines lipases dans le cytosol. Ensuite, par l'intermédiaire de transporteurs d'AG auxquelles qui ont une activité d'acyl-CoA synthase, l'AG est converti en acyl-CoA. Étant donné que la membrane mitochondriale est imperméable aux acyl-CoA, leur translocation requière l'intervention du système protéique carnitine. La carnitine palmitoyltransférase I (CPT1) présente à la membrane externe mitochondriale convertit l'acyl-CoA en acylcarnitine (Acylc). Par la suite, la carnitine acyl carnitine translocase (CACT) échange des Acylc contre des carnitines libres se trouvant à l'intérieur des mitochondries. Une fois, l'Acylc est acheminé à l'intérieur de la mitochondrie, la CPT2 prend le relais et reconvertit l'Acylc en acyl-CoA pour qu'il intègre la  $\beta$ -oxydation. Au final, la  $\beta$ -oxydation génère l'acétyl-CoA comme produit final. Par la suite, l'acétyl-CoA intègre le cycle de Krebs (Houten and Wanders, 2010, Adeva-Andany et al., 2019) (figure 1.17).

Une atténuation de l'expression de CPT1 dans des macrophages M2 traités avec le 7-Ketocholesterol (source de cholestérol) induit une accumulation de lipides dans le cytosol et une augmentation du marqueur inflammatoire iNOS (Calle et al., 2019). Donc, une altération de l'expression de la CPT1 perturbe le profil anti-inflammatoire des macrophages. De plus, la

délétion de *Cpt2* des macrophages (*Cpt2*<sup>-/-</sup>) prévient l'augmentation de l'OCR lors de l'ajout d'AG comme substrat. Ce qui indique que la CPT2 est requise pour le bon déroulement de la FAO. Cependant, la stimulation par IL-4 des macrophages *Cpt2*<sup>-/-</sup> n'affecte pas l'expression de marqueurs M2. Surprenamment, le traitement à l'etomoxir inhibe les marqueurs M2 (*Arg1*, *Mgl2* et *Retnla*) dans les macrophages contrôles et les macrophages *Cpt2*<sup>-/-</sup> de manière similaire (Nomura et al., 2016). En résumé, l'inhibition de la  $\beta$ -oxydation ne prévient pas l'activation des M2 indiquant une contribution plus complexe de la FAO dans la polarisation M2. De la même façon, il a été montré que des macrophages *Cpt1*<sup>-/-</sup> sont aussi capables d'être polarisés en M2, et que le blocage de l'ETC n'empêche pas l'apparition du profil M2. Par contre, dans certains contextes, l'etomoxir inhibiteur irréversible de la CPT1 inhibe l'expression de marqueurs M2. En effet, l'effet de l'etomoxir est dose-dépendant. À faible dose (<100  $\mu$ M) l'etomoxir bloque l'oxydation des AG sans affecter l'expression des marqueurs M2, Par contre, à forte dose (200 $\mu$ M) il inhibe la polarisation M2. À savoir que, la disponibilité de l'etomoxir en excès augmente la production du métabolite pantothénate (Vitamine B5) qui est un précurseur de la biosynthèse du CoA. Donc, par sa composition etomoxiryl acyl-CoA, il perturbe l'homéostasie du CoA. Ceci, en diminuant la disponibilité de CoA libre dans le cytosol. En revanche, l'ajout de CoA dans le milieu renverse le phénotype induit par l'etomoxir et rend la polarisation M2 possible (Divakaruni et al., 2018). En conclusion, l'inhibition de la FAO seule ne prévient pas l'expression des marqueurs M2. Considérant que le maintien de l'OCR dans le profil M2 se déroule essentiellement par l'oxydation des AG, le système compense en retour par la synthèse de *novo* acides gras. De ce fait, les M2 présentent aussi une augmentation dans l'expression des gènes *Fasn* et *Acaca* qui codent pour les enzymes de synthèse d'AG (Huang et al., 2016).

Hormis la FAO, le facteur de transcription PPAR $\gamma$  a été identifié dans la polarisation M2. Effectivement, une stimulation par IL-4 des macrophages induit une augmentation de la protéine PPAR $\gamma$ . Toutefois, sa délétion engendre une diminution de l'Arg-1. De plus, des macrophages déficients en PPAR $\gamma$  présentent une diminution de la  $\beta$ -oxydation, une diminution de CD36 ainsi qu'une diminution de la biogenèse mitochondriale. En outre, PPAR $\gamma$  est un facteur important dans l'établissement de l'aspect pathophysiologique. En effet, son absence dans les macrophages supprime le phénotype anti-inflammatoire chez des souris infectées par le parasite leishmania major ou ayant reçu un régime riche en lipides. Aussi, il accroît l'apparition de l'athérosclérose (Castrillo and Tontonoz, 2004, Odegaard et al., 2007, Lehrke and Lazar, 2005). Plus encore, la participation de PGC1- $\beta$ , un co-activateur de PPAR $\gamma$  est mise en évidence dans le profil M2. De la même façon, l'absence de PGC-1 $\beta$  diminue l'utilisation et l'oxydation des AG dans des macrophages activés par IL-4. Par contre, sa surexpression induit l'augmentation de l'expression

de l'Arg-1 et de la FAO. De plus, une interrelation entre STAT6 et PGC-1 $\beta$  a été identifiée. En effet, l'analyse génomique a montré le recrutement de PGC-1 $\beta$  à STAT6 ce qui intensifie l'activation de l'Arg-1 en se liant à son promoteur (Vats et al., 2006). Ces observations mettent en relief le rôle de PPAR $\gamma$  et PGC-1 $\beta$  dans la régulation du métabolisme des macrophages M2.

Les changements métaboliques associés à une polarisation M2 font intervenir la voie de signalisation AKT/mTOR. Le système mTOR se compose de deux complexes, mTORC1 et mTORC2 (Covarrubias et al., 2015). L'implication de mTORC1 est établie dans la régulation du métabolisme du glucose et du métabolisme des M1. Par contre, son expression consécutive régule négativement l'apparition du profil M2 (Byles et al., 2013). La suppression de mTORC1 ou son inhibition n'altère pas l'activation M2. Par conséquent, mTORC1 n'intervient pas dans la polarisation M2. Cependant, l'inhibition de mTORC2 ou sa la délétion affecte aussi bien le métabolisme que le phénotype des macrophages M2. En effet, la stimulation par IL-4 des macrophages déficients en mTORC2 (*Rictor*<sup>-/-</sup>) induit une diminution de l'utilisation du glucose, de l'ECAR, de l'expression des enzymes glycolytiques, de l'OXPPOS et de la FAO. De plus, les macrophages *Rictor*<sup>-/-</sup> sont incapables d'être polarisés en un profil M2. Ceci se décrit par la diminution de l'expression de gènes M2 (*CD301*, *Relna*, *Arg1*, *Ym1*, *IL-10*, *Lipa*, *CD36*, *fabp4*) ainsi qu'une diminution du facteur de transcription IRF-4, un régulateur de l'expression des gènes M2 (Sato et al., 2010, Huang et al., 2016). De surcroît, la délétion de mTORC2 dans les macrophages diminue la résistance immunitaire face aux infections parasitaires (*brasiliensis larvae* et *H. polygyrus*). En conclusion, mTORC2 est identifié comme activateur de la polarisation M2.

En définitive, le métabolisme des macrophages M2, se définit par une activité prononcée de La FAO (figure 1.16, figure 1.18) et une contribution du métabolisme de la glutamine au fonctionnement du cycle de Krebs. Ces changements métaboliques sont soutenus par l'activité des protéines CD36, LAL, PPAR $\gamma$  et PGC-1 $\beta$ . Et la polarisation la M2 est orchestrée par mTORC2.

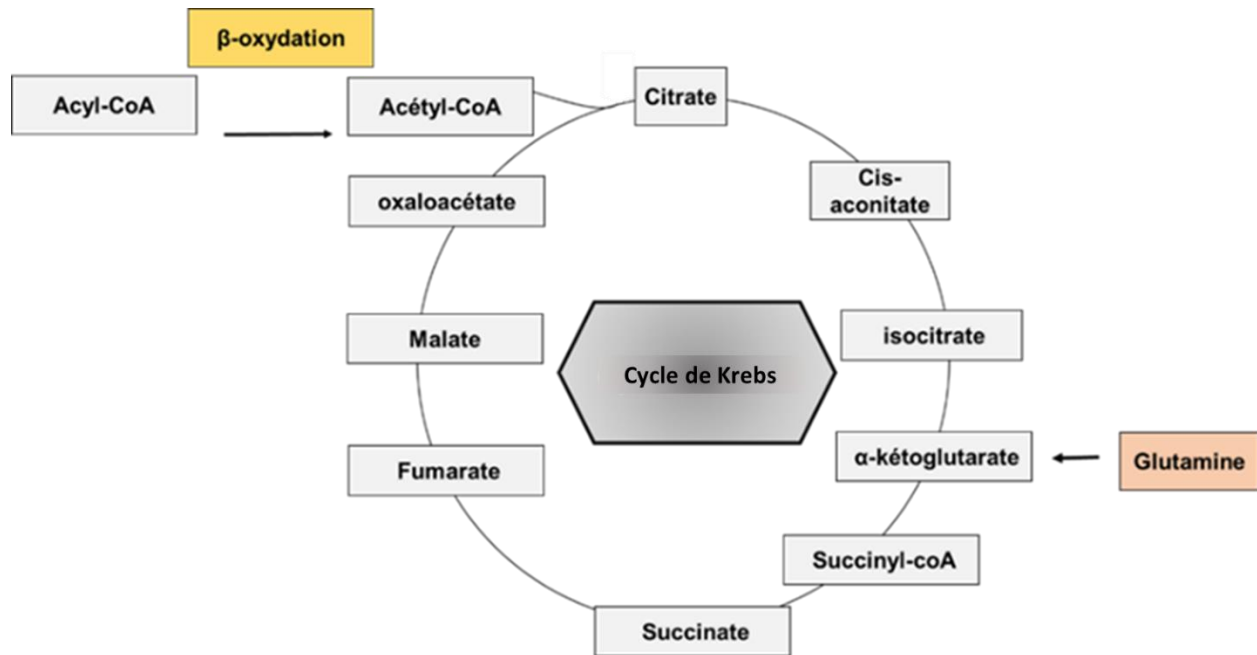


Figure 1.16 Le métabolisme mitochondrial des macrophages M2

L'activité du cycle de Krebs est intacte. Elle est amplifiée par la contribution de la  $\beta$ -oxydation et du métabolisme de la glutamine.

### 1.5.3 Le métabolisme des macrophages M1/M2

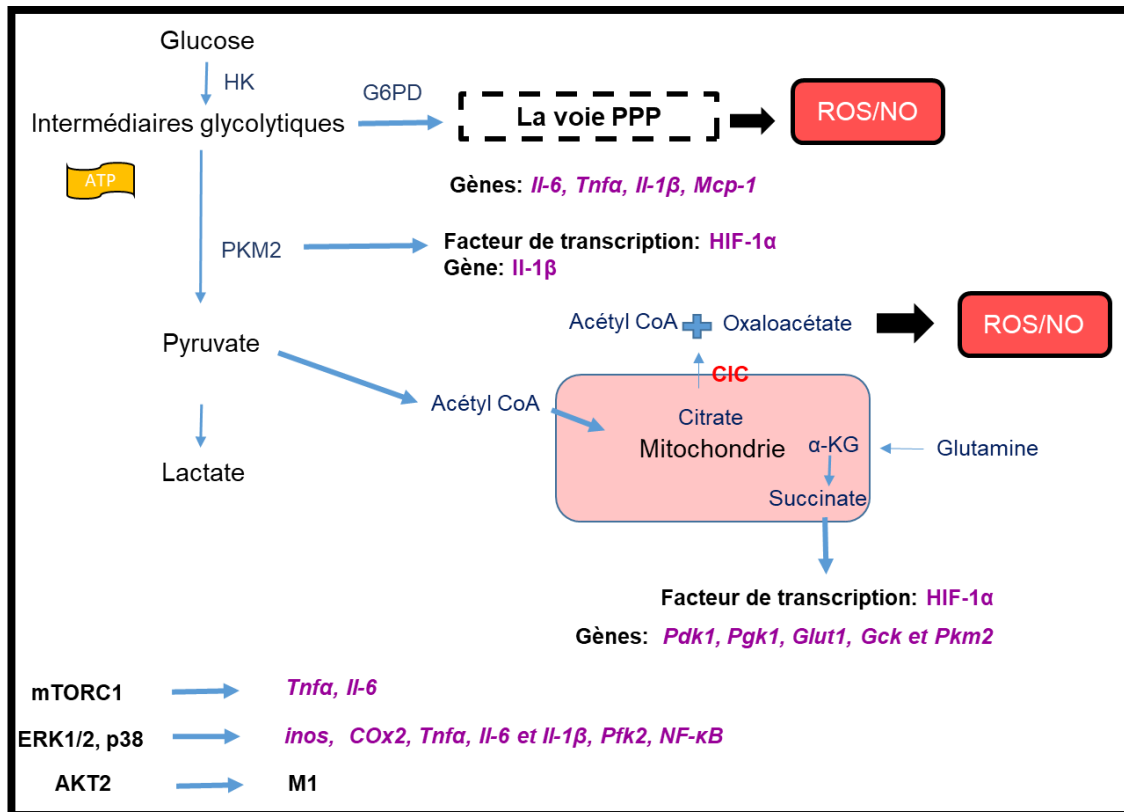


Figure 1.17 Résumé du métabolisme des M1

Schéma récapitulatif des enzymes, des métabolites, des facteurs de transcription, des gènes et des voies de signalisation impliqués dans la polarisation M1 et dans l'établissement du profil inflammatoire. CIC : transporteur de citrate mitochondrial



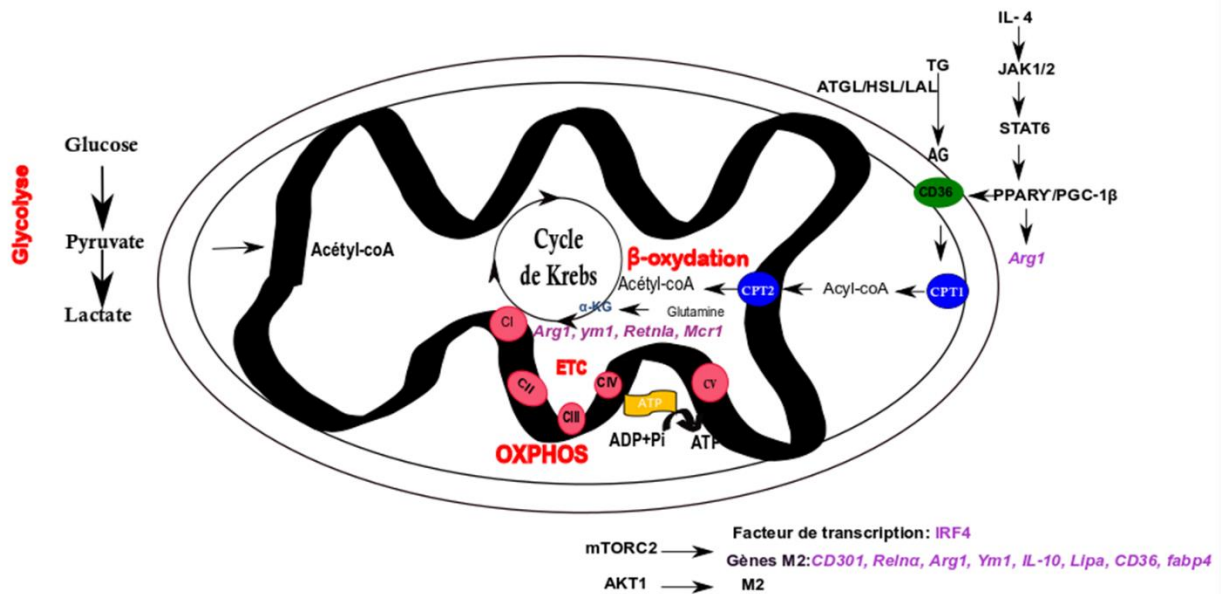


Figure 1.18 Résumé du métabolisme des macrophages M1/M2

Schéma récapitulatif des enzymes, des métabolites, des facteurs de transcriptions, des gènes et des voies de signalisations impliqués dans la polarisation M2 et dans l'établissement du profil anti-inflammatoire. CPT1 : carnitine palmitoyltransférase I, CPT2 : carnitine palmitoyltransférase II, OXPHOS : oxydation phosphorylative, ETC : chaîne de transport d'électrons. AG : acide gras.

## 1.6 Les cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont en haut de la hiérarchie des cellules immunitaires. Elles sont à l'origine des cellules sanguines et immunitaires (figure 1.19). Les CSH ont été découvertes par Till et McCulloch en 1961 (Till and Mc, 1961). Elles sont fonctionnellement définies par leur capacité de reconstituer tout le système hématopoïétique chez des animaux immunodéprimés et sont responsables de la production du système sanguin tout au long de la vie (Ng and Alexander, 2017, Mikkola and Orkin, 2006, Copley and Eaves, 2013). De plus, elles se distinguent par deux propriétés, la multipotence et l'autorenouvellement (Copley and Eaves, 2013, Goodell et al., 1996, Eaves, 2015). En effet, elles sont aptes à se différencier en n'importe quelle cellule sanguine fonctionnelle et à donner naissance à deux cellules filles identiques. Toutefois, durant leur différenciation les CSH génèrent des progéniteurs hématopoïétiques (CHP)

qui perdent leur capacité d'autorenouvellement t (Morrison and Weissman, 1994, Passegue et al., 2003).

Les CSH sont isolées et identifiées chez la souris par des marqueurs spécifiques selon leur stade de maturation. Les pré-CSH dans le sac vitellin et le mésoderme du sac vitellin AGM (Aorta-Gonad-Mesonephros) (E8.5-10.5) expriment CD41 et CD34. Les pré-CSH dans le placenta qui sont à l'origine des CSH définitives expriment CD34, CD45, Sca-1. Les CSH dans le foie foetal (E=11.5) expriment CD34, CD45, Sca-1, Mac-1 et CD150. En dernier, les CSH néonatales qui s'établissent dans la moelle osseuse (MO) et la rate expriment CXCR4, Sca-1, CD45 et CD150 (Ratajczak, 2008). De surcroît, les CSH et les CHP sont contenus dans une même fraction LSK identifiée par l'expression des marqueurs lineage<sup>-</sup> (L), c-Kit<sup>+</sup> (K) et Sca-1<sup>+</sup> (S) (Christensen and Weissman, 2001, Yang et al., 2005, Seita and Weissman, 2010). Par la suite, la pureté des CSH a été corroborée avec d'autres marqueurs de surface de la famille des SLAM (Engel et al., 2003). Il est désormais admis que les CSH sont CD150<sup>+</sup>, CD48<sup>-</sup> et CD244<sup>-</sup> (Ratajczak, 2008, Challen et al., 2009). En outre, les CSH sont une population rare, elle représente ≈0,01 % de toutes les cellules de la MO (Kiel et al., 2005). Cependant, la fraction CSH est hétérogène, elle se compose de deux sous-types identifiés comme des CSH à long terme (CSH-LT) et les CSH à court terme (CSH-CT). Ces fractions ont différentes fonctions et différents phénotypes. Les CSH-LT s'autorenouvèlent et maintiennent le système hématopoïétique indéfiniment avec un biais lymphoïde, alors que les CSH-CT le font pendant un intervalle défini avec un biais myéloïde (Yang et al., 2005, Oguro et al., 2013, Osawa et al., 1996). D'ailleurs, l'expression des marqueurs CD34 et CD135 (Flt3) ont permis leur distinction. Les CSH-LT sont identifiées CD34<sup>-</sup> et CD135<sup>-</sup> et les CSH-CT sont identifiées CD34<sup>+</sup> et CD135<sup>-</sup>. De plus, les CSH-CT se différencient en PPM « progéniteurs multipotents » qui ont une capacité d' autorenouvellement faible et transitoire et sont identifiés par CD34<sup>+</sup>, CD135<sup>+</sup> (Challen et al., 2009, Oguro et al., 2013). Par contre, les PPM ont une capacité de différenciation plus robuste que les CSH. Les branches en aval des PPM sont les PMC « progéniteurs myéloïdes communs » qui sont à l'origine des lignées myéloïdes et des précurseurs mégacaryocytes/érythrocytes et les PLC « progéniteurs lymphoïdes communs » qui sont à l'origine des lignée lymphoïdes (Morrison et al., 1997, Ghaedi et al., 2016, Kondo, 2010) (figure 1.19).

L'analyse du cycle cellulaire des CSH purifiés montrent que 70 % des cellules LSK CD34<sup>-</sup> CD48<sup>-</sup>CD150<sup>hi</sup> sont quiescentes en G<sub>0</sub>. Cette population est constituée de 30 % de cellules dormantes c'est-à-dire elles ne se divisent que tous les 145-193 jours et de 70 % de cellules qui sont plus actives et se divisent tous les 28-38 jours (Wilson et al., 2008, Takizawa et al., 2011).

En générale, les cellules avec une activité cyclique ralentie correspondent aux CSH-LT et ceux plus actives correspondent aux CSH-CT (Suda et al., 2011).

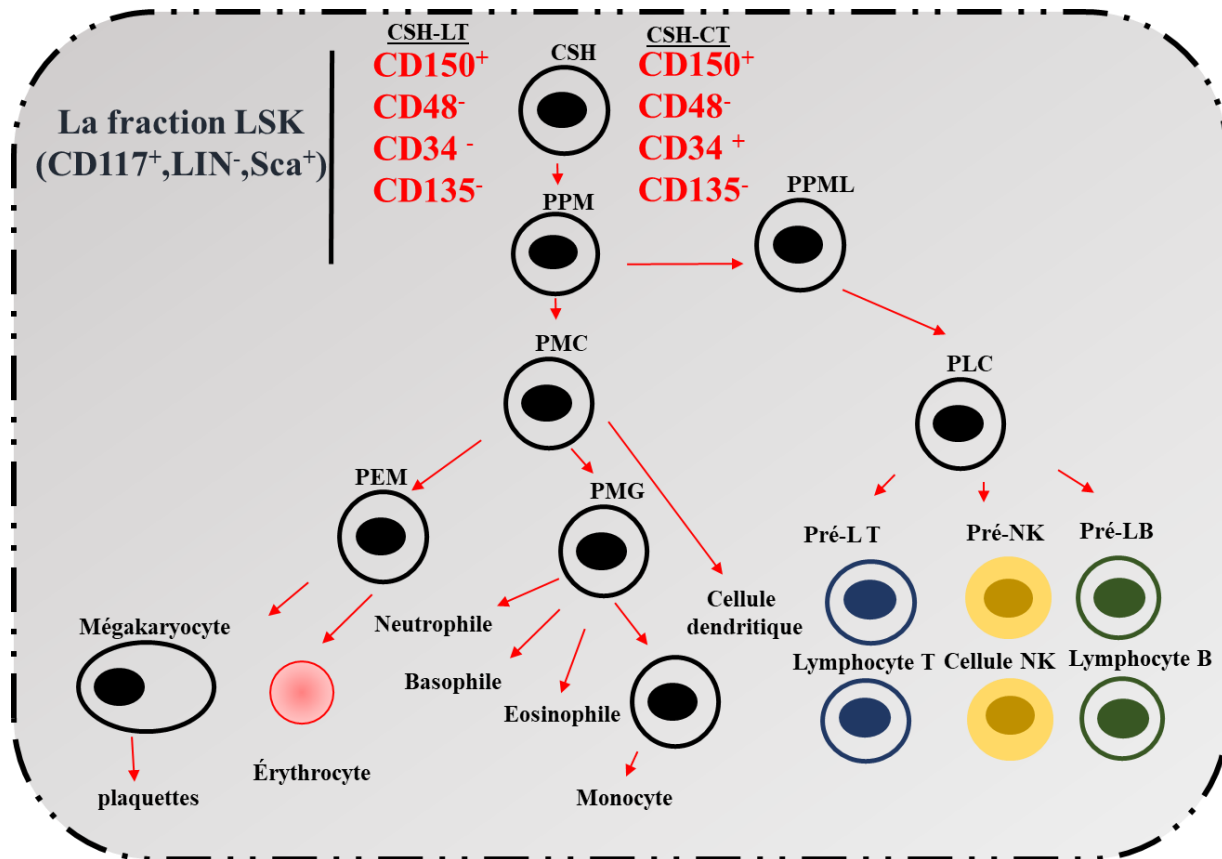


Figure 1.19 L'hématopoïèse

Les cellules souches hématopoïétiques sont à l'origine de toutes lignées lymphoïdes, myéloïdes et sanguines

## 1.7 La niche hématopoïétique

Les CSH s'autorenouvellent et à se différencient afin de maintenir l'homéostasie hématopoïétique. Pour être fonctionnelles, les CSH doivent collaborer avec plusieurs composés et cellules au sein de la moelle osseuse (MO). À la suite de cette observation, le concept de la « niche hématopoïétique » a vu le jour en 1978 (Schofield, 1978). À l'intérieur de cette niche, les CSH sont associées à d'autres cellules et réagissent à plusieurs stimulations qui déterminent leurs comportements. La majorité des CSH sont adjacentes aux vaisseaux sanguins sinusoïdaux et artérioles dans la MO (Kiel et al., 2005, Nombela-Arrieta et al., 2013, Kunisaki et al., 2013, Crane et al., 2017). En résumé, les CSH sont localisées de façon périvasculaire.

La MO est un tissu spongieux encapsulé à l'intérieur des os. Elle est le lieu central de l'hématopoïèse et de la production de cellules sanguines. Elle est constituée d'une moelle rouge aux extrémités des os plats et longs (épiphyse), et d'une moelle jaune qui entrepose le tissu adipeux dans la cavité médullaire (diaphyse) (Schnitzler and Mesquita, 1998, Mangialardi et al., 2016). La MO est insérée dans des os vascularisés et innervés riches en CSH à la zone trabéculaire dans la partie métaphyse de l'os (figure 1.20). La cavité médullaire est bordée d'une partie appelée endosteum qui se compose d'ostéoblastes pour la formation des os et d'ostéoclastes pour la résorption osseuse (Morrison and Scadden, 2014, Clarke, 2008). Les artères rentrent par l'orifice foramina nutricia qui approvisionnent l'os en nutriments et fusionnent en sinusoides veineux constitués d'une seule couche de cellules endothéliales qui agissent comme un conduit vers la circulation (Morrison and Scadden, 2014). Des études de greffes de CSH après une irradiation létale de la MO ont révélées que ces cellules tendent à se rendre à la partie endostéale. Les CSH qui logent au niveau de l'endosteum (la niche endostéale) sont quiescentes et ont une capacité de reconstitution plus intense, alors que les CSH qui sont plus au centre (la niche vasculaire) sont plus prolifératives (Arai et al., 2004, Nilsson et al., 2001).

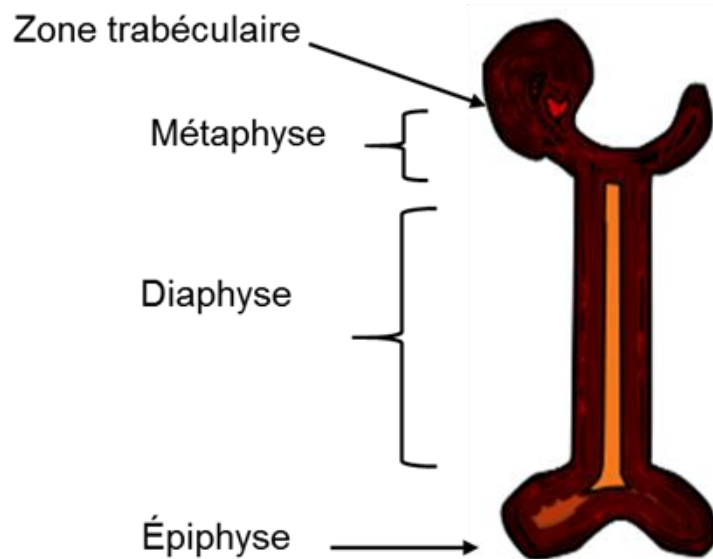


Figure 1.20 Anatomie de l'os long

**La zone trabéculaire est riche en CSH, la moelle rouge est au niveau de l'épiphyse et la moelle jaune au niveau de la diaphyse**

### 1.7.1 La niche endostéale

Les ostéoblastes produisent différentes molécules comme l'ostéopontine (OPN), la thrombopoïétine (THPO) et l'angiopoïétin-1 (Ang-1). L'OPN est un régulateur négatif des CSH et promeut leur migration à travers la zone endostéale. Son absence augmente l'expansion des CSH, diminue l'apoptose et perturbe leur distribution dans la zone endostéale (Stier et al., 2005, Nilsson et al., 2005). La THPO maintient la quiescence des CSH par l'augmentation de l'expression des inhibiteurs des cyclines kinase p57 et p19 (Qian et al., 2007, Yoshihara et al., 2007). Et l'Ang-1 favorise l'adhésion des CSH à l'os et maintient ainsi leur quiescence (Arai et al., 2004). La THPO et l'Ang-1 agissent par leurs récepteurs respectifs sur les CSH, MPL et Tie2. De plus, le ligand Notch agit sur l'activité des CSH dépendamment de la cellule qui l'exprime. Par exemple le ligand Notch exprimé par les ostéoblastes promeut la maturation et l'expansion des CSH (Calvi et al., 2003, Weber and Calvi, 2010). L'expression de Notch par les cellules endothéliales prévient l'épuisement des CSH en augmentant leur autorenouvellement (Butler et al., 2010) et une délétion de la forme active de Notch dans la niche perturbe la quiescence et la rétention des CSH (Wang et al., 2015). De plus, la concentration extracellulaire du calcium dicte le devenir des CSH. Les ions calcium sont détectés par le récepteur CaR couplé aux protéines G exprimé sur les CSH qui permet leur rétention à la partie endostéale de l'os (Adams et al., 2006). La chimiokine CXCL12 est exprimée en abondance par les ostéoblastes, elle contrôle la rétention endostéale des CSH par l'interaction avec le récepteur CXCR4 exprimé sur les CSH (Semerad et al., 2005, Galan-Diez and Kousteni, 2017). Les ostéoblastes sécrètent aussi un facteur de croissance SCF (Stem Cell Factor) qui se lie au récepteur c-Kit sur les CSH (Coskun and Hirschi, 2010). Cette interaction permet l'autorenouvellement des CSH (Sauvageau et al., 2004). En outre, les ostéoclastes jouent un rôle dans l'homéostasie hématopoïétique. En effet, la formation des ostéoclastes se produit sous l'influence du ligand RANKL produit par les ostéoblastes. Les ostéoclastes induisent la mobilisation des CSH dans la circulation en diminuant l'expression de la chimiokine CXCL12 et par l'expression des enzymes MMP-9 et cathepsin K qui clivent SCF et CXCL12 ce qui mène à la mobilisation des CSH (Kollet et al., 2006, Semerad et al., 2005). De surcroît, la molécule d'adhésion N-cadherin est fortement suggérée dans l'interaction entre les CSH et les ostéoblastes (Morrison and Scadden, 2014). Par contre, sa délétion n'affecte ni le maintien des CSH ni l'hématopoïèse (Kiel et al., 2009, Greenbaum et al., 2012, Bromberg et al., 2012).

### 1.7.2 La niche vasculaire

Les acteurs principaux de la niche vasculaire sont les différents types de cellules mésenchymateuses (CMS). Ces cellules sont adjacentes aux vaisseaux sanguins de la moelle et sont identifiées par plusieurs marqueurs en plus des marqueurs typiques CD105, CD90 et CD73 (Mangialardi et al., 2016). En effet, elles peuvent exprimer CD146, CXCL12, Nestine et le récepteur de la leptine (LepR) (Mangialardi et al., 2016, Levesque et al., 2010). Il est bien établi que l'interaction CXCL12-CXCR4 est primordiale pour l'activité des CSH. La délétion du CXCR4 dans les CSH résulte en une diminution de leur nombre et une augmentation de la sensibilité de la MO à un stress myélotoxique (Georgiou et al., 2012). La vaste majorité des CSH sont trouvés en contact avec des cellules exprimant en abondance CXCL12, nommées des cellules CAR (CXCL12-Abundant Reticular cells). Les cellules CAR entourent les cellules endothéliales sinusoidales et une petite portion est située près de l'endosteum. Par conséquent, les cellules CAR font partie à la fois de la niche endostéale et vasculaire (Sugiyama et al., 2006). Les cellules CD146<sup>+</sup> sont des cellules subendothéliales et sont associées avec les cellules hématopoïétiques. Ces cellules expriment des facteurs qui régulent l'angiogenèse et la formation des vaisseaux sinusoidaux supportant l'hématopoïèse (Sacchetti et al., 2007). Les cellules Nestin<sup>+</sup> sont périvasculaires et étroitement liées aux CSH. Leur délétion dans la MO induit une diminution du nombre de CSH et LSK. Par contre, leur nombre augmente dans la rate suggérant l'induction d'une augmentation de la mobilisation et une diminution de la migration des CSH après une greffe (Mendez-Ferrer et al., 2010b). Les cellules LepR<sup>+</sup> sont aussi périvasculaires et leur fonction est restreinte à l'expression du facteur soluble SCF qui est un important régulateur du maintien des CSH. Sa délétion de ces cellules induit une diminution de la fréquence des CSH et du nombre des cellules de la MO. La diminution de la taille cellulaire de la MO s'accompagne d'une augmentation de la taille de la rate donc d'une activation de l'hématopoïèse extramédullaire (Ding et al., 2012). De plus, la mobilisation des CSH est contrôlée par le système nerveux sympathique qui régule la formation osseuse et l'expression de CXCL12 (Katayama et al., 2006, Mendez-Ferrer et al., 2010a). En outre de la régulation nerveuse, la contribution des lipides n'en est pas moindre. Les adipocytes ont deux rôles controversés, bien qu'ils soient des régulateurs négatifs de l'activité des CSH, ils peuvent aussi stimuler l'hématopoïèse lorsque la situation l'exige (Naveiras et al., 2009). Par exemple, lors d'une situation de stress, les adipocytes régulent positivement les CSH. En effet, après une radiothérapie ou une chimiothérapie les niches physiologiques des CSH sont temporairement détruites. Par conséquent, les CMS entament la différenciation adipogénique, et les adipocytes nouvellement générés forment une niche temporaire pour les CSH afin de maintenir la fonction hématopoïétique de base de l'organisme

et de promouvoir la régénération des CSH en sécrétant le SCF (Man et al., 2021, Zhou et al., 2017). En résumé, plusieurs facteurs cellulaires et moléculaires orchestrent la rétention, la quiescence des CSH dans la MO ainsi que leur mobilisation.

La complexité de la niche hématopoïétique ne se limite pas à l'interrelation entre les cellules périvasculaires et les cellules osseuses avec les CSH. Elle implique aussi l'intervention de la descendance des CSH (macrophages, neutrophiles, lymphocyte T, mégacaryocytes) dans leur régulation au sein de la niche ce qui la rend davantage atypique.

Les macrophages supportent la niche endostéale et la rétention des CSH. En effet, une mobilisation des CSH par un traitement au G-CSF réduit la formation osseuse, l'expression de CXCL12 et diminue le nombre de macrophages alignés avec les ostéoblastes dans l'endosteum. Ces macrophages sont identifiés « osteomac ». De plus, l'ablation des macrophages *in vivo* induit la mobilisation des CSH dans la circulation (Winkler et al., 2010). En outre, les macrophages de la MO contribuent à la minéralisation de l'os en produisant des facteurs qui supportent la croissance et/ou la survie des ostéoblastes (Christopher et al., 2011). Spécifiquement, une sous population des macrophages (Gr-1<sup>-</sup> CD115<sup>int</sup>, F4/80<sup>+</sup> CD169<sup>+</sup>) est identifiée étant responsable de la rétention des CSH dans la MO. Des souris déficientes en CD169 montrent une diminution de la sécrétion de CXCL12 par le stroma et une mobilisation des CSH. La déplétion des macrophages par une injection de liposomes contenant du clodronate (un composé qui induit l'apoptose des macrophages) diminue l'expression des gènes *CXCL12*, *Angpt1*, *Kitl* et *Vcam1* qui sont fortement exprimés par les cellules Nestine<sup>+</sup> incitant la mobilisation des CSH (Chow et al., 2011). Il s'avère aussi que les macrophages régulent la quiescence des CSH par un contact direct. En effet, il a été montré que les macrophages qui expriment le récepteur DARC interagissent directement avec l'antigène CD82 exprimé sur les CSH-LT. L'ablation des macrophages F4/80<sup>+</sup> DARC<sup>+</sup> induit l'ubiquitination et l'endocytose de CD82 menant à la sortie des CSH de la phase de quiescence G<sub>0</sub> du cycle cellulaire (Hur et al., 2016).

Les mégacaryocytes (Mc) qui sont les précurseurs des plaquettes sont en étroit contact avec les vaisseaux sinusoidaux dans la MO qui est riche en plaquettes nouvellement formées. Une fraction des CSH sont adjacentes aux Mc. Les Mc régulent la quiescence des CSH par la sécrétion du CXCL4 et l'activation de la signalisation TGF- $\beta$ -Smad (Bruns et al., 2014, Naka and Hirao, 2017, Zhao et al., 2014b). Plus encore, la MO est un réservoir pour une sous-population de lymphocytes modulateurs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Treg) (Zou et al., 2004). Un sous-type des Treg exprimant le marqueur hématopoïétique CD150 est localisé dans la zone endostéale à proximité des HSC et contrôle sa quiescence par la sécrétion de l'adénosine qui protège les CSH du stress

oxydatif (Hirata et al., 2018, Hirata et al., 2019, Fujisaki et al., 2011). Également, l'importance des neutrophiles dans la niche a été mise en évidence dans le rétablissement de la niche après une irradiation (Bowers et al., 2018). Les neutrophiles régénèrent le réseau vasculaire sinusoidale par la stimulation de l'angiogenèse et ils promeuvent aussi la sécrétion de l'OPN par les ostéoblastes pour la rétention des CSH dans la MO (Kawano et al., 2017, Cossio et al., 2019). Tout bien considéré, l'hématopoïèse est autant importante pour l'approvisionnement du système hématopoïétique et immunitaire que pour le bon fonctionnement des CSH au sein de la niche (figure 1.21).

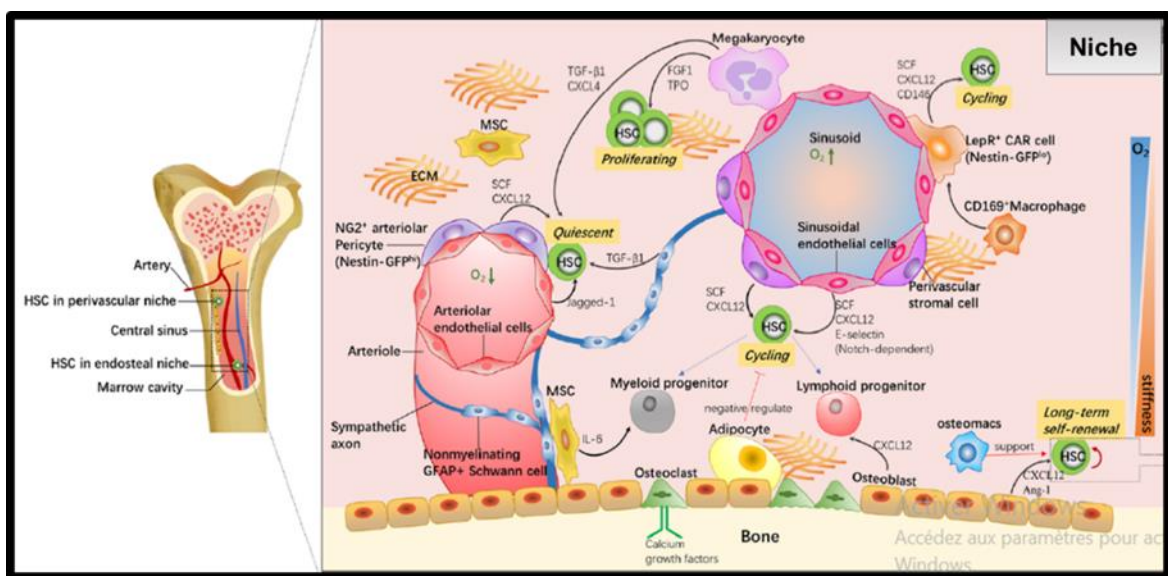


Figure 1.21 La niche hématopoïétique (Zhang et al., 2019a)

Plusieurs facteurs tels que les cellules, les cytokines, les signaux et le gradient de concentration en oxygène régulent l'activité des CSH directement ou indirectement. Les CSH adoptent des comportements différents dans les différentes sous-niches. La niche endostéale contribue au maintien des CSH-LT, tandis que la niche vasculaire active le cycle cellulaire et initie la prolifération et la différenciation des CSH

La niche hématopoïétique est un complexe de cellules hématopoïétiques et de réseaux vasculaires, mais elle est aussi hypoxique. La moyenne en saturation en oxygène est de 87,5 %  $\pm$  1,1 % (Harrison et al., 2002). Cet aspect physiologique est important et déterminant pour l'activité des CSH (Zhang and Sadek, 2014). La pression en oxygène varie d'environ de 9.9 mmHg à 17.7 mmHg selon les régions dans la niche chez l'animal (Spencer et al., 2014). Elle



augmente en se rapprochant de la zone centrale. Les cellules qui sont proches de l'endosteum sont dans un environnement presque anoxique ce qui prévient leur différenciation et leur capacité d' autorenouvellement (Chow et al., 2001). Les CSH sont localisées dans les régions les plus pauvres en oxygène et les plus différenciées sont dans les régions les plus riches en oxygène (Parmar et al., 2007, Eliasson and Jonsson, 2010). Considérant l'aspect hypoxique de la niche, HIF-1 $\alpha$  est fortement exprimé sur les CSH-LT. Les CSH-LT déficients en HIF-1 $\alpha$  perdent leur capacité de reconstitution à long terme et leur résistance au stress physiologique comme le vieillissement ou le stress toxique (Takubo et al., 2010). De plus, HIF-1 $\alpha$  induit l'augmentation de CSH à la phase G<sub>0</sub> du cycle (Takubo et al., 2010, Simsek et al., 2010, Zhang and Sadek, 2014). Cependant, une stabilisation excessive de HIF-1 $\alpha$  induit l'épuisement des CSH en augmentant les inhibiteurs des cyclines kinases du cycle cellulaire p27 et p57 (Eliasson et al., 2010, Suda et al., 2011, Eliasson and Jonsson, 2010).

En somme, la régulation de l'activité des CSH est fortement dépendante du contexte environnemental. La disponibilité de l'oxygène est un facteur déterminant pour le devenir des cellules hématopoïétiques à l'intérieur de la niche et s'en suit par conséquent des modifications cellulaires et moléculaires qui veillent au maintien et à la survie des CSH.

## **1.8 L'effet des ROS sur l'activité des cellules souches hématopoïétiques**

La rétention des CSH près de l'endostéum dépourvu d'oxygène est en faveur du maintien de leur quiescence et de la préservation de leur survie (Parmar et al., 2007, Ceradini et al., 2004). En effet, dans la région endostéale, elles sont protégées des effets toxiques engendrés par les ROS (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub><sup>-</sup>), formés par la présence d'O<sub>2</sub> (Urao and Ushio-Fukai, 2013). Par ailleurs, la niche vasculaire est relativement plus oxygénée en considérant la vascularisation importante de la zone ce qui soutient la différenciation et la mobilisation des cellules hématopoïétiques (Kopp et al., 2005, Zhang et al., 2019a). La délétion de HIF-1 $\alpha$  dans la niche hypoxique augmente la production de ROSmt, et cause de la perte de quiescence des CSH ainsi que la diminution de leur nombre (Takubo et al., 2010). Pour cette raison, les ROS sont considérés des agents activateurs de CSH (Jang and Sharkis, 2007, Samimi et al., 2018, Suda et al., 2011). De plus, l'intensité du ROS intracellulaire a permis d'établir le lien entre l'état d'activation des CSH et la production de ROS. Les CSH qui expriment une faible production de ROS (CSH ROS<sup>low</sup>) ont une capacité d'autorenouvellement plus intense que ceux qui expriment une forte production de ROS (ROS<sup>high</sup>). Par contre, la population ROS<sup>high</sup> a une capacité de différenciation plus importante engendrant un épuisement significatif des CSH à long terme. Cette perte de fonctionnalité des

CSH ROS<sup>high</sup> est rétablie par l'inhibition de mTORC1 ou par l'inhibition de la MAPK, p38 indiquant l'implication de ces deux voies (Jang and Sharkis, 2007). En effet, l'activation de p38 par les ROS augmente l'expression de p16, un l'inhibiteur des cyclines kinases 4/6 (CDK4/6). Cette activation inhibe la progression dans la phase G1/S du cycle cellulaire, ce qui induit la sénescence des CSH (Shao et al., 2011). Par conséquent, une faible dose de ROS active l'autorenouvellement des CSH, tandis qu'à forte dose les ROS engendrent l'épuisement des CSH. Plus encore, l'excès de ROS cause des dommages à ADN détectés par la protéine kinase nucléaire ATM. Pour remédier à ce dysfonctionnement, l'ATM phosphoryle la protéine BID aux sérines 61 et 78, la protéine p53 à la sérine 18 qui induit l'expression de p21. La présence de p21 inhibe la progression du cycle cellulaire à la phase (G1/S) (Kitagawa and Kastan, 2005, Li et al., 2010) ce qui par conséquent induit l'arrêt du cycle cellulaire et active l'apoptose (Kamer et al., 2005, Gross et al., 2016, Xu et al., 1998). L'inhibition de la phosphorylation de BID (Ser61 et Ser78) (BID<sup>ΔA</sup>) dans des souris soumises à une irradiation diminue la régénération de leur MO de moitié et diminue la survie des souris. De surcroît, le nombre de cellules LSK BID<sup>ΔA</sup> est diminué. De plus, les CSH-LT BID<sup>ΔA</sup> prolifèrent excessivement ce qui mène à leur épuisement engendrant une diminution des lignées myéloïdes et lymphoïdes. Cette perte de quiescence dans les CSH BID<sup>ΔA</sup> s'accompagne d'un fort taux des ROS et d'une diminution des inhibiteurs des cyclines kinases du cycle cellulaire (p16<sup>Ink4</sup> et p19<sup>ARF</sup>). En d'autres termes, la présence des ROS est la première cause de la perte de quiescence des CSH (Capparelli et al., 2012, Gao et al., 2020). Et l'inhibition de la phosphorylation de BID promeut la progression des CSH dans le cycle cellulaire par l'augmentation des gènes impliqués dans la progression de la phase G1/S (cycline D1, cycline E1 and CDK4). L'irradiation de souris induit l'augmentation de BID<sup>ΔA</sup> et des ROS dans les mitochondries des CSH. Dans les mitochondries, la protéine BID est recrutée par le récepteur MTCH2 (Zaltsman et al., 2010, Gross et al., 2016). Donc, suite à un stress physiologique BID transloque dans le noyau par MTCH2 et induit la production des ROS<sub>mt</sub> ce qui altère par conséquent la quiescence des CSH (Gross et al., 2016, Maryanovich et al., 2012). De plus, ce phénotype est aussi observé dans des CSH déficientes en ATM (Ito et al., 2004). En résumé, la régulation du taux des ROS mitochondriaux et la quiescence des CSH sont contrôlées par ATM-BID-MTCH2.

Les ROS induisent la différenciation des CSH en diminuant la disponibilité des ligands Notch en fonction du mécanisme de l'autophagie (Cao et al., 2016). L'autophagie est un processus catabolique qui élimine les composés cytotoxiques (toxines, protéines mal repliées, organelles endommagées, microbes, etc.) (Klionsky, 2007). Certes, l'autophagie est considérée dans la plupart des cas comme un mécanisme de survie qui n'est pas nécessairement un bon présage

(Yue et al., 2003, Maiuri et al., 2007). Néanmoins, l'autophagie a un rôle essentiel dans le maintien des CSH. En effet, sa délétion hématopoïétique réprime la fonction de reconstitution des CSH à court et long termes. De plus, elle induit une accumulation de mitochondries, une augmentation des ROS intracellulaires qui causent des dommages à l'ADN menant à la perte des CSH (Jung et al., 2019) et une diminution de la différenciation myéloïde et lymphoïde (Mortensen et al., 2011a). Par conséquent, l'absence d'autophagie altère la fonction des CSH. En outre, l'activité autophagique est primordiale au maintien de la quiescence des CSH en éliminant l'excès des mitochondries et par conséquent elle diminue les ROS. Ce qui explique que les CSH ont un nombre réduit de mitochondries et une production limitée des ROS (Gan et al., 2010, Gurumurthy et al., 2010, Nakada et al., 2010). Ainsi, l'autophagie veille au bon maintien de l'homéostasie mitochondriale dans les CSH.

En conclusion, le métabolisme mitochondrial des CSH est un acteur central et indispensable à leur bon fonctionnement. L'agencement de tous les facteurs environnementaux fait qu'il soit contrôlé de façon concise selon les besoins du système. Cependant, il doit être manipulé par précaution en raison de sa sensibilité aux variations de concentrations des ROS (figure 1.22).

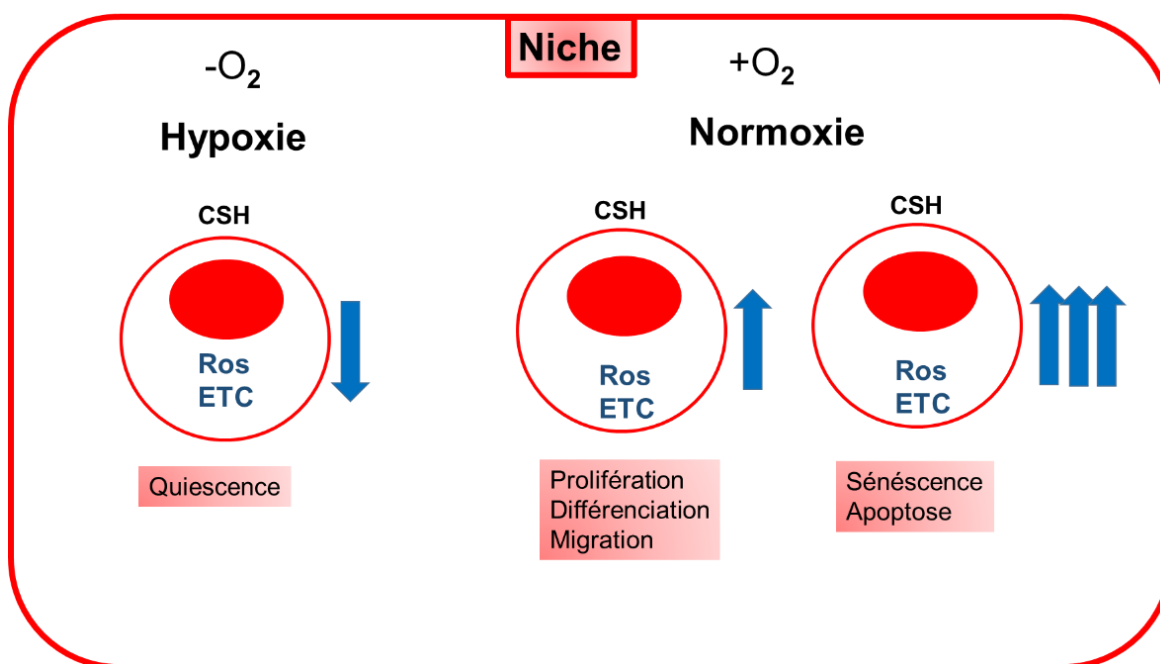


Figure 1.22 L'influence des ROS sur l'activité des cellules souches hématopoïétiques

En absence d'oxygène, la production des ROS est limitée et l'activité mitochondriale est minimale ce qui maintient les CSH en quiescence. En présence d'oxygène, la production de ROS modérée entraîne

la prolifération et la différenciation des CSH. Cependant, la production excessive des ROS engendre l'épuisement des CSH. ETC : chaîne de transport d'électrons mitochondriale. CSH : cellules souches hématopoïétiques.

## 1.9 Les cellules souches hématopoïétiques et l'inflammation

L'homéostasie hématopoïétique est maintenue grâce aux différentes composantes de la niche. Cependant, des conditions pathologiques ou de stress physiologiques peuvent perturber cette harmonie. En effet, l'inflammation générée module les fonctions biologiques des CSH. Les CSH peuvent reconnaître directement les pathogènes par l'expression des récepteurs TLR2/4 à leur surface (Hoshino et al., 1999, Takeuchi et al., 1999). Une stimulation des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques avec les agonistes de TLR2 (Pam3CSK4) et TLR4 (LPS) diminue leur nombre mais augmente leur différenciation en prônant un biais myéloïde (Nagai et al., 2006). Toutefois, une stimulation excessive du TLR4 altère l'autorenouvellement et la différenciation des CSH. De la même façon, dans des modèles de sepsis, une neutropénie est observée ainsi qu'une inhibition de la différenciation myéloïde (Rodriguez et al., 2009). Par contre, l'inflammation chronique induite par stimulation au LPS à faible dose, maintient le biais myéloïde et induit en plus une diminution de la capacité d'autorenouvellement des CSH à long terme décrivant leur épuisement (Esplin et al., 2011). Par conséquent, l'altération principale de la fonction des CSH lors de l'inflammation est la perte de quiescence. Ce dysfonctionnement est le résultat d'une perturbation de la niche hématopoïétique. Par exemple, les ligands TLR suppriment la maturation des ostéoclastes de l'endosteum menant ainsi à la différenciation et à la mobilisation des progéniteurs hématopoïétiques (Nobuaki Sato, 2004, Hayashi et al., 2003). En outre, une stimulation à court terme avec les cytokines inflammatoires telles que IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha/\beta$ , IL-1, TNF $\alpha$ , ou IL-6 induit la perte fonctionnelle des CSH dans la niche (Chen et al., 2010, Baldrige et al., 2011). Particulièrement, IL-6 induit la myélopoïèse et inhibe la lymphopoïèse en réponse à une infection ou à une inflammation chronique (Ishihara and Hirano, 2002, Mirantes et al., 2014). Par contre, les cytokines IFN ont un rôle controversé dans la régulation des fonctions des CSH. Consistants avec leur rôle antiviral, les IFN de type I ont aussi un rôle anti-prolifératif sur les cellules hématopoïétiques immatures *in vitro* (Verma et al., 2002). D'un autre côté, les CSH de souris traitées avec IFN- $\alpha$  sont plus prolifératives et moins résistantes aux agents chimiothérapeutiques. Par contre, une stimulation chronique par l'IFN- $\alpha$  bloque l'autorenouvellement et la différenciation des CSH induisant leur épuisement (Essers et al., 2009). De plus, une stimulation chronique de la MO par l'IFN de type I induit un phénotype aplasique. La compréhension de ces effets infligés aux CSH a été élucidée par le suivi du cycle cellulaire

des CSH lors d'une stimulation chronique par le poly IC qui mime une infection virale. Cette étude confirme la prolifération des CSH suite à la stimulation aiguë (jour 3). Cependant, les CSH deviennent quiescentes et rentrent en G<sub>0</sub> lors d'une stimulation chronique (jour 7). Plus encore, la stimulation chronique génère des CSH préapoptotiques qui ne réacquièrent pas leurs fonctions. Par conséquent, leur prolifération n'était que transitoire (Pietras et al., 2014). En somme, l'activité des CSH à la suite d'une stimulation par l'IFN est différente *in vitro* et *in vivo* ce qui suggère la nécessité de l'environnement.

Dans les situations pathologiques, l'hématopoïèse extramédullaire (HET) vient en renfort pour aider à l'élimination des pathogènes. Les principaux sites de l'HET sont la rate et le foie. La stimulation des TLR induit une rapide augmentation des cellules myéloïdes dans la MO et la rate (Nagai et al., 2006). Les infections sont les principales causes de l'activation de la HET. En effet, une infection par le parasite *Leishmania major* augmente le nombre de précurseurs myéloïdes dans la rate (Abidin et al., 2017), un phénotype similaire est aussi observé lors de l'infection par le parasite *Plasmodium berghei* (malaria) (Mungyer et al., 1983, Belyaev et al., 2013). L'augmentation de la myélopoïèse dans les sites extramédullaires a pour but de répondre aux besoins myéloïdes nécessaire à l'élimination du pathogène. Néanmoins, l'environnement inflammatoire génère une accumulation de cellules myéloïdes immatures appelées MDSC (Myeloid Derived Suppressor Cells) qui ont une fonction inhibitrice de la réponse immunitaire. Les MDSC suppriment l'activation des lymphocytes T, maintiennent la progression de la tumeur en agissant comme des M2-like et suppriment le pouvoir cytotoxique des cellules NK (Liu et al., 2007).

Pour conclure, les CSH répondent à l'inflammation en approvisionnant le système en cellules myéloïdes afin de défendre l'organisme face aux pathogènes. En revanche, lors d'une inflammation chronique, l'activité des CSH est altérée ce qui stimule l'assistance des sites d'hématopoïèse extramédullaires (figure 1.23).

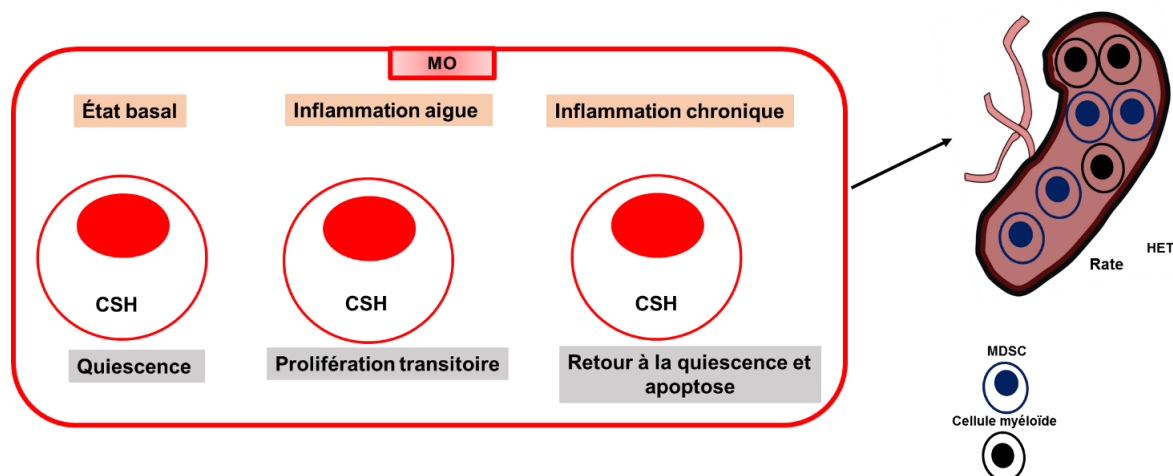


Figure 1.23 L'activité des cellules souches hématopoïétiques dans un environnement inflammatoire

À l'état basal, les CSH sont quiescentes. Lors d'une inflammation aiguë, la prolifération des CSH est transitoire. Lors de l'inflammation chronique, les CSH deviennent préapoptotiques. L'hématopoïèse extramédullaire compense le déficit en cellules myéloïdes et génère de nouvelles cellules suppressives (MDSC) des réponses immunitaires. HET : hématopoïèse extramédullaire, CSH : cellules souches hématopoïétiques, MO : moelle osseuse

## 1.10 La famille des protéines Wnt

Les protéines Wnt ont été découvertes pour la première fois dans les mammifères, lors de l'étude du développement du cancer du sein dans les souris (Nusse and Varmus, 1982). Les recherches ont montré que certaines espèces murines sont capables de transmettre le cancer du sein à leur portée par le lait maternel (Bittner, 1936, Nusse and Varmus, 2012). De façon surprenante, le facteur de transmission de la tumeur, purifié du lait s'avère être un rétrovirus morphologiquement atypique, appelé MMTV (Mouse Mammary Tumour Virus) (Lyons and Moore, 1962, Js et al., 2017). Le MMTV intègre son ADN au génome de la cellule hôte menant à l'activation des pro-oncogènes. L'analyse de la séquence du provirus et de la séquence adjacente de la cellule hôte isolées provenant de différentes tumeurs a permis d'identifier un site d'insertion commun (int1). D'ailleurs, l'infection virale induit aussi une mutation « Wingleless » dans les drosophiles et une séquence liée à int1 est aussi présente. Cette mutation transforme l'intégrité tissulaire des ailes (Sharma and Chopra, 1976). Au fur et à mesure que les recherches avancent d'autres sites d'insertion proviraux sont identifiés (int2, int3, int4) qui ne sont pas tous nécessairement reliés à int1 (Roelink et al., 1990, Dickson et al., 1984, Gallahan and Callahan, 1997). D'un autre côté, l'analyse par PCR a révélé d'autres gènes reliés à int1. Afin d'éviter la confusion, la nomenclature de int1 et ses gènes reliés a été modifiée en *Wnt* issu de la

recombinaison de wingless et int (Nusse and Varmus, 2012). À ce jour, 19 ligands Wnt et 10 récepteurs Frizzeld (Fzd) ont été identifiés chez la souris et l'humain (Wang et al., 2012).

Les protéines Wnt jouent plusieurs rôles biologiques, elles sont en effet impliquées dans le développement embryonnaire, dans la différenciation cellulaire, dans la survie cellulaire et dans le développement des tumeurs (Zimmerman et al., 2013, Mills et al., 2017, Wang et al., 2014a, Jung and Park, 2020).

### **1.11 La sécrétion et le transport des protéines Wnt**

Les Wnt protéines renferment 22-24 résidus cystéines conservés nécessaires à leur activité (Nusse, 2003). La majorité des Wnt ont une structure similaire, soit  $\approx$  350 acides aminés et  $\approx$  40 kDa (Baarsma et al., 2013). Ces protéines sont hydrophobes et sont attachées à la surface de la membrane ou à la matrice extracellulaire. En effet, elles sont sujettes à des modifications post-traductionnelles qui modulent leur sécrétion et leur fonction. Les ligands Wnt sont glycosylés par le complexe oligosaccharyl transférase et palmitoylés au premier résidu cystéine par l'enzyme acyltransférase, la porcupine dans le réticulum endoplasmique (Mikels and Nusse, 2006b, Ke et al., 2013). Bien que le rôle exact de la glycolysation ne soit pas encore complètement élucidé, le rôle de la palmitoylation (liaison covalente entre le palmitate et la cystéine) quant à lui est plus clair (Coudreuse and Korswagen, 2007, Komekado et al., 2007). En effet, l'ajout de palmitoyl intensifie l'interaction entre la protéine Wnt et son récepteur Fzd, renforce l'ancrage de Wnt à la membrane du réticulum endoplasmique et promeut l'attachement du glycosyl au Wnt. L'hydrophobicité des Wnt crée un gradient de concentration qui leur confère un pouvoir morphogène et intensifie leur affinité à la membrane plasmique (Ke et al., 2013). Leur transport à la surface membranaire et la sécrétion des Wnt se fait par un complexe de protéines transmembranaires Wls/Evi présents dans le Golgi et à la membrane plasmique (Mikels and Nusse, 2006b, Ching and Nusse, 2006). Deux façons possibles ont été identifiées par lesquelles les Wnt sont transportées dans le milieu extracellulaire. Les Wnt peuvent soit s'associer aux lipoprotéines à la surface externe de la cellule (Panakova et al., 2005) ou être transportées dans des exosomes dans le milieu extérieur (Gross et al., 2012). De plus, la trancytose est aussi un processus qui semble être impliqué dans le transport des Wnt de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule pour son recyclage au Golgi (Verges et al., 2004). L'association des Wnt avec des protéoglycans en particulier Dally et Dly qui sont attachés aux particules de lipoprotéines semble aussi faciliter leur transport. De plus, ces protéoglycans sont à la surface de la membrane

plasmique, ils augmentent ainsi la concentration locale en ligands et leur proximité aux récepteurs, ce qui augmente la signalisation des Wnt (Nusse, 2003, Mikels and Nusse, 2006b).

En résumé, les ligands Wnt sont glycosylés et palmitoylés dans le réticulum endoplasmique avant leur transport dans le Golgi. Par la suite, ils sont transportés du Golgi à la surface membranaire par le complexe Wls/Evi. Finalement, ils sont relâchés dans le milieu extracellulaire grâce à leur association aux lipoprotéines ou dans des exosomes (figure 1.24).

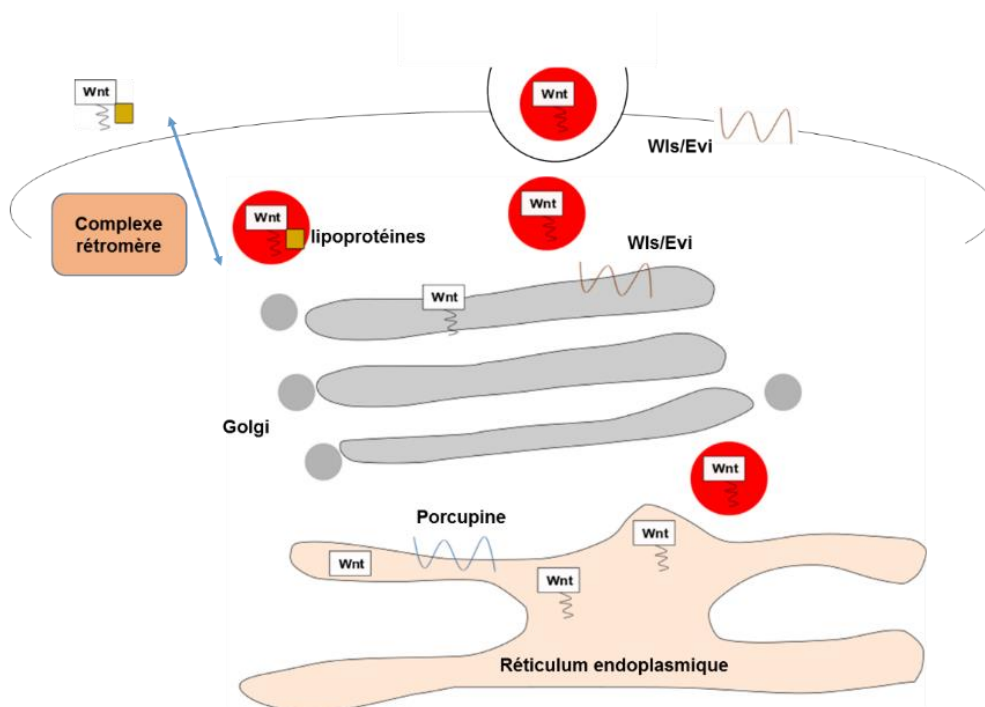


Figure 1.24 La voie de sécrétion et de transport des ligands Wnt

Après leur synthèse, les ligands Wnt sont d'abord glycosylés et ensuite palmitoylés par la porcupine dans le réticulum endoplasmique. Subséquemment, ils sont transportés dans des vésicules au Golgi. Par la suite, ils quittent le Golgi pour se rendre à la membrane plasmique par l'intermédiaire du complexe protéique Wls/Evi. Ils sont sécrétés par exocytose dans le milieu extracellulaire ou en s'attachant à des lipoprotéines qui facilitent leur transfert vers l'extérieur ainsi que leur mobilité.



## 1.12 Les voies de signalisation des ligands Wnt

Les ligands Wnt se lient aux récepteurs Fzd et activent plusieurs voies de signalisation. En effet, la nature du ligand et du type des co-récepteurs disponibles déterminera la signalisation à activer. La voie de signalisation des Wnt se divise en deux voies majeures, la voie canonique (dépendante de la  $\beta$ -caténine) et la voie non canonique (indépendante de la  $\beta$ -caténine). De plus, la voie non canonique comprend deux sous-types, la voie PCP « planar cell polarity » et la voie calcique (Baarsma et al., 2013).

### 1.12.1 La voie canonique ( $\beta$ -caténine dépendante)

En absence d'une stimulation Wnt, la  $\beta$ -caténine est dégradée par un complexe de destruction formé par les protéines Axine, APC, CK-1 $\alpha$  et GSK-3 $\beta$ . Le complexe GSK-3 $\beta$  retient la  $\beta$ -caténine et procède à son ubiquitination ce qui permet sa destruction dans le protéasome (Komiya and Habas, 2008, Kolligs et al., 2002). L'Axine rapproche les composantes du complexe les unes des autres. CK-1 $\alpha$  et GSK-3 $\beta$  sont deux kinases associées au complexe et sont responsables de la phosphorylation hiérarchique de la  $\beta$ -caténine (Stamos and Weis, 2013). En effet, la  $\beta$ -caténine associée avec l'Axine/APC oriente son extrémité N-terminal vers CK-1 $\alpha$  pour sa phosphorylation à la sérine 45. Ensuite, GSK-3 $\beta$  phosphoryle la  $\beta$ -caténine phosphorylée (Ser45) à la Thréonine 41, Serine 37 et Serine 33. La phosphorylation à la sérine 37 et 33 crée un site de liaison pour l'ubiquitination E3 ligase,  $\beta$ -Trcp (Kimelman and Xu, 2006). GSK-3 $\beta$  et CKI phosphorylent aussi APC/Axin pour renforcer la rétention de la  $\beta$ -caténine au complexe (Huang and He, 2008). L'APC retient la  $\beta$ -caténine au complexe et favorise la relâche de la  $\beta$ -caténine phosphorylée (Parker and Neufeld, 2020). Finalement, la  $\beta$ -caténine phosphorylée (Ser45, Thr41, Ser37, Ser33) quitte le complexe par ubiquitination et elle est ensuite dégradée (YunYun Su and Emanuel M. Schreiber, 2008, Baarsma et al., 2013) (figure 1.25)

En présence du ligand Wnt, la  $\beta$ -caténine est stabilisée. Wnt lie le récepteur Fzd à la partie DRC (domaine riche en cystéines) et le co-récepteur Lrp5/6 à la partie N-terminale. Ces interactions induisent la stabilisation du complexe Wnt-Fzd-Lrp5/6 (Tamai et al., 2000, Agostino et al., 2017). Par la suite, ce complexe active la phosphoprotéine Dishevelled (Dvl) dans le cytosol. Ensuite, la protéine Dvl phosphoryle Lrp5/6 qui induit la dissociation de l'Axine du complexe de destruction et lie Lrp5/6 à la partie cytoplasmique. Le complexe GSK-3 $\beta$  est ainsi déstabilisé (Wallingford and Habas, 2005, MacDonald et al., 2009, Komiya and Habas, 2008). Finalement, la  $\beta$ -caténine transloque dans le noyau et active les facteurs de transcriptions TCF/LEF (figure 1.25). La fonction de TCF/LEF est normalement inhibée par la liaison du

répresseur Groucho qui induit la déacétylation de l'histone 3 (H3) et la compaction de la chromatine empêchant ainsi l'expression des gènes (Palaparti et al., 1997, Billin et al., 2000). Cette répression inhibe la liaison de la  $\beta$ -caténine au TCF/LEF (Daniels and Weis, 2005). La  $\beta$ -caténine est transportée dans le noyau par des pores nucléaires et en est exportée par l'APC qui a aussi une localisation nucléaire (Henderson and Fagotto, 2002).

La voie canonique est bien étudiée et sa signalisation est complexe. Plusieurs facteurs sont mis en œuvre aussi bien pour son activation que pour son inhibition. Notamment, quand la situation l'exige, la  $\beta$ -caténine peut être stabilisée par deux phosphatases PP1 et PP2A. Ces phosphatases sont présentes en abondance et s'opposent à sa dégradation. PP1 déphosphoryle l'Axine et mène à sa dissociation du complexe (Luo et al., 2007), tandis que que PP2A déphosphoryle la  $\beta$ -caténine ce qui diminue sa dégradation (YunYun Su and Emanuel M. Schreiber, 2008). Les agonistes de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine se divisent en deux familles, les protéines Norrin et les protéines R-spondin (Rspo). Norrin agit à travers l'activation de Fzd-Lrp5/6 (Xu et al., 2004) et Rspo agit en synergie avec les ligands Wnt afin de renforcer son action (Kazanskaya et al., 2004). Quant aux inhibiteurs de la voie de Wnt/ $\beta$ -caténine, ils sont aussi classés en deux groupes. La famille Dickkopf (Dkk) et la famille the Wise/SOST. Dkk1 a une forte affinité pour Lrp6 et la liaison Dkk1-Lrp6 perturbe la liaison Fzd-Lrp6 ce qui inhibe la signalisation (Semenov et al., 2001). Par ailleurs, il a été montré que Dkk2 requiert la présence de son récepteur Kremen1/2 pour inhiber la signalisation (Lin et al., 2010). De la même façon que DKK2, Dkk1-Kremen1/2 se lient au Lrp5/6 et forment un complexe qui induit son endocytose de la membrane plasmique (Mao et al., 2002). Les protéines Wise/SOST inhibent la signalisation Wnt en se liant à la partie extracellulaire du Lrp5/6 et empêchent la formation du complexe Fzd-Lrp5/6 induit par Wnt (Semenov et al., 2005, Itasaki et al., 2003). Cependant lors du développement embryonnaire Wise a aussi un rôle controversé du fait qu'il puisse aussi mimer l'effet des Wnt. En d'autres termes, le rôle de Wise est contexte dépendant (Itasaki et al., 2003).

### **1.12.2 La voie de signalisation PCP « planar cell polarity »**

De la même façon que la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, la PCP est activée par l'interaction Wnt-Fzd mais n'implique pas les co-récepteurs Lrp5/6. En plus de l'interaction avec Wnt-Fzd, la signalisation PCP est aussi activée par l'action d'autres protéines/corécepteurs tels que, Fmi/Celsr1, Diego, Vangl, Ror2, RyK et Pk (VanderVorst et al., 2018, Goodrich and Strutt, 2011, Butler and Wallingford, 2017, Cerpa et al., 2015, Gao et al., 2011). Lors de la signalisation PCP, ces protéines sont localisées différemment dans la membranaire plasmique. Fzd, Dsh, et Diego

s'accumulent à la partie distale, Vangl et Pk logent à la partie proximale de la membrane plasmique et Fmi/Celsr1 se localise à la partie distale et proximale (Gao, 2012). Une inhibition de l'une de ces protéines mène à une perte de la signalisation PCP (Goodrich and Strutt, 2011, Andre et al., 2012). La voie PCP active les petites GTPase, Rho et Rac par l'activation de la phosphoprotéine Dvl qui forme un complexe avec Daam1. Le complexe Dvl-Daam1 active Rho par le facteur d'échange de guanine WGEF. Rho GTPase active à son tour la kinase ROCK et la myosine, qui tous deux induisent des réarrangements du cytosquelette d'actine. En parallèle, Dvl est apte à activer l'autre GTPase Rac. Une fois la protéine Rac est activée, elle stimule l'activité de la kinase JNK (Angers and Moon, 2009, Goggolidou, 2014, Jenny et al., 2005) (figure 1.25). La voie PCP inhibe la voie Wnt/ $\beta$ -caténine par l'intermédiaire du corecepteur Ror2. En effet, une activation de la voie canonique est renversée par la surexpression de Ror2 (Mikels and Nusse, 2006a).

### 1.12.3 La voie Wnt/ $Ca^{2+}$

L'activation de la voie calcique par Wnt, mène à une accumulation intracellulaire de calcium. L'interaction Wnt-Fzd active la phospholipase C (PLC) qui augmente la concentration intracellulaire de l'inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP3) et du 1,2 diacylglycerol (DAG). IP3 et DAG relâchent les ions de calcium du réticulum endoplasmique et entraînent par conséquent une accumulation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Le calcium produit active des protéines sensibles au  $Ca^{2+}$  telles que les protéines kinase C (PKC), la calcium/calmoduline-dépendent kinase II (CamKII) et la calcineurine. La PKC active la GTPase Cdc42. CamKII active la protéine TAK1 et NLK ce qui mène au blocage de la voie canonique en réprimant la liaison de la  $\beta$ -caténine/TCF par NLK (Komiya and Habas, 2008, De, 2011, Kohn and Moon, 2005, Hutchins et al., 2012) (figure 1.25). La calcineurine active le facteur nucléaire NFAT qui stimule l'expression de différents gènes impliqués dans l'inflammation, dans le développement des muscles cardiaques et les cellules neuronales (Pan et al., 2013, De, 2011)

En somme, les signalisations canonique et non canonique sont antagonistes de sorte que les ligands Wnt sont en compétition continue pour la disponibilité des récepteurs (Grumolato et al., 2010). Néanmoins, il existe des inhibiteurs communs aux voies Wnt tels que la famille des SFRP (Secreted Frizzled – Related Protein). Les SFRP ont un domaine DRC identique à celui des Fzd qui leur permet de s'attacher aux Fzd et leur permettre ainsi d'inhiber la liaison Wnt-Fzd, de moduler la signalisation en liant Fzd ou de former un complexe SFRP-Fzd inactif. Cependant un autre mécanisme d'action à effet opposé n'est pas exclu. Il est admis que SFRP peut favoriser

la liaison Wnt-Fzd en se liant à eux et promeut ainsi la signalisation (Bovolenta et al., 2008). En outre, Shisa un autre inhibiteur de la voie Wnt est identifié, il interagit physiquement avec la forme immature du récepteur Fzd dans le réticulum endoplasmique et supprime sa maturation et son export à la surface cellulaire (Yamamoto et al., 2005).

Pour conclure, les Wnt prototypes sont Wnt3a pour la voie canonique et Wnt5a, Wnt7a, Wnt11, et Wnt4 pour la voie non canonique (Yang et al., 2016, MacDonald et al., 2009). Bien que le rôle des voies de signalisation des Wnt soit bien établi, il demeure impossible d'attribuer de façon définitive une seule voie d'activation aux ligands Wnt cela dépend du type cellulaire et de la disponibilité des récepteurs.

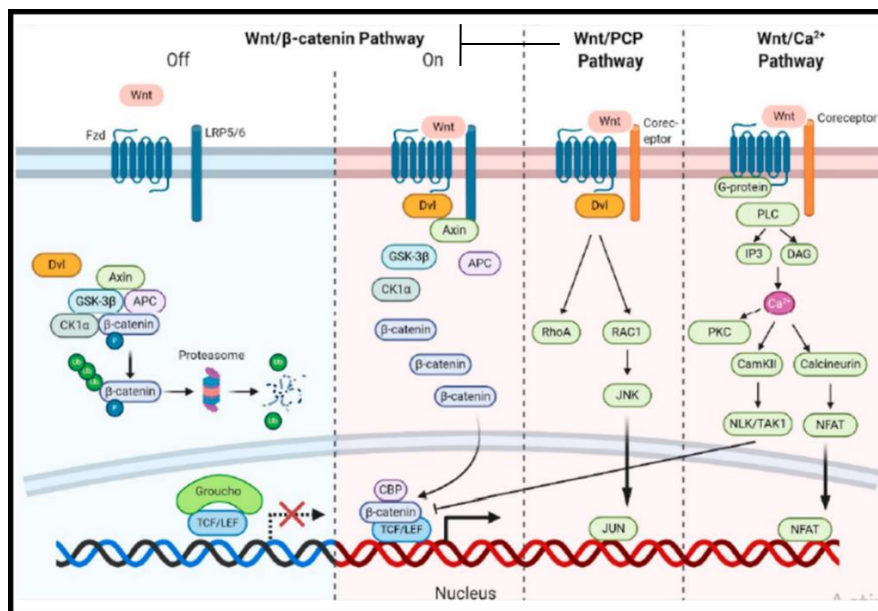


Figure 1.25 Les voies de signalisation des Wnt adapté de (Ruan et al., 2020)

**La voie Wnt/β-caténine.** En absence de Wnt, la formation du complexe de destruction, APC — Axine — CK1α— (GSK-3β) favorise la phosphorylation et la dégradation de la β-caténine par la voie du protéasome. En présence de l'interaction de Wnt-Fzd-LRP5/6, le complexe de destruction est désassemblé menant à la stabilisation de la β-caténine et sa translocation nucléaire, déclenchant l'expression de gènes cibles en aval. Les voies Wnt non canoniques interagissent avec Fzd et d'autres corécepteurs pour recruter la protéine Dvl. **La voie PCP.** L'interaction de Wnt avec les récepteurs active Dvl qui active les GTPases RhoA et RAC1, ce qui entraîne l'activation de JNK. **La voie Wnt-Ca<sup>2+</sup>:** La phospholipase C activée (PLC) entraîne un flux de calcium cytosolique, qui, à son tour, à travers plusieurs étapes intermédiaires, favorise le facteur nucléaire de la transcription des cellules T activées (NFAT). Cette voie antagonise la voie canonique en inhibant l'interaction β-caténine/TCF. ↓ = Activation ; ⊥ = Inhibition

## 1.13 Les ligands Wnt dans les macrophages et les cellules souches hématopoïétiques

Tableau 1.2 Le rôle des ligands Wnt dans la polarisation des macrophages

<p><b>Wnt5a</b></p> <p><u>Type</u> : non-canonique</p> <p><u>Fonction</u> : autocrine</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Induit la différenciation de macrophages inflammatoires :</li> <li>❖ <u>Systèmes utilisés</u> : <i>In vitro</i>, Wnt5a recombinant, type cellulaire : THP-1             <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Augmentation des cytokines : IL-8, CXCL1/2, TNF<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, IL-1<math>\alpha</math>, IFN-<math>\beta</math>, COX-2, CCL2, ICAM-1</li> </ul> </li> <li>❖ <u>Systèmes utilisés</u> : <i>in vitro</i>, Wnt5a recombinant, siWnt5a et inhibition de Wnt5a avec SFRP1, type cellulaire : macrophages humains             <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Augmentation des cytokines IL-6, IL-1<math>\beta</math>, IL-1<math>\beta</math>, MIP-1<math>\beta</math> via la signalisation Wnt5a/Fzd5/CaMKII</li> <li>➤ Diminution des cytokines inflammatoire dans des macrophages <i>siWnt5a</i> stimulés avec LPS/IFN-<math>\gamma</math></li> <li>➤ Diminution d'IL-12 à la suite de l'inhibition de Wnt5a ou Fzd5 et à la stimulation par LPS ou par <i>M. avium</i></li> </ul> </li> <li>❖ <u>Systèmes utilisés</u> : <i>in vitro</i>, Wnt5a recombinant, type cellulaire : macrophages murins dérivés de la moelle osseuse             <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Augmentation de NF-<math>\kappa</math>B à la suite d'une stimulation avec Wnt5a</li> <li>➤ Augmentation de TNF-<math>\alpha</math> et IL-12 à la suite d'une pré-stimulation avec Wnt5a et une infection par <i>M. avium</i></li> </ul> </li> <li>➤ Maintien l'homéostasie immunitaire à l'état basal <i>via Wnt5a-Rac1-NF-<math>\kappa</math>B</i></li> <li>➤ Augmente la capacité phagocytaire (<i>E. coli</i>) et la réponse antivirale</li> <li>➤ Maintien la survie des macrophages</li> <li>❖ <u>Systèmes utilisés</u> : <i>In vitro et siWnt5a</i>, type cellulaire : macrophages murins dérivés de la moelle osseuse, RAW 264.7, macrophages du péritoine             <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Diminution de la NF-<math>\kappa</math>B, de l'IFN<math>\gamma</math>, de l'IFN<math>\beta</math> et de CD14</li> <li>➤ Diminution de la l'internalisation de <i>E. coli</i> et la sécrétion d'IL-6, TNF-<math>\alpha</math> IFN-<math>\beta</math> en réponse à <i>E. coli</i>/LPS</li> <li>➤ Diminution de l'IFN-<math>\beta</math> suite à l'infection virale (vesicular stomatitis virus) et augmentation de la réplication du virus.</li> <li>➤ Diminution des gènes de survie cellulaire (<i>Bcl-2</i>, <i>Bcl-xl</i> et <i>Mcl1</i>) et augmentation des gènes proapoptotiques (<i>Bax</i>)</li> </ul> </li> <li>▪ Augmentation de la polarisation M2</li> </ul>
---	---

	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ <u>Systèmes utilisés</u> : <i>in vitro</i>, Wnt5a recombinant and <i>in vivo</i>, shWnt5a, types cellulaires : RAW 264.7, macrophages murins dérivés de la moelle osseuse <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Wnt5a+TGFβ1 : augmentation de l'expression des gènes M2 (<i>Arg-1</i>, <i>Fizz1</i>, <i>Ym1</i>, <i>MR</i>).</li> <li>➤ Wnt5a+ TGFβ1 : augmente la signalisation Yap/Taz, son inhibition inhibe la polarisation M2 induite par Wnt5a et TGFβ1</li> <li>➤ ShWnt5a <i>in vivo</i> : améliore la fibrose rénale, l'accumulation de macrophages et de la polarisation M2</li> </ul> </li> <li>▪ Promeut la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans le contexte d'implantation osseuse <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ <u>Systèmes utilisés</u> : <i>in vitro</i>, Wnt5a recombinant, type cellulaire : macrophages murins dérivés de la moelle osseuse.</li> <li>➤ Une stimulation avec Wnt5ar augmente l'expression des gènes pro-inflammatoires (<i>Il-1β</i>, <i>Il-12</i>, <i>Tnfa</i>, <i>Cxcl-10</i>)</li> </ul> </li> </ul> <p>(Kim et al., 2012, Maiti et al., 2012, Blumenthal et al., 2006, Pereira et al., 2008, Newman and Hughes, 2012, Schaale et al., 2011, Abaricia et al., 2020, Ye Feng, 2018)</p>
<p><b>Wnt4</b></p> <p><u>Type</u> : non-canonique</p> <p><u>Fonction</u> : autocrine</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Favorise la réparation épithéliale suite à une blessure des cellules pulmonaire et son expression est contrôlée par la cytokine TFF2 (Hung et al., 2019b) <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ <u>Systèmes utilisés</u> : <i>in vitro</i> : co-culture dans un système trans-well de macrophages murins dérivés de la moelle osseuse avec des cellules épithéliales pulmonaires ayant subi une lésion. <i>In vivo</i> : des souris déficientes en TFF2 (<i>TFF2<sup>-/-</sup></i>) infectées par le parasite <i>Nippostrongylus brasiliensis</i></li> <li>➤ Augmentation de Wnt4 dans les macrophages induisant la réparation tissulaire dans le système trans-well</li> <li>➤ Diminution de l'expression de Wnt4 dans les macrophages déficients en TFF2</li> <li>➤ Wnt4r induit la réparation tissulaire dans les souris (<i>TFF2<sup>-/-</sup></i>) (Hung et al., 2019b)</li> </ul> </li> </ul>
<p><b>Wnt3a</b></p> <p><u>Type</u> : non-canonique</p> <p><u>Fonction</u> : autocrine</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Promeut la fonction anti-inflammatoire des macrophages <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ <u>Systèmes utilisés</u> : <i>in vitro</i>, Wnt3a recombinant, types cellulaires : lignée cellulaire (RAW 264.7) et macrophages murins dérivés de la moelle osseuse.</li> </ul> </li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Stimulation Wnt3a+IL-4 ou TGF-β1 : induction des gènes <i>Arg-1</i>, <i>MR</i>, <i>Chitinase 3-like/ym1</i>, <i>Fizz-1</i> via la phosphorylation de STAT3 (Y705)</li> <li>➤ Stimulation Wnt3r +IL-4 : induction de PGE<sub>2</sub>A qui active STAT3 de façon autocrine et paracrine. Cette activation collabore avec IL-4/STAT6 pour induire l'expression de l'Arg-1.</li> <li>❖ <u>Systèmes utilisés</u> : <i>in vitro</i>, Wnt3a recombinant, milieu conditionné pour Wnt3a (L929), type cellulaire : macrophages murins dérivés de la moelle osseuse. <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Macrophage infectés par <i>M. tuberculosis</i>, stimulés par IFN-γ et incubés avec Wnt3a : diminue l'expression de TNF-α</li> <li>➤ Stimulation avec Wnt3a induit l'expression de l'Arg-1</li> </ul> </li> <li>▪ Promeut l'inflammation dans la microglie <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ <u>Systèmes utilisés</u> : <i>in vitro</i>, Wnt3a recombinant, type cellulaire : N13, cellules primaires murines de la microglie</li> <li>➤ Une stimulation avec Wnt3ar induit l'expressions des cytokines inflammatoires (IL-6, IL-12 or TNFα) et des chimiokines (CXCL11, CCL7, CXCL2, 10, CCL2, CCL4, CCL5) et de iNOS</li> </ul> </li> <li>▪ Promeut la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans le contexte d'implantation osseuse <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ <u>Systèmes utilisés</u> : <i>in vitro</i>, Wnt3a recombinant, type cellulaire : macrophages murins dérivés de la moelle osseuse.</li> <li>➤ Une stimulation avec Wnt3ar augmente l'expression des gènes pro-inflammatoires (<i>Il-1β</i>, <i>Il-12</i>, <i>Tnfa</i>, <i>Cxcl-10</i>)</li> </ul> <p>(Ye Feng and Weichun He, 2018, Neumann et al., 2010, Schaale et al., 2011, Feng et al., 2018, Halleskog et al., 2011, Weinstock et al., 2021, Abaricia et al., 2020)</p> </li> </ul>
<p><b>Wnt7a</b></p> <p><u>Type</u> : canonique</p> <p><u>Fonction</u> : autocrine</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Diminue la fonction phagocytaire et altère le profil des cytokines générées par les macrophages (Wallace et al., 2018) <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ <u>Systèmes utilisés</u> : <i>In vitro</i> : Wnt7a recombinant, type cellulaire : macrophages humains</li> <li>➤ Wnt7ar + M0 ou M1 (LPS) ou M2a (IL-4) : diminue CD14 et CD11b</li> <li>➤ Wnt7ar+M1 : diminue CD163</li> <li>➤ Wnt7ar+M0 ou M1 : diminue CD206</li> <li>➤ Wnt7ar+M0 : diminue IL-10 et augmente IL-6</li> <li>➤ Wnt7ar+M1 : diminue IL-12 et augmente IL-6</li> <li>➤ Wnt7ar+M2a : diminue IL-10 et augmente IL-6 (Wallace et al., 2018)</li> </ul> </li> </ul>

**Tableau 1.3 Les fonctions des ligands Wnt dans les cellules souches hématopoïétiques**

<p><b>Wnt3a</b> <u>Type</u> : canonique</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Augmente la lignée hématopoïétique</li> <li>▪ Augmente la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques</li> <li>▪ Maintien la quiescence, l'autorenouvellement et la différenciation des CSH et prévient leur épuisement</li> </ul> <p><u>Note</u> : Une suractivation de la voie Wnt/<math>\beta</math>-caténine ou une déficience engendrent une altération de l'autorenouvellement et de la différenciation des CSH. (Naito et al., 2006, Kitajima et al., 2016, Richter et al., 2017, Fleming et al., 2008, Luis et al., 2009)</p>
<p><b>Wnt2</b> <u>Type</u> : canonique</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Réprime la différenciation hématopoïétique (Wang et al., 2007)</li> </ul>
<p><b>Wnt10b</b> <u>Type</u> : canonique</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Contribue à la régénération des CSH après un traitement chimiothérapeutique (Congdon et al., 2008)</li> </ul>
<p><b>Wnt5a</b> <u>Type</u> : non-canonique</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Maintien la quiescence des CSH</li> <li>▪ Régule la migration et la reconstitution à court et à long termes des CSH (Povinelli and Nemeth, 2014, Schreck et al., 2017, Nemeth et al., 2007, Sugimura et al., 2012)</li> </ul>
<p><b>Wnt16</b> <u>Type</u> : non-canonique</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Nécessaire à l'établissement de l'hématopoïèse définitive chez les poissons zèbres (Clements et al., 2011)</li> </ul> <p><u>Note</u> : Son rôle dans l'hématopoïèse reste à confirmer dans les mammifères</p>
<p><b>Wnt4</b> <u>Type</u> : non-canonique</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Augmente l'expansion des progéniteurs hématopoïétiques</li> <li>▪ Favorise la reconstitution des lignées hématopoïétiques chez des souris immunodéficientes (Louis et al., 2008, Heinonen et al., 2011b)</li> </ul>



## 1.14 Les voies de signalisation de Wnt4/Fzd6

La voie de signalisation activée par le ligand Wnt4 n'est pas restreinte à la voie canonique ou non canonique uniquement, mais varie selon le contexte. La co-culture de cellules rénales canines (MDKC) avec des fibroblastes (NIH-3T3) surexprimant Wnt4 augmente l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine (Lyons et al., 2004). L'induction de l'activité de la  $\beta$ -caténine indique que la voie canonique est activée par la stimulation exogène de Wnt4. Par ailleurs, Wnt4 est décrit comme un ligand non canonique dans les gonades, le thymus et les progéniteurs hématopoïétiques (Jordan et al., 2003, Heinonen et al., 2011b, Louis et al., 2008) et inhibe la voie canonique en relocalisant la  $\beta$ -caténine à la membrane plasmique dans des HEK-293T (Bernard et al., 2008). Le ligand Wnt4 est précisément associé à la voie non canonique Wnt/PCP dans les progéniteurs hématopoïétiques (LSK) (Heinonen et al., 2011b). La stimulation d'une lignée cellulaire de progéniteurs hématopoïétiques (EML) par Wnt4 recombinant augmente la phosphorylation de JNK1/2 et la forme active de Rac1. Ces observations ont été confirmées dans une co-culture de foie fœtal avec des fibroblastes (NIH-3T3) surexprimant Wnt4 (Heinonen et al., 2011b). Dans les thymomes, l'expression de Wnt4 est significativement augmentée et corrèle avec l'augmentation de l'expression de JNK. De plus, une délétion de Wnt4 inhibe l'ARNm et l'expression protéique de JNK (Chen et al., 2018b). Ces études mettent en relief le caractère non canonique du ligand Wnt4 et son implication dans la voie Wnt/PCP dans le thymus et dans les CSH.

Le récepteur de Wnt4 n'est pas encore profondément investigué, cependant dans les cellules rénales et les cellules hématopoïétiques, Fzd6 a été identifié comme récepteur du ligand Wnt4. En effet, dans les cellules MDKC stimulées avec Wnt4, le récepteur Fzd6 est le seul détecté ce qui l'identifie comme récepteur physiologique potentiel de Wnt4 (Lyons et al., 2004). En effet, la surexpression de Fzd6 dans les cellules NIH-3T3 montre une interaction physique entre Fzd6 et Wnt4 par co-immunoprécipitation (Lyons et al., 2004). Cependant, la surexpression de Fzd6 dans les cellules MDKC n'induit pas d'activation supplémentaire de la voie canonique activée par Wnt4. Ces observations suggèrent que Fzd6 n'est pas un activateur exclusif la voie canonique. Cet effet a été aussi montré dans des embryons de larves (*Xenopus laevis*). Une co-injection de Wnt4 et de Fzd6 dans ces embryons n'induit pas de duplication de l'axe dorsale (Lyons et al., 2004). Étant donné qu'à ce stade de l'embryogenèse Wnt4 n'est pas exprimé (McGrew et al., 1992), ceci suggère qu'en dépit du fait que Wnt4 et son récepteur sont disponibles, l'activation de la voie canonique responsable du développement de l'axe dorsale n'est pas induite (Schohl and Fagotto, 2003) n'est pas induite. En somme, Fzd6 ne parvient pas à activer la voie canonique ceci indique

l'intervention d'autres facteurs ou de voies de signalisation qui collaborent en synergie. D'ailleurs, dans d'autres types cellulaires (293T, SW480 et HCT116), la surexpression de Fzd6 est associée à la voie non canonique Wnt/Ca<sup>2+</sup> et inhibe la voie canonique activée par Wnt3a (Golan et al., 2004). En activant la voie calcique, Fzd6 active TAK1/NLK qui phosphorylent TCF et empêche donc la liaison de la  $\beta$ -caténine au TCF et réduit aussi la liaison TCF/LEF au site de la liaison sur l'ADN. Ces effets sont abolis lorsque les protéines CamKII ou TAK1 sont inhibées (Golan et al., 2004). Dans ces modèles, Fzd6 est un antagoniste à la voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine en activant la voie non canonique Wnt/Ca<sup>2+</sup>. De plus, la délétion du récepteur Fzd6 dans le foie fœtal réduit l'expansion des LSK observée par une stimulation au Wnt4 exogène ce qui indique que l'effet de Wnt4 est transmis en partie par Fzd6 (Heinonen et al., 2011b). Ces travaux sont l'unique étude à ce jour qui a mis en évidence une interaction entre Wnt4 et le récepteur Fzd6 dans les progéniteurs hématopoïétiques.

Le ligand Wnt4 n'a pas encore été investigué dans les macrophages et son récepteur demeure encore inconnu. Cependant, selon la base de données *Immunological Genome Project*, Fzd6 est exprimé dans les macrophages et dans les précurseurs myéloïdes (ImmGen). D'autres récepteurs Fzd notamment Fzd5 et Fzd1 sont exprimés dans les macrophages et ont décrit un rôle actif dans l'induction de l'inflammation (Blumenthal et al., 2006, Neumann et al., 2010). En effet, l'ARNm de Fzd1 augmente dans les macrophages infectés par des mycobactéries (*M. tuberculosis* et *M. avium*) ou par une stimulation au LPS (Neumann et al., 2010). Cette augmentation corrèle avec l'activation inflammatoire des macrophages. L'ARNm de Fzd5 augmente aussi dans les macrophages infectés par la mycobactérie *M. tuberculosis* ou stimulés avec LPS. L'inhibition de Fzd5 abolie la sécrétion IL-12 et d'IFN- $\gamma$ . Donc Fzd5 est un acteur clé dans l'induction de la réponse inflammatoire dans les macrophages (Blumenthal et al., 2006). En somme, le manque de données et le rôle polyvalent des ligands Wnt et des récepteurs Fzd rendent l'élucidation du mécanisme d'action du ligand Wnt4 dans les macrophages complexe.

### **1.15 Rôles physiologiques de Wnt4**

Le rôle de physiologique de Wnt4 varie aussi selon le contexte et le type cellulaire. Par exemple la présence de Wnt4 lors du développement embryonnaire est non seulement essentielle à la néphrogenèse et à la formation des tubules rénaux (Vainio and Uusitalo, 2000, Kispert et al., 1998) mais aussi à l'orientation antérieur-postérieur de l'axone commissuraux (Lyuksyutova et al., 2003). De plus, Wnt4 est requis autant dans le processus de développement des reins que dans le processus de réparation des tissus rénaux à la suite d'une blessure

(Surendran et al., 2002). En outre, Wnt4 a été étudiée dans l'ostéoporose, une inflammation chronique qui induit la perte osseuse (Li et al., 2019, Bo Yu, 2014). Dans ce contexte, Wnt4 contrecarre l'inflammation et favorise l'ostéogenèse. En effet, dans des cellules pré-ostéoblastiques (MC3T3-E1), Wnt4 en combinaison avec la mélatonine induit l'expression de marqueurs ostéogéniques (Runx2, Osx, ALP et OCN) ainsi que l'augmentation de précurseurs ostéogéniques. Une délétion de Wnt4 dans les MC3T3-E1 diminue l'expression des gènes *Runx2*, *Osx*, *Alp* et *Ocn* et inhibe la phosphorylation de p65 induite à la suite d'une stimulation par TNF $\alpha$  (Li et al., 2019). Le rôle anti-inflammatoire de Wnt4 dans l'ostéoporose a été aussi montré dans un modèle des souris transgéniques exprimant TNF $\alpha$  et Wnt4 (tgTNF $\alpha$ /Wnt4) (Bo Yu, 2014). Les souris tgTNF/Wnt4 montrent une réduction du gonflement au niveau des pattes et des articulations comparativement aux souris tgTNF $\alpha$ . De plus, dans les souris tgTNF/Wnt4 l'activité des ostéoclastes est diminuée et une augmentation de la concentration sérique de l'ostéocalcine (un marqueur de la formation osseuse) est observée. En outre, une diminution des marqueurs de l'inflammation NF- $\kappa$ B (diminution de p-p65) et de l'expression des gènes *Tnfa*, *Cox-2* et *Mmp9* dans les souris tgTNF/Wnt4 est notée (Bo Yu, 2014). En résumé, Wnt4 induit l'ostéogenèse et atténue l'inflammation associée à l'âge observée dans l'ostéoporose.

L'implication de Wnt4 est aussi investiguée dans les troubles métaboliques tel que le diabète (Bowen et al., 2016). En utilisant des cellules pancréatiques  $\beta$  comme modèle (INS-1  $\beta$ -cells), une étude a montré qu'une stimulation avec exendin-4, un agoniste du récepteur GLP-1 responsable de la sécrétion de l'insuline augmente l'expression de l'ARNm de *Wnt4*. L'augmentation significative de Wnt4 est aussi observée lorsque les cellules INS-1  $\beta$  sont mises en culture dans un milieu conditionné contenant GLP-1. Une délétion de Wnt4 inhibe la prolifération des cellules et une stimulation par exendin-4 diminue l'expression de TNF $\alpha$  en diminuant la transcription du facteur de transcription AP-1 connu comme régulateur du gène de TNF $\alpha$ . En dépit de son expression abondante dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques, Wnt4 n'affecte pas la sécrétion de l'insuline stimulée par une concentration croissante de glucose. D'autres investigations sont nécessaires pour élucider le rôle de Wnt4 dans la physiologie des cellules pancréatiques  $\beta$  et pour son utilisation éventuelle comme cible thérapeutique dans les cas de diabètes et/ou d'obésités (Heller et al., 2011).

Dans la maladie de Parkinson, Wnt4 montre un rôle protecteur. Cette maladie neurodégénérative se caractérise par des mitochondries dysfonctionnelles et une suppression de l'autophagie (Macdonald et al., 2018). Etant donné que la principale source d'ATP des neurones est la mitochondrie, une altération fonctionnelle des mitochondries aboutit à la mort des neurones.

Le rôle de Wnt4 a été évalué dans des drosophiles transgéniques contenant une mutation de Pink1 (*Pink1<sup>ΔΔ</sup>*) afin de mimer la maladie de Parkinson dans ce modèle. Une surexpression de Wnt4 rétablit le phénotype en augmentant Beclin-1 et en diminuant P62. Ces changements dans ces marqueurs indiquent une augmentation de l'autophagie. De plus, une augmentation du nombre de mitochondries et une augmentation des niveaux d'ATP ont été aussi observées dans les drosophiles *Wnt4/Pink1<sup>ΔΔ</sup>* (Wu et al., 2019). Finalement, Wnt4 a aussi un rôle bien défini dans le développement des ovaires et la fertilité (Jeays-Ward et al., 2004, Boyer et al., 2010). Wnt4 est exprimé dans les gonades des deux sexes mais son expression diminue dans les testicules et augmente dans les ovaires à 11.5pc. Des souris déficientes en Wnt4 dans les ovaires présentent des caractéristiques masculines notamment une production de testostérone et une perturbation de l'ovariogenèse (Ottolenghi et al., 2007).

En conclusion, ce bref survol des fonctions de Wnt4 définies à ce jour montrent l'importance du ligand Wnt4 autant dans le développement embryonnaire qu'à l'âge adulte.

## 1.16 Hypothèses et objectifs

### 1.16.1 Premier projet

Le peu d'études antérieures qui existent sur le rôle du ligand Wnt4 ont montré son implication dans l'inflammation, la différenciation myéloïde et la réponse immunitaire.

- Wnt4 inhibe l'inflammation associée à l'âge (Bo Yu, 2014)
- La délétion de Wnt4 influence la différenciation des cellules dendritiques (DC) dans la moelle osseuse (MO) en diminuant le ratio cDC1/cDC2 (Hung et al., 2019a).
- L'absence de Wnt4 dans les cellules dendritiques induit une réponse de type 2 lors d'une infection parasitaire au *Nippostrongylus brasiliensis* (Hung et al., 2019a).

Considérant l'origine commune des cellules dendritiques et des macrophages, l'implication du métabolisme dans la détermination de la polarisation ainsi que nos précédents résultats qui ont montré que la surexpression de Wnt4 augmente les précurseurs myéloïdes dans la MO (Heinonen et al., 2011b), nous nous sommes posé les questions suivantes :

- Est-ce que Wnt4 module la fonction des macrophages ?
- Est-ce que Wnt4 influence la reprogrammation métabolique des macrophages ?

Ensuite, nous avons émis l'hypothèse que Wnt4 contrôlerait la polarisation et le comportement des macrophages dérivés de la MO (BMDM) en régulant leur métabolisme et leur fonction.

Dans le but de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse, nous avons étudié différents aspects dans les BMDM contrôlés et déficients en Wnt4. Pour ce faire, nous avons établi deux objectifs.

- 1) Évaluer la modulation du métabolisme des BMDM à la suite de la délétion de Wnt4
  - Analyser le bilan énergétique
  - Analyser les paramètres de la glycolyse et de la respiration mitochondriale
- 2) Déterminer la fonction des BMDM lors de stimuli inflammatoires et anti-inflammatoires
  - Étudier la réponse des macrophages lors d'un stress physiologique inflammatoire (LPS)
  - Étudier la réponse des macrophages lors d'une infection parasitaire par le *Leishmania donovani*

### 1.16.2 Deuxième projet

Les macrophages de la MO ont une particularité, ils sont non seulement la descendance des cellules souches hématopoïétiques, mais contribuent aussi à leur maintien dans la niche

hématopoïétique à l'intérieure de la MO. De plus, Wnt4 a aussi un rôle non négligeable dans la génération des lignées hématopoïétiques.

– La surexpression de Wnt4 promeut la reconstitution des progéniteurs hématopoïétiques de la MO ainsi que les cellules thymiques après une greffe de foie fœtal (Heinonen et al., 2011b)

– L'ajout de Wnt4 exogène augmente l'expansion des cellules épithéliales thymiques dans des thymus déficients en Wnt4 suggérant que l'effet de Wnt4 n'est pas intrinsèque aux cellules du thymus (Heinonen et al., 2011a)

– Wnt4 est exprimé dans les cellules hématopoïétiques de la MO (Heinonen et al., 2011b, Louis et al., 2008).

Étant donné les évidences du rôle de Wnt4 dans la régulation hématopoïétique et le rôle des macrophages dans la niche hématopoïétique nous nous sommes posés deux questions :

– Est-ce que Wnt4 régule la fonction des cellules souches hématopoïétiques ?

– Est-ce que l'effet de Wnt4 est-il intrinsèque à la cellule souche hématopoïétique ?

Ensuite, nous avons émis l'hypothèse que Wnt4 contribuerait au maintien et à la différenciation des cellules souches hématopoïétiques.

Dans le but de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse, nous avons étudié différents aspects dans les CSH contrôles et déficients en Wnt4. Pour ce faire, nous avons établi trois objectifs.

- 1) Étudier l'influence de l'absence de Wnt4 sur la génération des progéniteurs hématopoïétiques
  - Analyser le nombre de cellules dans les organes immunitaires (MO, rate et thymus) et dans des progéniteurs hématopoïétiques (LSK, MPP, précurseurs lymphoïdes et myéloïdes)
- 2) Évaluer la fonction d'autorenouvellement des CSH à court et à long terme
  - Analyser la reconstitution de la MO à la suite d'une greffe compétitive en série de CSH contrôles et déficientes en Wnt4
- 3) Déterminer les voies de signalisations cellulaires altérées par l'absence de Wnt4
  - Analyser la voie de signalisation de la voie PCP et le cycle cellulaire des CSH
  - Analyser l'impact de Wnt4 sur le cycle cellulaire à long terme en évaluant le marqueur de la sénescence (SA- $\beta$  galactosidase) dans les CSH adultes

## 2 WNT4 RÉGULE LE MÉTABOLISME MITOCHONDRIAL DES MACROPHAGES

---

**Titre de l'article :** Cell-intrinsic Wnt4 regulates macrophage mitochondrial oxidative phosphorylation

Wnt4 intrinsèque régule la phosphorylation oxydative mitochondriale des macrophages

**Auteurs :**

Mouna Tlili<sup>1</sup>, Hamlet Acevedo Ospina<sup>1</sup>, Albert Descoteaux<sup>1</sup>, Marc Germain<sup>2,3,4</sup>, Krista M. Heinonen<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Institut national de recherche scientifique, Centre Armand Frappier Santé Biotechnologie, Laval H7V 1B7, CANADA

<sup>2</sup>Groupe de Recherche en Signalisation Cellulaire and Département de Biologie Médicale, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, CANADA

<sup>3</sup>Centre d'Excellence de Recherche sur les Maladies Orphelines – Fondation Courtois (CERMO-FC), Montreal, CANADA

<sup>4</sup>Réseau Intersectoriel de Recherche en Santé de l'Université du Québec, Université du Québec, Québec, CANADA

**Titre du journal :** Journal of Biological Chemistry

Article soumis à JBC et les révisions demandées sont en cours pour une resoumission

**Contribution des auteurs :**

MT : Conception et réalisation de toutes les manipulations excepté les infections au *Leishmania donovani*, préparation de toutes les figures, analyse, interprétation et écriture de la version originale de l'article

HAO : Réalisation des infections des macrophages par *Leishmania donovani* et analyse de la coloration au Giemsa

AD : Ressource et révisions de la partie expérimentale des infections

MG : Conception, ressource et écriture/révisions de l'article

KH : Conception, support financier, supervision et écriture/révisions de l'article

## ABSTRACT

Macrophages respond to their environment by adopting a predominantly inflammatory or anti-inflammatory profile, depending on the context. The polarization of the subsequent response is regulated by a combination of intrinsic and extrinsic signals and is associated with alterations in macrophage metabolism. Although macrophages are important producers of Wnt ligands, the role of Wnt signaling in regulating the metabolic changes associated with macrophage polarization remains unclear. Wnt4 upregulation has been associated with tissue repair and suppression of age-associated inflammation, which led us to generate Wnt4-deficient bone marrow-derived macrophages (BMDM) to investigate its role in metabolism. Loss of Wnt4 modified mitochondrial structure, enhanced oxidative phosphorylation, and depleted intracellular lipid reserves, as the cells depended on fatty acid oxidation to fuel their mitochondria. Although not irreversible, these metabolic changes corresponded to increased parasite survival during infection with *Leishmania donovani*. Our results further suggest Wnt4 as a potential target in atherosclerosis, characterized by lipid storage in macrophages becoming foam cells.

## 2.1 Introduction

Macrophages possess multiple functions, ranging from pathogen clearance and antigen presentation to T lymphocytes to tissue remodeling and immune suppression (Hirayama et al., 2017, Gordon and Pluddemann, 2017, Wang et al., 2013). By analogy with the cytokine responses generated, macrophages have been long divided into two main categories: classically activated pro-inflammatory macrophages (M1) and alternatively activated anti-inflammatory macrophages (M2) (Mills et al., 2000, Italiani and Boraschi, 2014, Van Ginderachter et al., 2006, Ley, 2017). These two differentiation profiles have also been characterized by their diverging cellular metabolism (Jha et al., 2015a, Artyomov et al., 2016, Liu et al., 2016). M1 macrophages upregulate glycolytic enzymes and preferentially use glucose as their main energy source, resulting in ATP production through the conversion of pyruvate to lactate (Kelly and O'Neill, 2015, Artyomov et al., 2016). In contrast, M2 macrophage metabolism is supported by a high mitochondrial activity and oxidative phosphorylation (OXPHOS), fueled at least in part by fatty acid oxidation (FAO) (Nomura et al., 2016, Huang et al., 2014).



Macrophage polarization is regulated by a combination of intrinsic and extrinsic signals, such as cytokines, growth factors, and microbial products. Wnt signaling is known for its pleiotropic effects in cell fate decisions during development and tissue repair, but although macrophages are known to express several Wnt ligands, the role of individual Wnt proteins in macrophage polarization is not well established (Malsin et al., 2019). The prototypical canonical ligand that would promote  $\beta$ -catenin translocation into the nucleus, Wnt3a, increases arginase expression in primary macrophages after bacterial infection and inhibits the secretion of pro-inflammatory cytokines (Neumann et al., 2010, Schaale et al., 2011). Conversely, Wnt5a, which is usually associated with  $\beta$ -catenin-independent non-canonical Wnt signaling, promotes inflammatory responses via the transcription factor NF- $\kappa$ B to ensure immune surveillance (Naskar et al., 2014), and both Wnt5a and NF- $\kappa$ B expression are increased upon macrophage exposure to mycobacteria (Schaale et al., 2011). However, the role of Wnt signaling in macrophage metabolism has not been investigated.

We have focused our study on Wnt4, a mostly non-canonical ligand (Heinonen et al., 2011b, Hung et al., 2019a), whose expression is upregulated in lung macrophages upon injury to promote tissue repair (Hung et al., 2019b). Wnt4 overexpression in the bone marrow was shown to inhibit age-associated inflammation (Yu et al., 2014), while its deletion from dendritic cells impacts their differentiation and promotes the development of type 2 immunity in response to the hookworm parasite *Nippostrongylus brasiliensis* (Hung et al., 2019a). We thus hypothesized that Wnt4 could also contribute to the metabolic reprogramming of bone marrow-derived macrophages (BMDM).

We show that Wnt4-deficient BMDM display reduced AKT (Thr308) and ERK1/2 phosphorylation but increased ATP levels, which can be attributed to an enhanced mitochondrial OXPHOS activity. Furthermore, we identify FAO as a principal mechanism involved in the increase in mitochondrial activity. However, while Wnt4-deficient macrophages respond more strongly to LPS/M1-type stimulation, the lack of Wnt4 in BMDM favors replication of the protozoan parasite *Leishmania donovani*, suggesting impaired control of intracellular pathogens.

## 2.2 Materials and methods

### 2.2.1 Experimental animals

B6.129P2-Lyz2<sup>tm1(cre)lfo</sup>/J (LysMCre) mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Mice with a *Wnt4* conditional allele have been described elsewhere (Shan et al., 2009) and were originally a kind gift from S. Vainio (Oulu University, Finland). Mice were bred and housed under specific pathogen-free conditions in sterile ventilated racks at the animal facility of INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie. All procedures were in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines. Only female mice were used for the following experiments.

### 2.2.2 Flow cytometry analysis

BM was harvested by flushing tibias and femurs with PBS/0.1% BSA/0.5 mmol EDTA using a 25-gauge needle. To analyze BMDM, the following antibodies were used: anti-CD11c, anti-Ly6C, anti-F4/80, anti-MHCII, anti-CD206, anti-CD86 (BD Biosciences, Mississauga, ON). For intracellular staining, surface stained BM cells were fixed and permeabilized using the Foxp3 staining kit (eBioscience, San Diego, CA) and then incubated with the following unconjugated primary antibodies: p62 (1/400) (Abcam), p-AKT(Thr308) (1/100), p-AKT (Ser473) (1/100),  $\beta$ -catenin (Ser552) 1/200, p-ERK (Thr202/Tyr204) (1/100), ERK (1/100), AKT (1/100) (all from Cell Signaling Technologies), or Lamp1 (1/800) (Abcam), for overnight at 4°C. Unconjugated antibodies were detected with an Alexa 488-conjugated F(ab')<sub>2</sub> fragment against rabbit IgG (Molecular Probes). The stained cells were analysed on a four-laser BD LSRFortessa™ cell analyzer (BD Biosciences, Mountain View, CA) and analyzed using FACS DiVa (v. 8.1) or FlowJo (v. 10.1) software.

### 2.2.3 Cell culture

BM was flushed with 5 ml HBSS, centrifuged at 1236 g or 7 min and the pellet was resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS Premium, Wisent Bioproducts, St-Bruno, QC) at 5x10<sup>6</sup> cell/ml. 1.5x10<sup>6</sup> cells were seeded in a non-adherent petri dish and cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and 20 % conditioned medium from L929 fibroblasts as previously described (Heinonen et al., 2006). The differentiation medium was refreshed on day 5 and adherent BMDM were

collected with Trypsin/EDTA solution on day 7 and analyzed by flow cytometry or replated in DMEM/10% FBS for further analyses. LPS was purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON) and used at a final concentration of 100ng/ml. Oligomycin was (2 $\mu$ M) (Sigma Aldrich) was added for 1h at 37°C. For autophagy induction, BMDM were replated in Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) (Life Technologies) for 2 h at 37 °C with or without Bafilomycin (100 nM).

#### **2.2.4 Immunofluorescence**

2x10<sup>5</sup> cells were seeded overnight on uncoated coverslips at 37 °C. The cells were first fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature and then washed 3 times with PBS. Fixed BMDM were permeabilized with PBS/0.1% Triton™ X-100 solution, for 2 min, then blocked with PBS/0.1% Triton/1% BSA for 10 min. The cells were incubated for 1h at room temperature with primary antibodies: anti-LC3 (1/100) (Cell Signaling Technologies) or anti-Tom20 (1/100) (Abcam), washed 3 times with PBS, and incubated with Alexa 488-conjugated secondary antibody (1/1000) for 30 min at room temperature. Finally, the coverslips were washed and mounted on the microscope slides with ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI (Thermo Fisher Scientific). Images were taken using a LSM 780 confocal microscope with 60X oil objective.

#### **2.2.5 Enzymatic activity**

Cathepsin B activity. Cells were collected with Trypsin with 0.25 % EDTA, washed with PBS 1X and collected by centrifugation at 200 g for 5 min, at 4°C. Cells were lysed by buffer containing Tris-HCL 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM and Triton™ X-100 (0.5%) and centrifuge at 18300 g for 12 min, at 4°C. Supernatants were collected and proteins were dosed with Bradford Kit (Biorad). 10 $\mu$ g proteins were diluted in 100 $\mu$ l of 100 mM HEPES, pH 6.0, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, and 5 mM EDTA in the presence of a 5  $\mu$ M concentration of the cathepsin B substrate zRR-AMC (Sigma-Aldrich). Samples were incubated for 30 min at 37°C, fluorescence was measured (excitation/emission 360/440 nm) using a Cytation5 Cell Imaging Multi-Mode Reader

Lysosomal acid lipase (LAL) activity was measured as described (Dairaku et al., 2014) by diluting 20 $\mu$ g of proteins in 100  $\mu$ l of reaction buffer (100 mM sodium acetate, pH 4.0, 1% (v/v) Triton™ X-100, and 0.5% (w/v) cardiolipin) in the presence of 0.345 mM 4-methylumbelliferone (Sigma-Aldrich). Samples were incubated for 1 h at 37 °C. Fluorescence was measured (excitation/emission 360/440 nm) using a Cytation5 Cell Imaging Multi-Mode Reader.

Citrate synthase: Citrate Synthase Activity Colorimetric Assay Kit (Biovision, Catalog # K318-100), following manufacturer's instructions.

### **2.2.6 ATP and lactate assays**

$2 \times 10^5$  cells were grown in 96-well plates. Cellular ATP was measured by ATP using Cell Titer Glow kit (Promega) and total lactate was measured using Lactate Colorimetric/Fluorometric (Biovision) Assay Kit were measured in triplicate following the protocol provided.

### **2.2.7 Elisa TNF $\alpha$**

Supernatants were collected from *Wnt4* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  BMDM and control cultures upon 6 h stimulation with LPS and at 6h, 24h and 72h post-infection with *Leishmania donovani*. Fifty  $\mu$ l from each condition were added in duplicates and TNF $\alpha$  levels were measured using Mouse TNF-alpha Quantikine ELISA Kit (R&D SYSTEMS, Catalog # MTA00B) as per manufacturer's instructions.

### **2.2.8 Glucose consumption**

Supernatants were collected from *Wnt4* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  BMDM and control cultures. Fifty  $\mu$ l from each condition were added in duplicates to 96 well plates and glucose levels were determined using Glucose Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (Biovision, Catalog # K606-100) as per manufacturer's instructions.

### **2.2.9 Nitric oxide quantification**

Supernatants were collected from *Wnt4* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  BMDM and control cultures upon 24 h stimulation with LPS and at 6h, 24h and 72h post-infection with *Leishmania donovani*. 100 $\mu$ l from each condition were added in duplicates to 96-well plates. Nitrate levels were measured by the, Greiss reaction, as described in (Grisham et al., 1996, Bryan and Grisham, 2007).

### **2.2.10 Mitosox**

BMDM were collected and stained with the MitoSOX Red mitochondrial superoxide indicator reagent (Invitrogen) at a final concentration of 5 $\mu$ M, and the cells were incubated for 30 min at 37°C, after which they were washed and analysed by for flow cytometry.

### **2.2.11 Tetramethylrhodamine, methyl ester (TMRM)**

BMDM were collected and stained with TMRM (Thermo Fisher) at a final concentration 0.5nM and the cells were incubated for 30 min at 37°C, after which they were washed and analysed by flow cytometry.

### **2.2.12 Extracellular flux analysis.**

BMDM were seeded at  $4 \times 10^4$  cells on Seahorse XF96 cell culture microplates (Agilent) and treated with etomoxir (250  $\mu$ M) and 2-Deoxy-d-glucose (2-DG) (5 mM) for 30 min at 37 °C. Medium was changed with Seahorse XF DMEM medium, pH 7.4 (Agilent) supplemented with 10 Mm glucose, 1Mm pyruvate and 2mM glutamine and cells were incubated for 1 h at 37 °C with no CO<sub>2</sub>. Mito stress kit (Agilent) was used and XF analysis was performed using the XF-96e analyser (Seahorse Bioscience) as per manufacturer's instructions. All reagents provided by Sigma-Aldrich.

### **2.2.13 *Leishmania donovani* culture and infections**

Promastigotes of *L. donovani* (MHOM/ET/67/Hu3:LV9) freshly differentiated from splenic amastigotes were cultured in Leishmania medium (M199 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Hyclone), 100  $\mu$ M hypoxanthine, 10 mM HEPES, 5  $\mu$ M hemin, 3  $\mu$ M biopterin, 1  $\mu$ M biotin, penicillin (100 I.U./mL) and streptomycin (100  $\mu$ g/mL) at 26°C. For BMDM infections, metacyclic promastigotes were isolated at 1400 RPM in 15-ml Falcon conical centrifuge tubes containing 1 ml of 40% Ficoll (GE Healthcare) at the bottom, overlaid by 2 ml of a single gradient of 10% Ficoll and overlay  $1 \times 10^8$  promastigotes from the late stationary growth phase in 2 ml of non-supplemented DMEM (Spath and Beverley, 2001). Complement opsonization of metacyclic promastigotes was performed prior to infections by incubating the parasites in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) containing 10% serum from DBA/2 mice for 30 min at 37°C. BMDM were then incubated at 37°C with metacyclic promastigotes (parasite-to-macrophage ratio of 5:1). After 3 hours of incubation, non-internalized parasites were washed 3X with warm HBSS. The time points are described in each experiment. Infection levels were assessed by microscopic examination of infected cells after Giemsa staining with the Hema 3 system (Fisher Scientific).

### 2.2.14 Western Blot (WB)

Cells were collected with Trypsin with 0.25 % EDTA, washed with PBS 1X and collected by centrifugation at 200 g for 5 min, at 4°C. cells were lysed by buffer containing Tris-HCL 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM et Triton 0.5% and centrifuge at 18300 g for 12 min, at 4°C. Supernatants were collected and phosphatase (NAF 0.3mM) inhibitor were added. Proteins were dosed with Bradford Kit (Biorad). Prior to electrophoresis samples were mixed with loading buffer to obtain 1X and 5%  $\beta$ -mercaptophenol (62.5 mM Tris-HCl pH 6.5, 2.5% SDS, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue) and incubated at 95°C for 5 minutes. 50  $\mu$ g proteins were added to each well, then resolved on SDS-PAGE followed by wet-transfer to PVDF membranes. Detection was done by immunoblotting using the indicated antibody, Tom20 (Abcam1/1000). The membrane was developed on the automatic film processor machine (AFP ImageWorks).

### 2.2.15 Statistical analysis

Each value represents at least three independent experiments. Two-tailed Student t test or oneway anova was used to determine statistical significance. A p value < 0.05 was considered significant.

## 2.3 Results

### 2.3.1 Wnt4 promotes AKT (Thr308) and ERK signaling

To elucidate the importance of *Wnt4* in macrophages, we generated conditional knock-out mice in which *Wnt4* is deleted from most macrophages and granulocytes by LysM-Cre-mediated excision (*Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* mice) (Cross et al., 1988, Clausen et al., 1999). These mice present no overt alterations in myeloid differentiation *in vivo* (Hetu-Arbour et al., 2021b). We isolated BM cells from *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* and Cre<sup>-</sup> littermate control mice and we obtained comparable numbers of *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* and control BMDM after one week in culture (Fig. 2.1A, 2.1B). While *Wnt4* deletion was highly efficient in culture (Supplementary Fig. 2.2A), *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* and control BMDM expressed similar levels of the macrophage surface marker F4/80 (Supplementary Fig. 2.2B), suggesting that *Wnt4* deficiency did not significantly alter BMDM differentiation from BM progenitors. There was no difference in  $\beta$ -catenin phosphorylation (Fig. 2.1C) or in the activation of c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) (Fig. 2.1D, 2.1E), suggesting that the deletion of *Wnt4* did not alter the balance between canonical and JNK-dependent non-canonical signaling in the absence of other exogenous ligands.

However, macrophage function is regulated not only by JNK, but also other members of the Mitogen-activated protein kinase (MAPK) family, such as the Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) (Traves et al., 2012, Papa et al., 2019). Unlike JNK, there was a notable decrease in ERK1/2 phosphorylation in *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* BMDM (Fig. 2.1F, 2.1G). *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* BMDM also showed a decreased level of AKT phosphorylation on Thr308 (Fig. 2.1H, 2.1I), suggesting that these signal transduction pathways are altered in these cells. Nevertheless, phosphorylation of the mTORC2-dependent site in AKT (Ser473) (Fig. 2.1J), as well as that of the mTORC1 downstream effectors S6 (Ser235/236) (Fig. 2.1K) and 4EBP1(Thr37/46) (Fig. 2.1L) was not affected in *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* BMDM, indicating that Wnt4 regulates ERK1/2 and AKT signaling independently from the mTORC axis.

Considering the dual roles of ERK1/2 and AKT in cell proliferation and metabolism (Yu and Cui, 2016, Altomare and Khaled, 2012, Cargnello and Roux, 2011), we further evaluated the proliferative state of *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* BMDM using Ki-67. Ki-67 expression was not significantly changed in *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* BMDM compared to control (Fig. 2.1M), which together with the comparable cell counts (Fig. 2.1B) suggests that Wnt4 does not affect BMDM proliferation. However, impaired ERK1/2 and AKT (Thr308) activation prompted us to further investigate the functional consequences of Wnt4 deletion on BMDM metabolism.

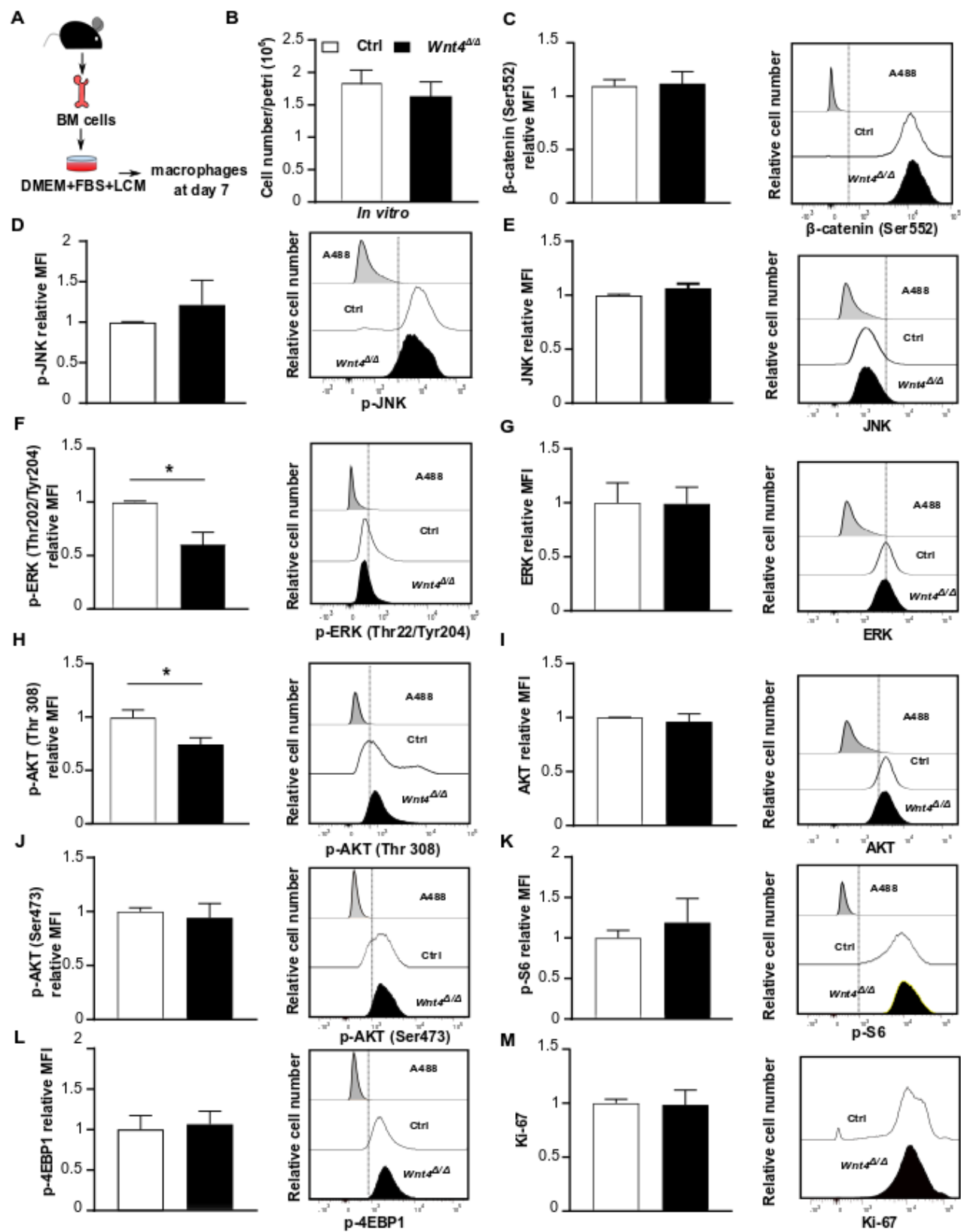




Figure 2.1 Endogenous Wnt4 promotes AKT (Thr308) and ERK1/2 phosphorylation in macrophages.

A. Bone marrow-derived macrophage (BMDM) differentiation. B. Number of macrophages collected after 7 days of differentiation in culture. C-M. Relative mean fluorescence intensity (MFI) of C. phospho- $\beta$ -catenin (Ser522), D. phospho-JNK (Thr183/Tyr185), E. JNK, F. phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr 204), G. ERK1/2, H. phospho-AKT (Thr308), I. AKT, J. phospho-AKT (Ser473), K. phospho-S6 (Ser235/Ser236), L. phospho-4EBP-1(Thr37/Thr46), M. Ki-67 in unstimulated BMDM. The histograms represent compiled data from 3-8 animals per group (mean+ SEM). \* $P < 0.05$  (two-tailed, paired student's *t*-test).

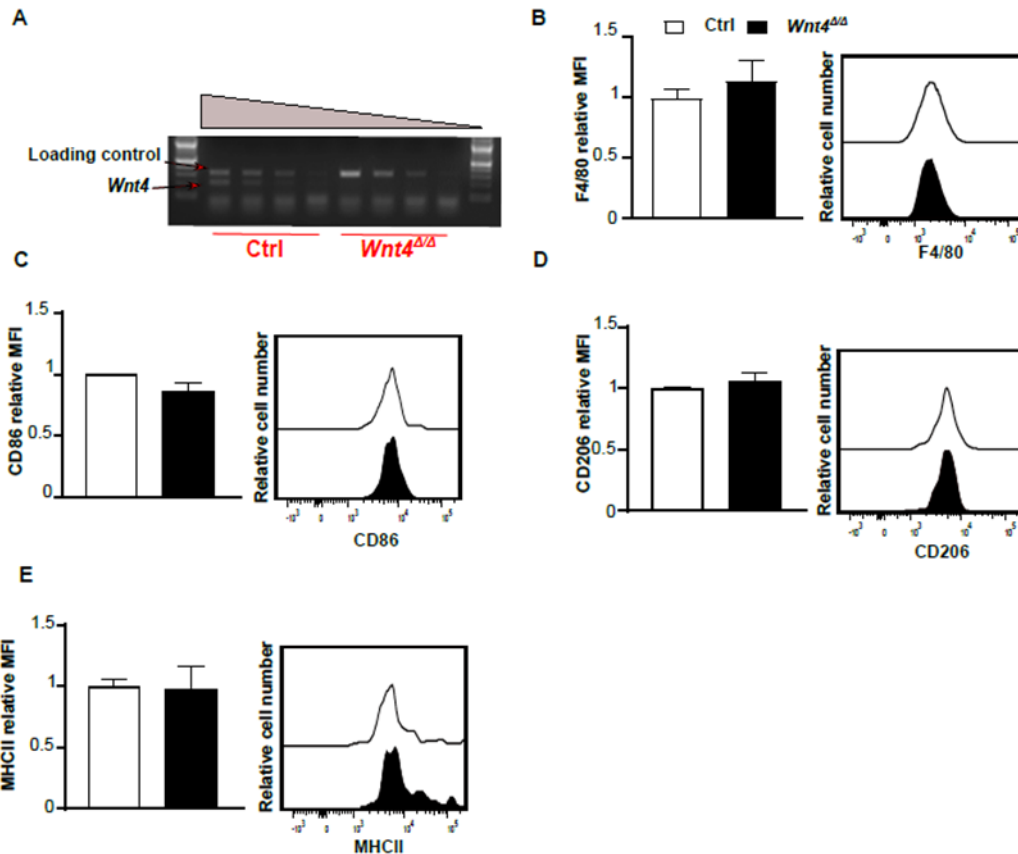


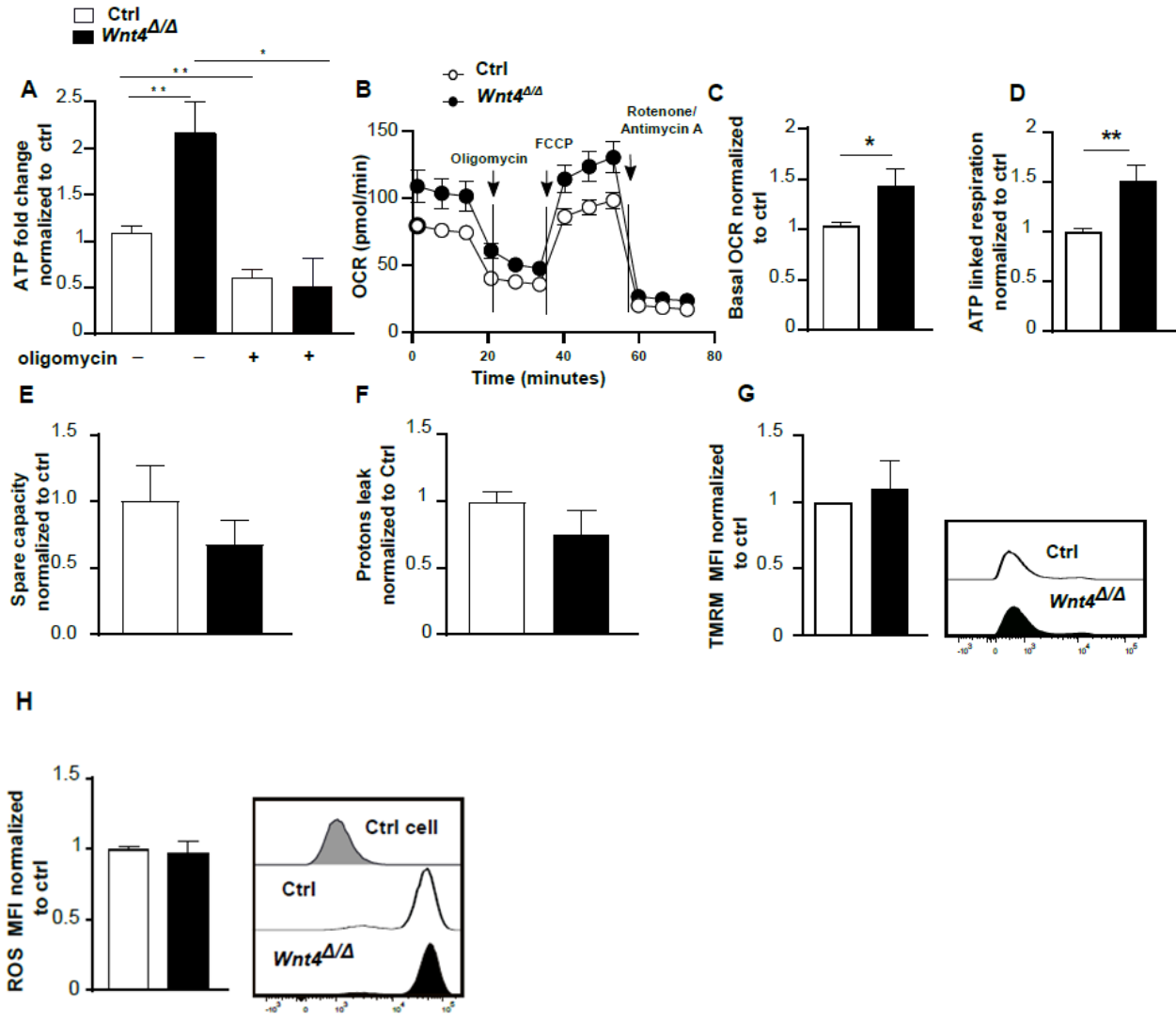
Figure 2.2 Loss of Wnt4 does not significantly alter resting macrophage phenotype

A. Semi-quantitative PCR for Wnt4 allele (middle band) and internal control (top band) in BMDM. Bottom bands represent primer dimers. B-E. Relative mean fluorescence intensity (MFI) of B. F4/80, C. CD86, D. CD206 and E. MHCII staining of unstimulated BMDM. The histograms represent compiled data from 4-6 animals per group (mean + SEM) (two-tailed, paired student's *t*-test).

### 2.3.2 *Wnt4* deficiency increases ATP production through oxidative phosphorylation

To address the impact of *Wnt4* on macrophage metabolism, we first investigated their energy balance. *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM had higher ATP levels relative to control cells (Fig. 2.3A), although they were decreased to similar levels in both genotypes upon inhibition of the ATP synthase with oligomycin. As this suggests that OXPHOS is increased in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM, we then measured oxygen consumption rate (OCR) in control and *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM. Consistent with *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM having increased OXPHOS activity, basal OCR was significantly increased in these cells (Fig. 2.3B, 2.3C). ATP-linked respiration was also increased in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM (Fig. 2.3D) further supporting a role for OXPHOS in the elevated cellular ATP levels observed in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM. On the other hand, the spare capacity (a measure of the ability of mitochondria to respond to an increased energy demand) (Fig 2.3E) and leak (a measure of how much protons can diffuse through the inner membrane) (Fig 2.3F) were similar between the two genotypes. In addition, mitochondrial membrane potential (Fig 2.3G) and mitochondrial ROS level in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM were comparable to controls (Fig 2.3H). Altogether, our results indicate that mitochondria in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> cells have increased flux through the electron transport chain and ATP synthase without major impairment in mitochondrial function.

We then determined if the functional changes we observed in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM were associated with changes in mitochondrial structure. We first stained mitochondria in control and *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM macrophages for the mitochondrial outer membrane protein TOM20 and imaged them by confocal microscopy (Fig. 2.3I). While control BMDM had on average very short mitochondria, we observed a significant increase in intermediate mitochondria in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM (Fig. 2.3J). Mitochondrial elongation and increased OXPHOS can be associated with changes in cristae structure, the folds of the inner membrane where the electron transport chain resides. We thus used electron microscopy to evaluate cristae width in control and *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM. *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM had tighter cristae than their control counterparts (Fig. 2.3K), suggesting improved OXPHOS efficiency. On the other hand, there was no difference in mitochondrial mass as measured by citrate synthase activity (Fig. 2.3L) or Tom20 immunoblotting (Fig. 2.3M). In sum, these findings indicate that *Wnt4* controls mitochondrial activity without altering mitochondrial mass.



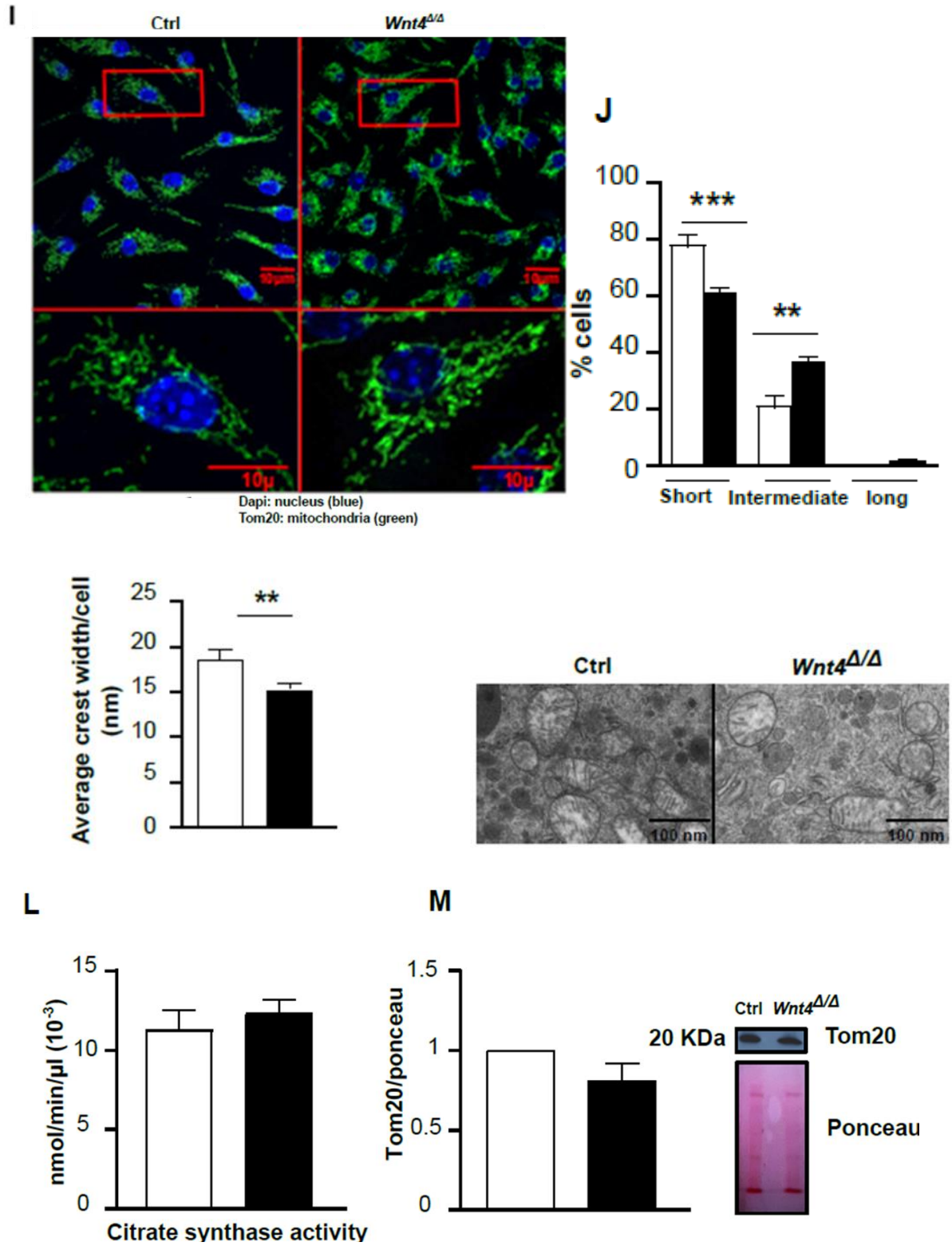
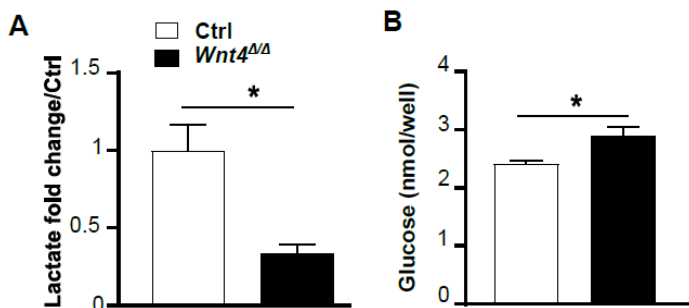


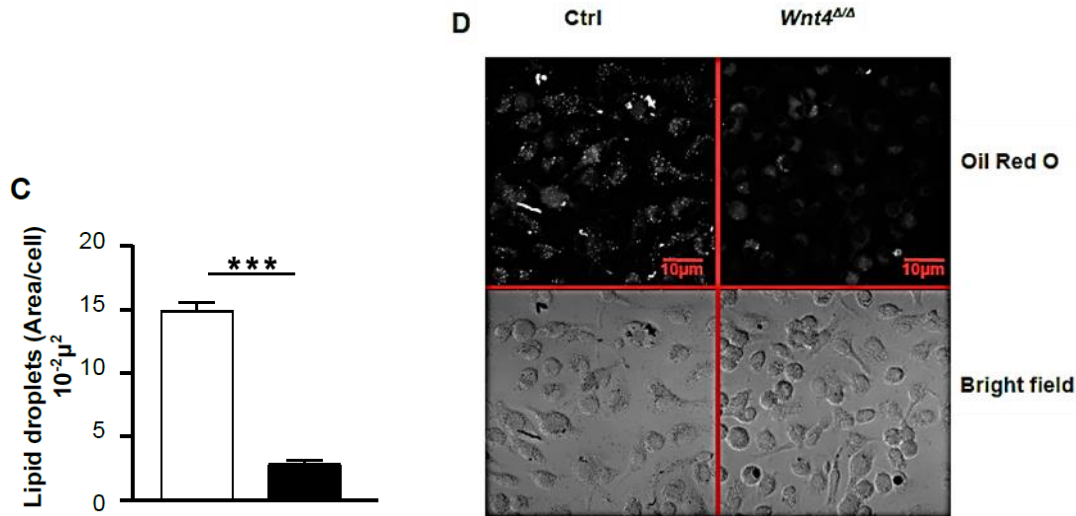
Figure 2.3 *Wnt4* deletion increases mitochondrial energy metabolism

A. Intracellular ATP  $\pm$  oligomycin. B. Representative oxygen consumption rate (OCR) curves. C. Basal OCR normalized to control. D. ATP linked-respiration (OCR after oligomycin injection - basal OCR). E. Spare respiratory capacity (OCR after FCCP injection - basal OCR). F. Proton leak (OCR after oligomycin injection - OCR after rotenone/antimycin A injection). G: Measure of mitochondrial membrane potential as determined by relative TMRM MFI. H: Mitochondrial ROS production as measured by relative Mitosox MFI. I. Confocal microscopy images of BMDM, staining for mitochondria (green: TOM20, blue: nucleus, 60X). J. Analysis of mitochondrial length, represented as proportion of BMDM with predominantly short, intermediate, or long mitochondria. K. Mitochondrial crest width, represented as average width/cell from 10 individual cells per condition by ImageJ software. Representative transmission electron microscopy images are shown below (20 000X). L. Intracellular citrate synthase activity. H. Quantification and representative immunoblot for TOM20. The histograms represent compiled data from 3-6 animals per group (mean + SEM). \* $P < 0.05$  (two-tailed, unpaired student's *t*-test (figures 2.3C, 2.3D, 2.3E, 2.3F, 2.3G, 2.3H, 2.3K, 2.3L, 2.3M) or *one-way anova* (figures 2.3A, 2.3J)

### 2.3.3 Lipolysis is enhanced in *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* macrophages

As our results suggest that the increased OCR and ATP levels observed in *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* BMDM is the consequence of increased metabolic flow through OXPHOS rather than a major change in mitochondrial structure, we then analysed the potential substrates supporting OXPHOS in these cells. *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* BMDM showed a substantial decrease in lactate production (Fig. 2.4A), which was associated with a smaller but significant reduction in glucose usage (Fig. 2.4B). While these results are consistent with the greater OXPHOS activity we observed, they also suggest that glucose is not the major source of metabolic intermediates supporting enhanced mitochondrial activity in *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* BMDM. In contrast, there was a drastic reduction in the lipid droplets present in *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* BMDM relative to WT cells, as measured by Oil Red O staining (Fig. 2.4C, 2.4D), suggesting that fatty acids (FA) could be the carbon source fueling the increased OXPHOS in these cells.





**Figure 2.4** **Wnt4 deletion decreases glycolysis and intracellular lipid storage.**

**A.** Glucose remaining in culture media. **B.** Total lactate (intracellular + extracellular). **C.** Quantification of lipid droplets as determined by the area of Oil Red O staining per cell with ImageJ software. **D.** Representative confocal microscopy images showing Oil Red O signal in BMDM (60X). The histograms represent compiled data from 3-8 animals per group (mean + SEM). \* $P < 0.05$  (two tailed, student's *t*-test).

Lipid droplets store triglycerides that must be hydrolyzed to liberate FA to be used by  $\beta$ -oxidation within mitochondria. As lysosomal acid lipase (LAL) is one of the key enzymes that cells use to liberate FA from lipid droplets (Remmerie and Scott, 2018, Singh et al., 2016), we measured its activity in WT and *Wnt4* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  BMDM. Consistent with the reduction in lipid droplets, LAL activity was increased two-fold in *Wnt4* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  BMDM as compared to controls (Fig. 2.5A). This was not due to an increase in the overall lysosomal content as we did not observe any change in the activity of the lysosomal protease Cathepsin B (Fig. 2.5B) or the expression of the lysosomal membrane protein LAMP-1 (Fig. 2.5C).

As autophagy has been implicated in LAL-dependent lipid metabolism in macrophages (Ouimet et al., 2011), we assessed autophagy flux with the membrane autophagosome marker, LC3. Although we observed a decrease in the number of LC3 puncta in *Wnt4* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  BMDM that was partially rescued with bafilomycin treatment (Fig. 2.5D, 2.5E), there was no significant increase in the ratio of LC3 puncta (treated/untreated) (Fig. 2.5F) between *Wnt4* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  BMDM and controls, indicating that the autophagic flux was not enhanced in *Wnt4* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  BMDM. Put together, these data point towards increased lipid degradation by LAL in *Wnt4* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  BMDM, irrespective of alterations in autophagy.

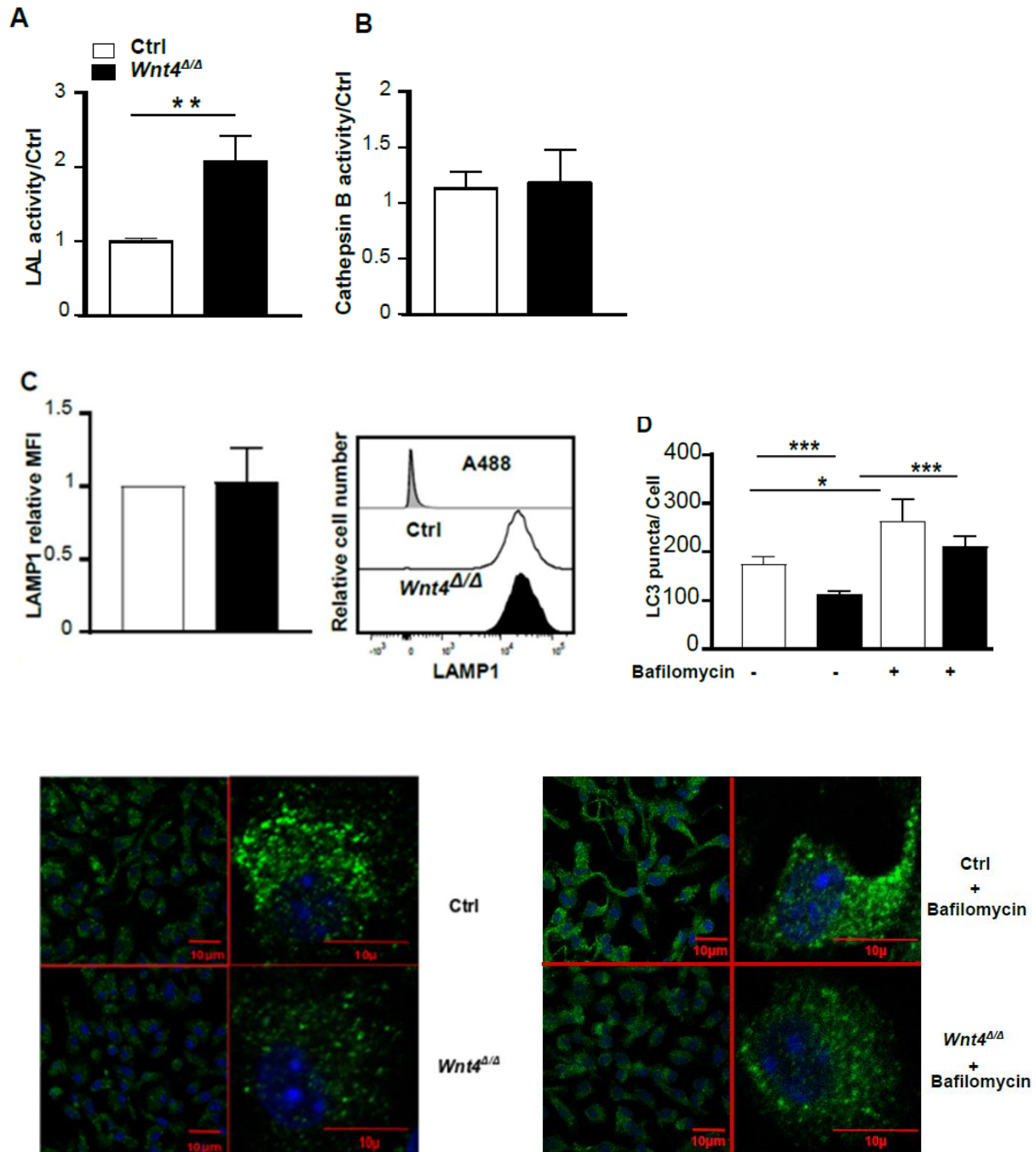


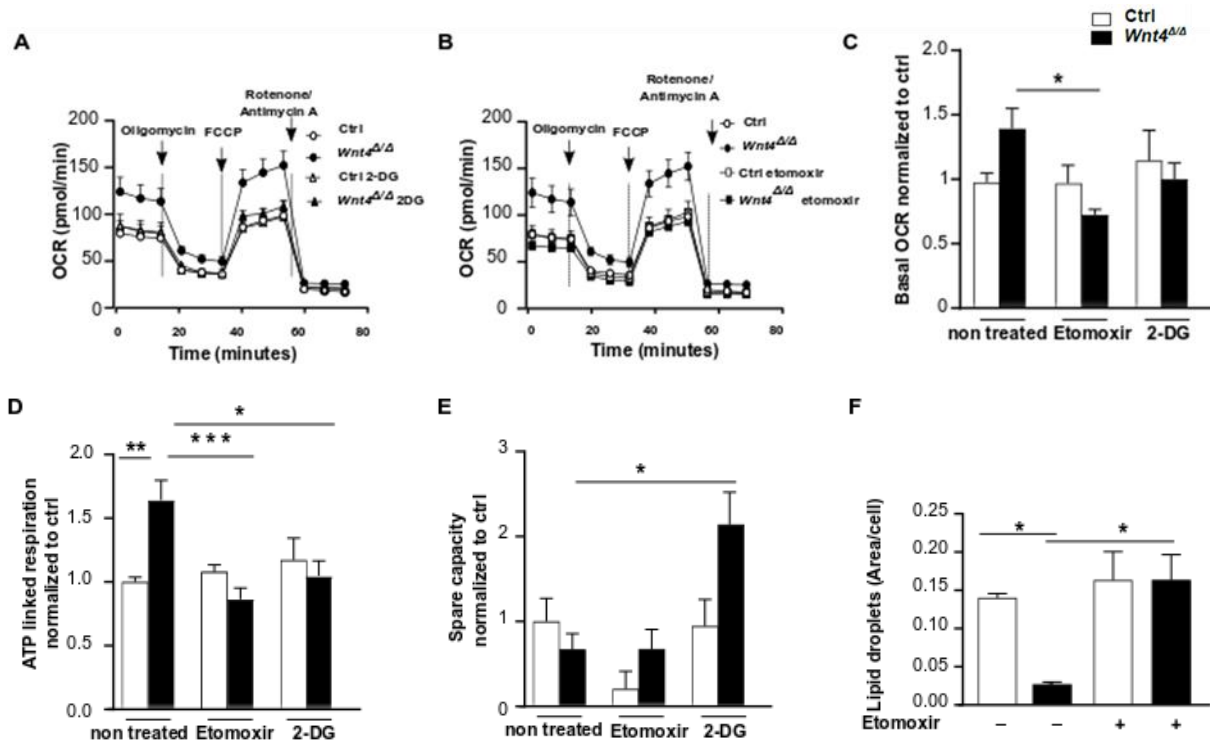
Figure 2.5 Autophagy is not involved in lysosomal lipolysis in Wnt4-deficient BMDM

A. Lysosomal acid lipase (LAL) activity, normalized to controls. B. Cathepsin B activity, normalized to controls. C. Quantification of lysosomes as determined by relative LAMP-1 MFI. C. Quantification of LC3 puncta per cell  $\pm$  bafilomycin (100nmol) with ImageJ software. D. Quantification of LC3puncta/LC3 puncta + bafilomycin ratio to evaluate autophagy flux. E. Representative confocal microscopy images of BMDM, staining for autophagosomes (green: LC3, blue: nucleus, 60X).



### 2.3.4 *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM show increased β-oxidation

Decreased glucose consumption and decreased lipid storage support the hypothesis of fatty acid oxidation as a major source of energy in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM. To more directly evaluate the relative importance of each carbon source, we inhibited glycolysis with 2-DG or fatty acid transport into mitochondria using etomoxir. We then measured OCR in otherwise unstimulated and non-polarized macrophages, similar to Fig. 2. Control BMDM showed very little alteration in their basal OCR in response to blocking either one of the two pathways (Fig. 2.6A-2.6C), likely reflecting their relatively low level of metabolic activity in the absence of stimulation (Van den Bossche et al., 2015). Consistent with β-oxidation providing the extra carbon source to fuel OXPHOS in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> cells, etomoxir significantly decreased basal OXPHOS in these cells. Similarly, etomoxir significantly reduced ATP-linked OCR in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM but not in control BMDM (Fig. 2.6D), and it also increased the spare capacity of *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM but not of control cells (Fig. 2.6E). This coincided with an increase in Oil Red O staining in etomoxir-treated *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM, restoring their lipid droplets to control levels (Fig. 2.6F-2.6H) and further supports a role for β-oxidation in the metabolic changes observed in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM. Nevertheless, 2-DG did decrease ATP-linked OCR in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM (Fig. 2.6A-2.6C) suggesting that glycolysis can also contribute to their altered energy metabolism. Altogether, these results indicate that the loss of Wnt4 stimulates the usage of lipids as an important source of energy.



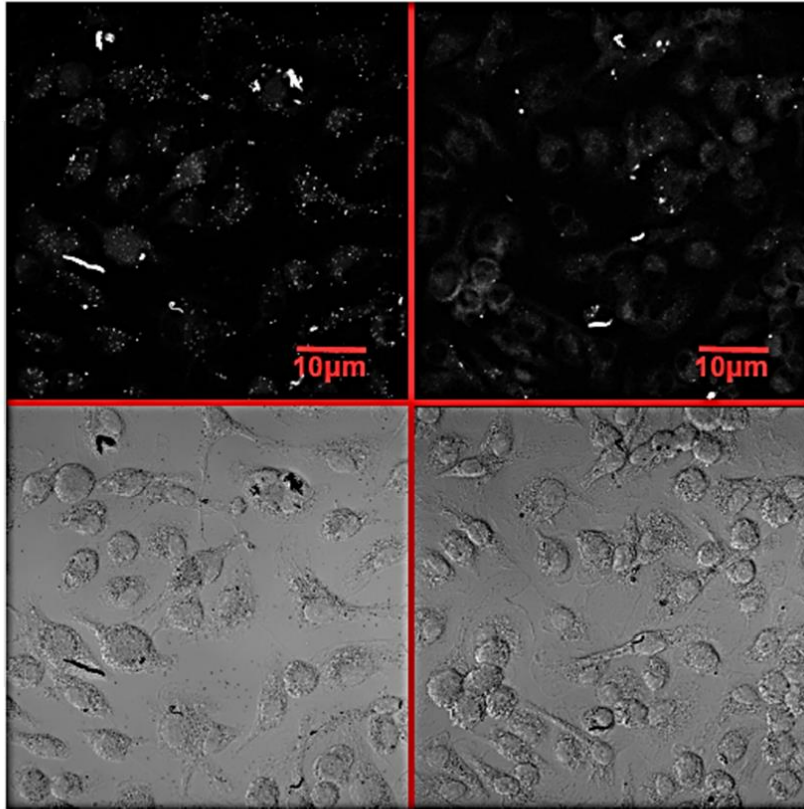


**G**

**Ctrl**

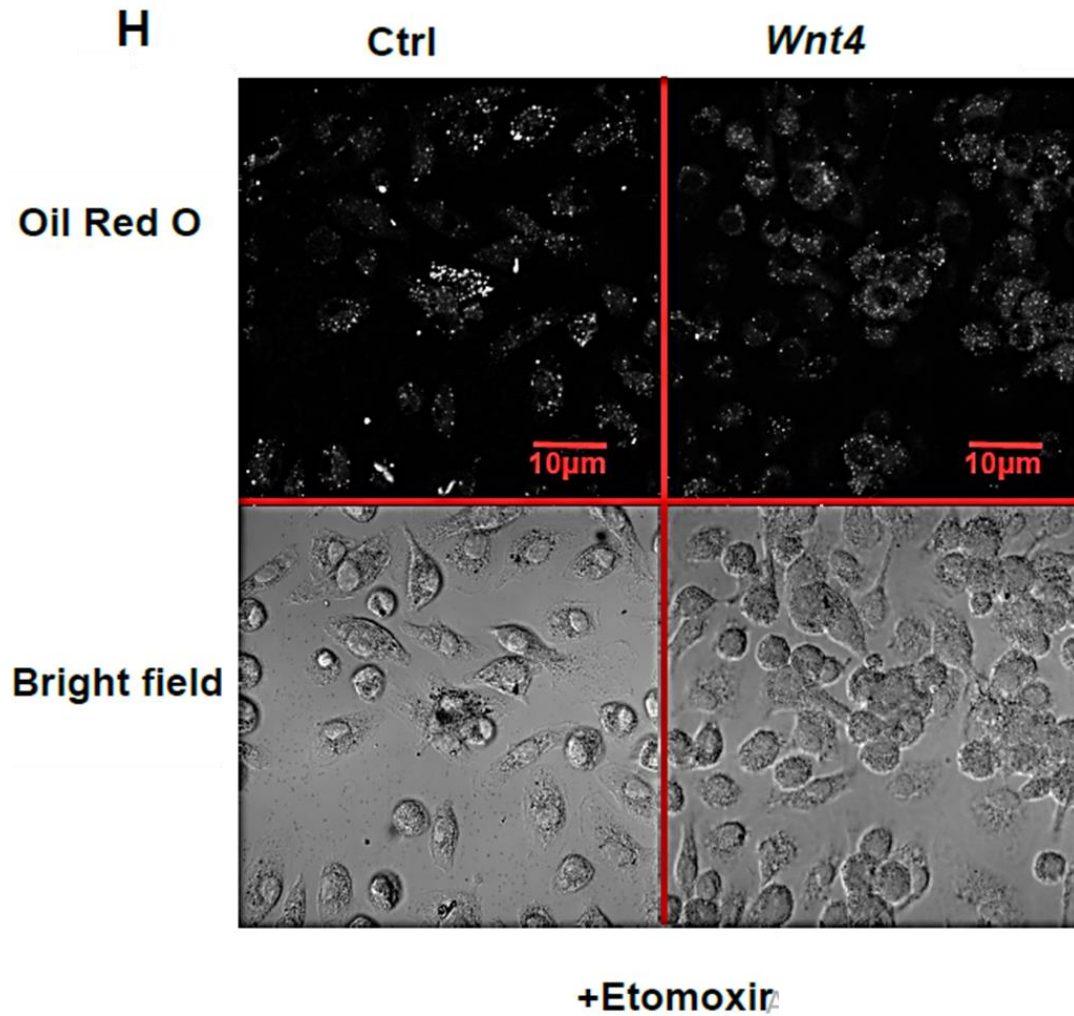
***Wnt4***

**Oil Red O**



**Bright field**

**- Etomoxir**



**Figure 2.6** Wnt4 deletion enhances  $\beta$ -oxidation

A, B. Representative oxygen consumption rate (OCR) curves for BMDM pre-treated or not with A. 2-DG (5mM) to block glycolysis and B. etomoxir (250 $\mu$ M) to block  $\beta$ -oxidation. C-E. Quantification of C. Basal OCR, D. ATP-linked respiration, and E. Spare respiratory capacity with and without 2-DG or etomoxir. F. Quantification of Oil Red O positive area per cell  $\pm$  etomoxir. G, H. Representative confocal microscopy images of Oil Red O signal in BMDM  $\pm$  etomoxir (60X). The histograms represent compiled data from 6 animals per group (mean + SEM). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , (two-tailed, paired student's *t*-test).

### 2.3.5 *Wnt4* is not required for the inflammatory response induced by LPS stimulation

Thus far we have established that *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM have higher ATP levels, mostly as a consequence of increased mitochondrial FAO, which has been generally associated with macrophage polarization to an M2 profile (Namgaladze and Brune, 2016, Remmerie and Scott, 2018). However, flow cytometry analysis revealed no significant differences in the expression of M1 (CD86, MHCII) or M2 surface markers (CD206) between unstimulated *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> and control BMDM (Supplementary Fig. 2.2C-2.2E). There was also no difference in Cathepsin B activity, the most abundant lysosomal protease (Cavallo-Medved et al., 2011), whose activity has been shown to be increased in M2 macrophages (Oelschlaegel et al., 2020) (Fig. 2.5B). In summary, the metabolic differences in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM did not appear to result in an inherent bias in unstimulated cells.

Lipopolysaccharide (LPS) is a Toll-like receptor 4 (TLR4) agonist that is widely used to promote the secretion of pro-inflammatory cytokines by macrophages (Park and Lee, 2013). Moreover, LPS-treated macrophages reduce their oxygen consumption and adopt a strongly glycolytic profile (Liu et al., 2016). We thus stimulated *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> and control BMDM with LPS to determine if the metabolic differences in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM were reversible. There was a strong suppression of OCR in LPS-treated *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM, with basal OCR decreasing even slightly below levels detected in LPS-treated controls (Fig. 2.7A, 2.7B). Unsurprisingly, this also corresponded to a significant decrease in ATP-linked respiration (Fig. 2.7C), indicating that LPS inhibits mitochondrial activity in both *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> and control BMDM. Similarly, extracellular acidification rate (ECAR) was increased to similar levels in LPS-treated *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> and control BMDM, suggesting an increase in lactate production (Fig.2.7D). These data indicate that the LPS-induced metabolic switch to glycolysis was not impaired in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM.

To further evaluate their inflammatory potential, we measured nitric oxide (NO) and TNF $\alpha$  production in culture supernatants with and without LPS stimulation. *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM produced slightly more NO (Fig. 2.7E) and similar levels of TNF $\alpha$  (Fig. 2.7F) upon LPS stimulation as their normal counterparts, confirming that their response to a strong pro-inflammatory stimulus was not negatively affected by the metabolic alterations seen at steady state.

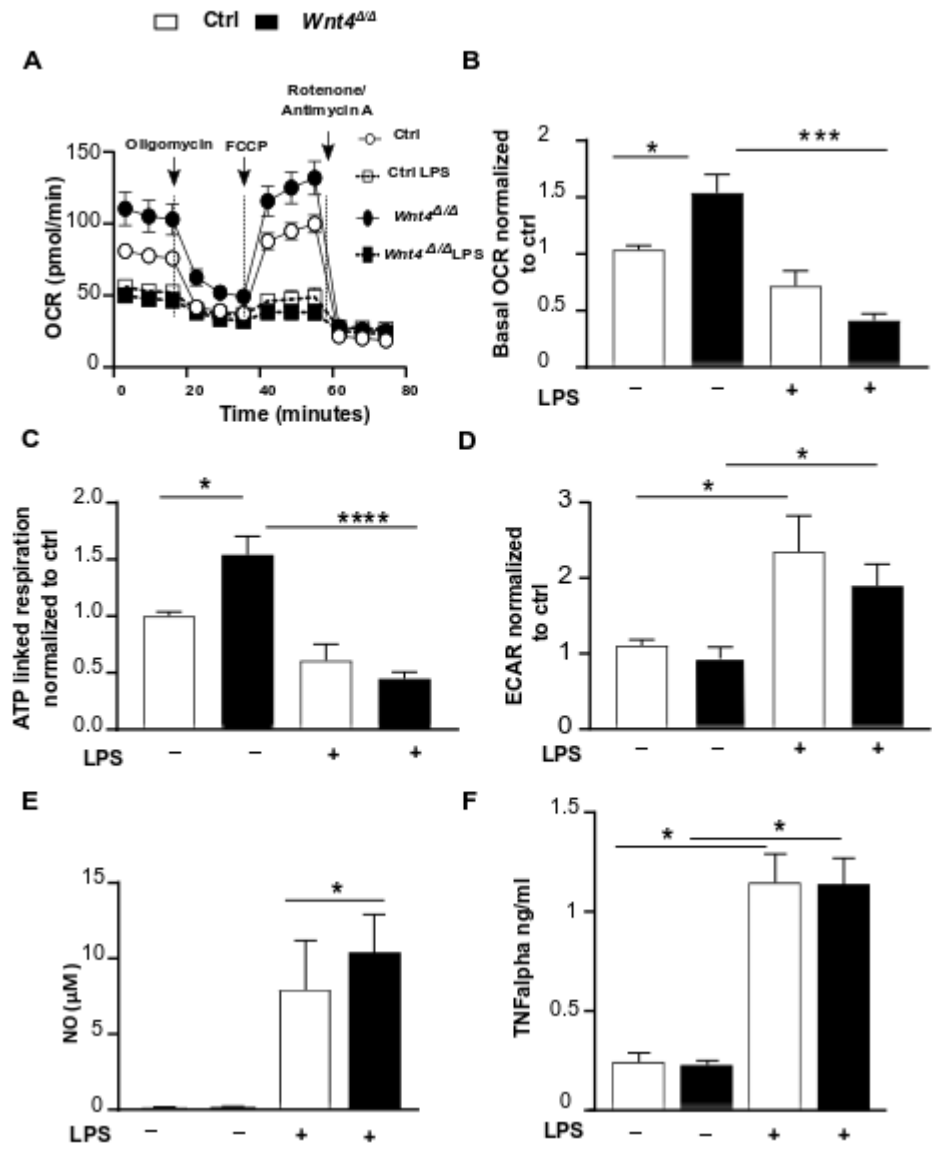


Figure 2.7 *Wnt4 $\Delta/\Delta$*  BMDM mount a strong metabolic and pro-inflammatory response to LPS.

A. Representative oxygen consumption rate (OCR) curves for BMDM pre-treated or not with LPS (100ng/ml). B-D. Quantification of B. basal OCR, C. ATP-linked respiration, and D. extracellular acidification rate (ECAR) in BMDM  $\pm$  LPS. E. Measure of nitric oxide (NO) in culture supernatants after 48h stimulation with LPS. F. Secretion of TNF $\alpha$  in culture supernatant. The histograms represent compiled data from 3-8 animals per group (mean + SEM). \*P<0.05, \*\*P<0.005, \*\*\*P<0.0005 (two-tailed, student's *t*-test).

### 2.3.6 Wnt4 deficiency promotes *Leishmania donovani* growth

Metabolic alterations in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM did not prevent their LPS-induced polarization and glycolytic switch. If anything, the response *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM was even stronger than controls (Fig. 2.7A, 2.7E). To evaluate if *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM were predisposed to respond more strongly to other stimuli, we investigated their response in a more physiologically relevant context following a parasitic infection.

Macrophages are the principal hosts of the intracellular parasite *Leishmania*, and are indispensable for their survival and replication (Liu and Uzonna, 2012). Importantly, macrophage polarization toward an M2 profile promotes *L. major*, *L. amazonensis*, *L. donovani* and *L. infantum* growth (Farrow et al., 2011, Abebe et al., 2013, Kumar et al., 2018). Although *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM appeared to produce NO more rapidly than their *Wnt4*<sup>+/+</sup> counterparts when exposed to *L. donovani* promastigotes, reaching detectable levels at 24h post-infection as compared to 72h for infected controls (Fig. 2.8A), the amounts remained negligible when compared to a stimulation with LPS. Moreover, TNFα expression was reduced in time in a comparable manner in both control and *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM (Fig.2.8B). Most importantly, however, parasite number was increased in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM over time (Fig. 2.8C, 2.8D). These results indicate that although the metabolic alterations in the absence of Wnt4 were not irreversible, *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM were more permissive to infection and favored parasite replication, consistent with a bias toward an M2 macrophage fate. Altogether, our results indicate that although the metabolic alterations present in the absence of Wnt4 were not irreversible, *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BMDM were more permissive to infection and favored *L. donovani* replication, consistent with a bias toward an M2 macrophage fate.

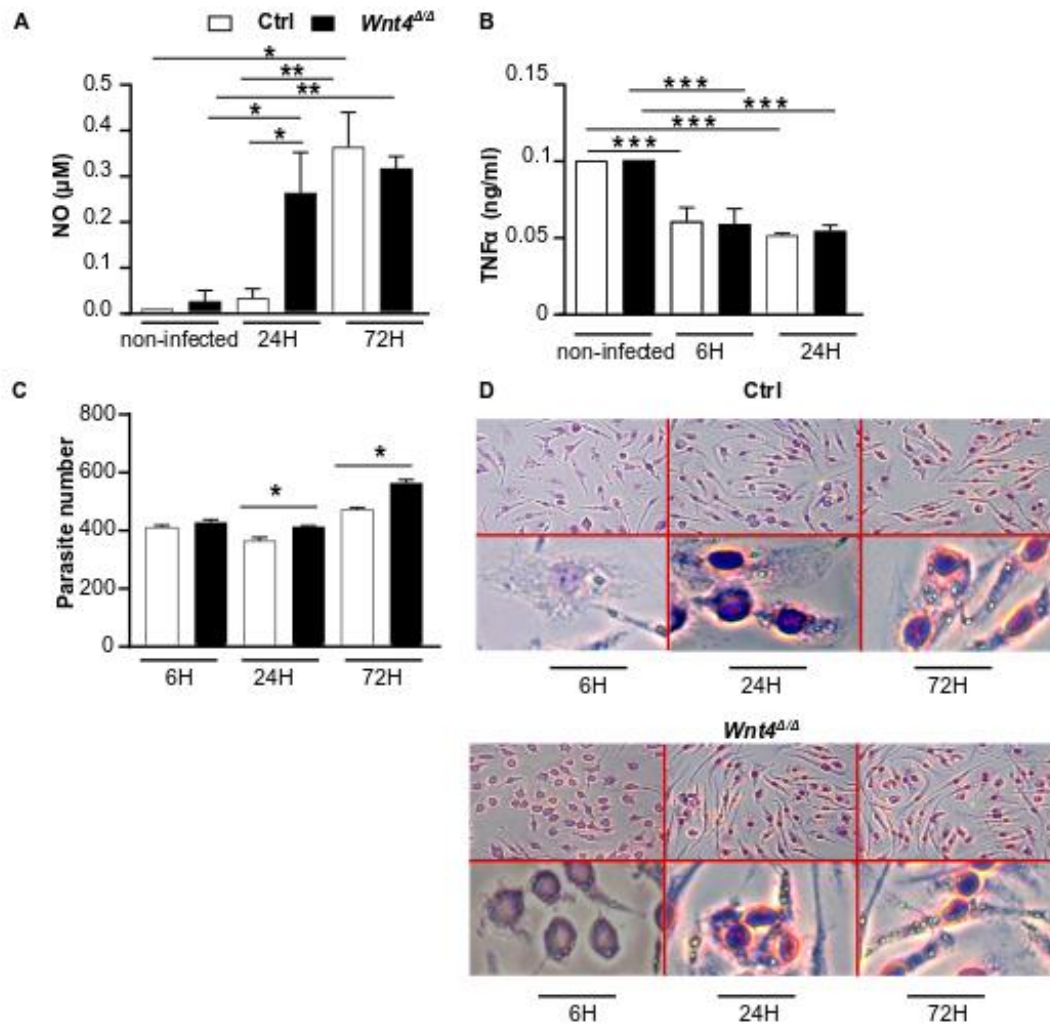


Figure 2.8 *Wnt4* deletion promotes *Leishmania donovani* survival

BMDM were infected with *L. donovani* promastigotes and supernatants were collected at 24h and 72h post-infection. Measure of A. NO and B. TNF- $\alpha$  production in the supernatants. C. Parasite numbers per 100 cells as counted from Giemsa-colored slides. D. Microscopy images of infected BMDM at different time points. The histograms represent compiled data from 5 animals per group (mean + SEM) \*P<0.05, \*\*P<0.005, \*\*\*P<0.0005 (two-tailed, unpaired student's *t*-test).

## 2.4 Discussion

The physiological role of individual Wnt ligands remains enigmatic in a large number of situations due to their often promiscuous signaling. Although the most studied ligands are widely used as prototypes of canonical (Wnt3a) and noncanonical Wnt signaling (Wnt5a), individual Wnt proteins are often able to activate more than one signaling pathway, depending on cell type and receptor availability (Mikels and Nusse, 2006a, Grumolato et al., 2010). We report here a new role for the (mostly) noncanonical ligand Wnt4 in regulating BMDM metabolism using LysM-Cre-mediated conditional gene deletion. Our results show that Wnt4 influences AKT (Thr308) and ERK1/2 activation and regulates mitochondrial ATP production without impacting mitochondrial mass. We also demonstrate that lipids represent the principal fuel for mitochondria in *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* BMDM. Wnt4-deficient BMDM were not irreversibly polarized and remained responsive to metabolic reprogramming with LPS. However, they were more permissive to infection with the intracellular parasite *L. donovani*, suggesting that the metabolic alterations in *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* BMDM predisposed them towards an anti-inflammatory M2-like fate.

Wnt4 is mostly associated with the noncanonical Wnt/polarity pathway, acting via JNK signaling, in hematopoietic cells (Chen et al., 2018b, Heinonen et al., 2011b, Hung et al., 2019a). However, we did not observe a significant change in JNK phosphorylation in *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* BMDM (Fig. 1C, 1D). It is possible that JNK activity could be maintained in this setting through a compensatory mechanism by other noncanonical Wnts, such as Wnt5a. Exogenous stimulation of BMDM by Wnt5a is sufficient to induce the phosphorylation of JNK (Schaale et al., 2011). However, it must be also noted that JNK is involved in multiple pathways, and our analysis was done on asynchronized cultures, which could mask mild changes in activity in the absence of exogenous stimulation. While JNK activation appeared normal, *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* BMDM displayed reduced ERK1/2 and AKT (Thr308) phosphorylation (Fig. 1E-1H). AKT and ERK signaling is simultaneously activated by a number of stimuli (Cao et al., 2019), including macrophage colony-stimulating factor CSF-1 used for BMDM differentiation in culture (Huynh et al., 2012). Although there was no significant difference in the number or phenotype of differentiated BMDM based on most conventional macrophage markers, we cannot completely exclude the potential influence of CSF-1/CSF-1R signaling on decreased AKT and ERK phosphorylation in *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* BMDM. For example, Wnt3a and CSF-1 are both required for proper BMDM proliferation (Feng et al., 2018).

The importance of ERK and AKT in regulating cell metabolism is well established (Robey and Hay, 2009, Lien et al., 2016, Traves et al., 2012, Ozaki et al., 2016). Both promote the Warburg effect in cancer cells (Chen et al., 2016, Danhier et al., 2017, Papa et al., 2019), which consists

in the preferential production of ATP via glycolysis under aerobic conditions (Cassim et al., 2020, Hsu and Sabatini, 2008). AKT stimulates glycolysis by inducing the expression of membrane glucose transporters and by phosphorylating key glycolytic enzymes, such as hexokinases and phosphofructokinase (Elstrom et al., 2004, Gottlob et al., 2001). Similarly ERK1/2 promotes glucose uptake and lactate production through phosphorylation of pyruvate kinase M2 (Papa et al., 2019, Zhang et al., 2019c, Yang et al., 2012). Decreased AKT and ERK1/2 activity would thus favor OXPHOS instead of glycolysis. Indeed, we observed an increase in ATP production in *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* BMDM (Fig. 2A), which corresponded to increased mitochondrial activity (Fig. 2B) and decreased spare respiratory capacity (Fig. 2E). The capacity of mitochondria to meet an additional energy demand, as measured by the spare respiratory capacity, could be used as readout of the functionality of electron transport chain complexes and/or the integrity of the inner mitochondrial membrane (Nguyen et al., 2016, Marchetti et al., 2020). However, there was no significant change in mitochondrial ROS levels, mitochondrial mass, or appearance in *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* BMDM (Fig 2F-2I), suggesting that the decrease in spare capacity was more likely the result of sustained mitochondrial activity and rapid oxygen consumption rather than decreased mitochondrial fitness.

Perhaps not unsurprisingly considering the influence of ERK1/2 and AKT on glycolysis, *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* BMDM relied on lipid degradation and FAO to support their mitochondrial activity. *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* macrophages contained less intracellular lipid droplets, and displayed an increased LAL activity (Fig. 3C, 3D, 4A). Lipophagy can be activated in prolonged starvation to promote breakdown of lipid droplets (Saito et al., 2019, Singh and Cuervo, 2012, Kounakis et al., 2019). However, there was no apparent change in autophagy flux in *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* BMDM (Fig. 4C, 4D), suggesting that lipid degradation was not due to enhanced autophagy. Macrophages have been shown to be able to use alternative mechanisms, such as exophagy, or the formation of extracellular acidified compartments that communicate with lysosomes to degrade lipoprotein aggregates (Singh et al., 2016, Haka et al., 2009). Although it is not clear if a similar mechanism could operate in *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* BMDM, it is nevertheless clear that blocking FAO not only restored intracellular lipid droplets but also reverted their mitochondrial activity and spare respiratory capacity to levels that were comparable to normal controls, indicating that lipids are likely the principal substrate used to intensify mitochondrial activity in the absence of Wnt4.

Lipids are important for macrophage function, including phagocytosis, functional polarization and production of inflammatory mediators (Yan and Horng, 2020, Cader et al., 2016, Huang et al., 2014). Although FAO activity is largely associated with an anti-inflammatory profile (Van den Bossche et al., 2017), *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* BMDM are not irreversibly committed. They remain entirely capable



of responding to a strong pro-inflammatory stimulus, such as LPS, and reducing their mitochondrial activity and shifting to glycolysis (Fig. 6A-6D) (Van den Bossche et al., 2017). Their metabolic switch to  $M_{LPS}$  was further corroborated by the production of inflammatory mediators, such as NO and TNF $\alpha$  (Fig. 6E, 6F). However, *Wnt4* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  BMDM were more permissive to infection by *L. donovani*, suggestive of an underlying M2 bias (Fig. 7C, 7D). Macrophages are the natural mammalian host cells for *Leishmania* parasites, and the pathogen has developed multiple strategies to evade their microbicidal effects (Muxel et al., 2017, Arango Duque and Descoteaux, 2014). One such strategy *in vivo* is the generation of monocyte-derived myeloid cells with an M2-like profile that will promote parasite growth (Hammami et al., 2017, Abidin et al., 2017). Our results are well in line with this theory and demonstrate that the metabolic alterations in *Wnt4* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  BMDM have functional consequences.

In conclusion, our results identify a cell-intrinsic role for Wnt4 in regulating macrophage metabolism. Wnt4 deficiency disturbs energy homeostasis by increasing mitochondrial ATP production mainly through fatty acid oxidation. Although Wnt4-deficient macrophages demonstrate a strong pro-inflammatory response to LPS, they were more susceptible to support the growth of an intracellular pathogen. These results demonstrate that noncanonical Wnt4 signaling regulates macrophage function and modulates their metabolism in a context-dependent manner. Further mechanistic and metabolic investigations may be helpful to identify how the Wnt4 pathway could be best harnessed to promote the control of intracellular infections or modulate macrophage metabolism and polarization.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC Discovery grants #419226-2012 and #2018-05258). KMH is a FRQS Junior Research Scholar. AD holds the Canada Research Chair on the Biology of intracellular parasitism.

### **Author contributions**

MT: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Visualization, Writing – original draft

HA: Investigation

AD: Resources, Writing – review & editing

MG: Conceptualization, Resources, Writing – review & editing

KMH: Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing

## Lien entre les deux projets

Le premier article a démontré que la délétion de Wnt4 dans les macrophages dérivés de la moelle osseuse intensifie leur métabolisme énergétique à l'état basal et module leur fonction dans les contextes étudiés, notamment lors d'une stimulation inflammatoire et d'une infection parasitaire par *leishmania donovani*.

Etant donné que les macrophages de la moelle osseuse jouent un rôle dans le maintien des cellules souches hématopoïétiques au sein de la niche hématopoïétique d'une part, et que d'autre part ils sont la descendance de ces mêmes cellules, nous nous sommes orientés vers l'étude de l'impact de Wnt4 sur la fonction des cellules souches hématopoïétiques.

Dans cette optique, dans le deuxième article nous avons tenté de répondre aux questions suivantes :

- 1- Est-ce que la délétion de Wnt4 dans les cellules souches hématopoïétiques influence leurs fonctions d'autorenouvellement et de différenciation à l'état basal ainsi que lors de stress réplicatifs tels que les greffes en série et l'inflammation ?
- 2- Est-ce que la délétion de Wnt4 spécifiquement dans les macrophages affecte le maintien des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse ?

### **3 WNT4 MAINTIEN L'AUTORENOUVELLEMENT DES CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES**

---

**Titre de l'article :** Cell-intrinsic Wnt4 promotes hematopoietic stem and progenitor cell self-renewal

Wnt4 intrinsèque à la cellule favorise l'autorenouvellement des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques.

**Auteurs :**

\*Roxann Héту-Arbour, \*Mouna Tlili, Fabio Luiz Bandeira Ferreira, Belma Melda Abidin, Edward O. Kwarteng & Krista M. Heinonen

Institut national de la recherche scientifique, INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval, QC, Canada

**Titre du journal :** STEM CELLS

Accepté le 25 mars 2021, publié en ligne le 21 avril 2021

DOI : 10,100 2/stem.3385

**Contribution des auteurs :**

\*Ces auteurs ont contribué équitablement et les noms sont mis par ordre alphabétique

RA : Conception et réalisation des manipulations, interprétation des données et préparation des figures (les figures 1,2, 3 et 7 et les figures supplémentaires 1, 2, 3, 6, 7). Écriture de l'introduction et des matériels et méthodes.

MT : Conception et réalisation des manipulations, interprétation des données et préparation des figures (les figures 4, 5, 6 et 7 et les figures supplémentaires 4 et 6). Écriture des résultats, discussion, résumé et schéma résumé.

FLB : Réalisation de l'expérience des souris LysM Cre en absence et en présence de LPS (la figure 5)

BMA : Réalisation d'un certain nombre de greffes

EOK : Réalisation de l'expérience de la sénescence avec les souris adultes (figure 6H et 6I)

KMH : Conception et réalisation des manipulations, interprétation des données, support financier, correction et validation finale du manuscrit

## ABSTRACT

Although intracellular Wnt signaling pathways need to be tightly regulated to promote hematopoietic stem cell self-renewal, the source and identity of important Wnt ligands in the bone marrow is still largely unknown. The non-canonical ligand Wnt4 is expressed in the bone marrow as well as in the stroma, and its overexpression in fetal liver cells facilitates thymic recovery; however, its impact on hematopoietic stem cell function remains unclear. Here, we report that the deletion of Wnt4 from hematopoietic cells in mice (*Wnt4<sup>Δ/Δ</sup>*) resulted in decreased lymphopoiesis at steady state. This was likely at least in part due to the increased pro-inflammatory environment present in the bone marrow of *Wnt4<sup>Δ/Δ</sup>* mice. *Wnt4<sup>Δ/Δ</sup>* hematopoietic stem cells displayed reduced reconstitution capacity in serial transplants, thus demonstrating defective self-renewal, and they expanded poorly in response to lipopolysaccharide stimulation. This appeared to be the result of the absence of Wnt4 in stem/progenitor cells, as myeloid-restricted Wnt4 deletion had no notable effect. Finally, we observed that *Wnt4<sup>Δ/Δ</sup>* stem/progenitor cells were more quiescent, presenting enhanced levels of stress-associated JNK phosphorylation and p16<sup>INK4a</sup> expression, likely contributing to the reduced expansion observed in transplants.

In conclusion, our results identify a new, largely autocrine role for Wnt4 in hematopoietic stem cell self-renewal, suggesting that regulation of Wnt signaling in hematopoiesis may not need Wnt secretion and could be independent of morphogen gradients.

## SIGNIFICANCE STATEMENT

Blood cell production in the adult is ensured by a small number of stem cells residing in the bone marrow. These stem cells can be “turned on” and increase blood formation when needed by a combination of factors present in their environment together with others that are produced by the stem cells themselves. Our results identify the protein Wnt4 as a factor whose expression by the blood forming cells greatly favors their accumulation in a situation of intense blood cell production. Our data thus put forward Wnt4 as a candidate to promote blood cell production, for example, after chemotherapy.

### 3.1 Introduction

Hematopoietic stem cells (HSCs) give rise to all blood cells via different transitional states, conventionally defined as multipotent progenitors (MPPs) and lymphoid-primed multipotent progenitors (LMPPs) (Zhang et al., 2018, Laurenti and Gottgens, 2018, Hofer and Rodewald,

2018). The balance between HSC differentiation and self-renewal is maintained via multiple signals from the surrounding cells, including hematopoietic cells. These signals can become skewed toward myeloid lineage differentiation during inflammation and aging ("inflammaging"), promoting the activation and proliferation of myeloid-biased HSC clones, and resulting in decreased multilineage reconstitution in transplant assays (Chavakis et al., 2019, Dorshkind et al., 2020, Boettcher and Manz, 2017).

In addition to inflammatory cytokines, various Wnt signaling pathways also modulate HSC activation and maintenance. While Wnt/ $\beta$ -catenin and Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  pathways are associated with HSC activation and repopulation (Florian et al., 2013, Sugimura et al., 2012, Lento et al., 2014, Knapp et al., 2017, Luis et al., 2011), we and others have reported that HSC self-renewal is impaired in mice that lack the expression of various receptors associated with Wnt/planar cell polarity (PCP) pathway (Abidin et al., 2015, Sugimura et al., 2012, Lhoumeau et al., 2016). However, the role of individual Wnt ligands has received much less attention. *Wnt3a*<sup>-/-</sup> HSCs display impaired self-renewal in serial transplant despite the fact that Wnt3a is expressed at very low levels in adult bone marrow (BM) hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) (Luis et al., 2009), and this was reported to be the result of complete absence of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. In comparison, enhanced *Wnt5a* expression was associated with HSC aging (Florian et al., 2013) via the activation of Cdc42, a component of the Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  pathway, and a corresponding decrease in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. Previous data from our group suggest that the apparent switch from  $\beta$ -catenin-dependent to  $\beta$ -catenin-independent signaling may occur even earlier, during the switch from fetal to adult hematopoiesis (Kwarteng et al., 2018). Overall, HSPC differentiation and self-renewal decisions appear based on the integration of graded signals from the different Wnt signaling pathways, often with opposing effects.

We have previously shown that Wnt4 activates the Wnt/PCP pathway (Heinonen et al., 2011b), and its overexpression in hematopoietic cells improved thymic recovery after hematopoietic cell transplant (Heinonen et al., 2011b). However, the intrathymic impact of Wnt4 on T lymphopoiesis is mainly dependent on its expression by thymic epithelial cells, and while *Wnt4* is expressed in HSPCs as well as in the BM stroma (Louis et al., 2008, Florian et al., 2013, Sugimura et al., 2012, Tan et al., 2014, Heinonen et al., 2011b), its physiological role in regulating BM HSPC function has not yet been rigorously addressed.

We report here that hematopoietic Wnt4 is necessary for efficient steady state lymphopoiesis. Moreover, Wnt4-deficient HSPCs cannot repopulate the thymus in competitive chimeras and fail at reconstituting secondary recipients. Hematopoietic Wnt4 deficiency leads to increased

inflammation in the BM and is associated with alterations in the expression of cell cycle regulators in HSCs. Our results thus demonstrate the importance of hematopoietic *Wnt4* in the maintenance of HSC function.

## 3.2 Materials and methods

### 3.2.1 Experimental Animals

C57BL/6 (B6 CD45.2<sup>+</sup>), B6.SJL-Ptprc<sup>a</sup>Pepc<sup>b</sup>/BoyJ (B6 CD45.1<sup>+</sup>), B6.Cg-Commd10<sup>Tg</sup> (*Vav1-icre*)<sup>A2Kio</sup>/J (*Vav-iCre*), B6.129P2-Lyz2<sup>tm1 (cre) lfo</sup>/J (*LysMCre*) and B6.129X1-Gt (ROSA)26Sor<sup>tm1 (EYFP)</sup><sup>Cos</sup>/J (R26R-EYFP) mice were purchased from The Jackson laboratory (Bar Harbor, ME). Mice with a *Wnt4* conditional allele have been described elsewhere (Shan et al., 2009) and were originally a kind gift from S. Vainio (Oulu University, Finland). Mice were bred and housed under specific pathogen-free conditions in sterile ventilated racks at the animal facility of INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie. Both males and females were included in the steady-state analysis, but chimeras were all done using female mice. Sex-matched littermates were used as controls. For mixed BM chimeras, *Vav-iCre*<sup>+</sup> *Wnt4*<sup>fl/fl</sup> (*Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup>) or control BM cells (CD45.2<sup>+</sup>) were combined with 5x10<sup>5</sup> competitor cells (CD45.1<sup>+</sup> or CD45.1<sup>+</sup>/CD45.2<sup>+</sup>) in a 1:1 Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> c-Kit<sup>+</sup> (LSK) CD150<sup>+</sup> cell equivalent ratio (as previously detailed (Kwarteng and Heinonen, 2016, Hetu-Arbour et al., 2021a)) and injected into the lateral tail vein of lethally irradiated (2x450 rad) congenic recipient mice (CD45.1<sup>+</sup>/CD45.2<sup>+</sup>). For lipopolysaccharide (LPS) stimulation assays, 1 dose of 1mg/kg was administered by intraperitoneal injection into *Vav-iCre*<sup>+</sup> *Wnt4*<sup>fl/fl</sup>, *LysMCre*<sup>+</sup> *Wnt4*<sup>fl/fl</sup> or control mice. The mice were analyzed 24 hours after the injection. For the sublethal irradiation experiment, 9-month-old *Vav-iCre*<sup>+</sup> *Wnt4*<sup>fl/fl</sup> and control mice were given one dose of 450 rad, and their recovery was monitored until day 17. The procedures were approved by the Comité institutionnel de protection des animaux of INRS in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines.

### 3.2.2 Flow cytometry

HSPC populations, thymocyte subsets and donor chimerism were determined as previously described (Abidin et al., 2015, Heinonen et al., 2011a). A mix of antibodies was also used in BM and spleen to have an overview of different mature cell populations, such as lymphocytes and myeloid cells. Antibodies were purchased from BD Biosciences (Mississauga, ON), eBioscience (San Diego, CA), or BioLegend (San Diego, CA) as indicated (see Supplemental Table 1). For intracellular staining, surface-stained samples were fixed and permeabilized using the FoxP3

staining kit (eBioscience), washed, and blocked with a final concentration of 1% BSA (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). Staining with pre-conjugated Ki-67 antibody was done for 1h at room temperature. Phospho-specific staining was done overnight at 4°C. The next morning, the samples were washed and stained with an Alexa Fluor 488 secondary antibody for 30 min at room temperature. Cells were acquired on a four laser BD LSRFortessa flow cytometer (BD Biosciences, Mountain View, CA) and analyzed using FACS DiVa (v. 6.1) or FlowJo (v. 10.1) software.

### **3.2.3 Cell sorting**

The thymic capsules were digested by incubating them in 1 mL of DMEM supplemented with collagenase/dispase (0.125% w/v) and DNase I (0.1% w/v) at 37°C for 45 minutes to obtain thymic epithelial cells (TEC). The samples were resuspended by pipetting every 15 min, and half of the medium was refreshed. The fractions were pooled in 2mL of PBS supplemented with 0.1% of BSA, 0.5mM EDTA and 2% FBS Premium (Wisent Bioproducts, St-Bruno, QC). Single cell suspensions of thymic stroma were then enriched by negative selection using the EasySep mouse Streptavidin RapidSpheres isolation kit (StemCell Technologies, Vancouver, BC) with biotinylated CD45 antibody according to manufacturer's instructions. The cells were further stained with FITC CD45.2 and APC CD326. Single cell suspensions of bone marrow cells were first enriched using the EasySep mouse HemProg enrichment kit (StemCell Technologies) according to manufacturer's instructions. BM cells were further stained with Lineage antibodies in combination with FITC-conjugated streptavidin, PE-Cy7 Ly6A/E, and PE CD117. Cells were sorted for purity on a two-laser BD FACSJazz. See Supplemental Table 1 for additional details on antibodies.

### **3.2.4 qRT-PCR**

Cells were frozen in Trizol reagent (Invitrogen) after sorting. The manufacturer's protocol was followed for total RNA extraction. RNeasy columns (Qiagen) were used to concentrate and clean the preparation. High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) was used to convert total RNA to cDNA. Taqman custom PreAmp kit (Applied Biosystems) was used to pre-amplified the cDNA product. Quantitative RT-PCR was performed using Taqman reagents and assays (Applied Biosystems; see Supplemental Table 2) on Stratagene Mx3000P instrument. Relative quantification was determined by using the  $\Delta\Delta CT$  method.

### **3.2.5 Colony assays**

BM single-cell suspensions were prepared in IMDM supplemented with 10% FBS Premium (Wisent Bioproducts). Cells were seeded in 35mm nonadherent petri dishes in methylcellulose-based medium M3434 ( $10^4$  cells/dish) or M3630 ( $5 \times 10^4$  cells/dish) (StemCell Technologies). The colonies were counted and identified based of their morphology after 7-10 days under an inverted microscope. Cells were then recovered by diluting in sterile PBS, and a constant fraction of the recovered cells (1/50) was used for replating. Secondary colonies were counted on day 10.

### **3.2.6 Mitochondrial reactive oxygen and membrane potential**

BM cells were harvested in PBS/0.1% BSA. The MitoSOX Red mitochondrial superoxide indicator reagent (Invitrogen) was added in a final concentration of  $5 \mu\text{M}$ , or Tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM, for evaluating mitochondrial membrane potential; Invitrogen) at a final concentration of  $0.5 \text{ nM}$ , and the cells were incubated for 30 min at  $37^\circ\text{C}$ , after which they were washed and surface-stained for flow cytometry analysis as detailed above.

### **3.2.7 Real time metabolic analysis**

Sorted Lin<sup>c</sup>Kit<sup>+</sup> BM progenitor cells were seeded at  $7 \times 10^4$  cells per well in poly-L-lysine-coated wells of a Seahorse XFe96 plate. The plate was centrifuged for 1 min at 450 g, after which the sort medium was replaced with Seahorse XF DMEM (pH 7.4), devoid of phenol red, bicarbonate, glucose, pyruvate, or glutamine. The cells were incubated for 2h at  $37^\circ\text{C}$  with no  $\text{CO}_2$  and their oxygen consumption was then measured using the XFe96 analyzer (Agilent) as per manufacturer's instructions.

### **3.2.8 Senescence-associated $\beta$ -galactosidase assay**

To evaluate SA- $\beta$ gal activity, freshly harvested BM cells were treated with chloroquine and then incubated for 1h at  $37^\circ\text{C}$  in the presence of  $\text{C}_{1,2}$ -FDG (Invitrogen) as previously described (Noppe et al., 2009), after which the reaction was stopped, and the cells surface-stained for flow cytometry as detailed above.



### 3.2.9 Bone marrow cytokine analysis

Bone marrow cells from one hind leg were first harvested in 1 mL of PBS. After centrifugation, the supernatants were collected and stored at -30°C until usage. The cytokine profiles of the supernatants were obtained using a membrane-based Proteome profiler mouse cytokine array kit (R&D Systems). Array images were analyzed using the NIH ImageJ image analysis software.

### 3.2.10 Statistical analysis

Each panel represents at least three independent experiments. Two-tailed student's t test was used to determine statistical significance unless otherwise specified.  $P < 0.05$  was considered significant.

**Tableau 3.1 Supplemental Table 1. List of antibodies used for flow cytometry.**

ANTIBODY	FLUOROCHROME	CLONE	COMPANY
CD16/32 (Fc block)	Purified	2.4G2	BD Biosciences
HSPC staining			
CD117 (cKit)	PE	2B8	BD Biosciences
CD135 (Flt3)	PerCP-eFluor 710	A2F10	eBioscience
CD150	Alexa Fluor 647	TC15-12F12.2	BioLegend
Sca1 (Ly6A/Ly6E)	PE-Cy7	D7	BD Biosciences
CD3e	Biotin	145-2C11	BD Biosciences
CD11b	Biotin	M1/70	BD Biosciences
CD45R/B220	Biotin	RA3-6B2	BD Biosciences

GR1 (Ly6C/Ly6G)	Biotin	RB6-8C5	BD Biosciences
Ter119	Biotin	TER-119	BD Biosciences
CD48	BV421	HM48-1	BD Biosciences
Streptavidin	V500		BD Biosciences
CD45.1	FITC <sup>a</sup> / APC-Cy7 <sup>b</sup>	A20	BD Biosciences
CD45.2	V450 <sup>a</sup> / FITC <sup>b</sup>	104	BD Biosciences
Thymocyte staining			
CD25	PE	PC61	BD Biosciences
CD3e	PE-Cy7	145-2C11	eBioscience
CD117 (cKit)	APC	2B8	BD Biosciences
CD4	APC-Cy7	GK1.5	BD Biosciences
CD8a	V450	53-6.7	BD Biosciences
CD11b	Biotin	M1/70	BD Biosciences
Ter119	Biotin	TER-119	BD Biosciences
GR1 (Ly6C/Ly6G)	Biotin	RB6-8C5	BD Biosciences
CD45R/B220	Biotin	RA3-6B2	BD Biosciences
Streptavidin	V500		BD Biosciences
CD45.1	FITC	A20	BD Biosciences

Overview staining			
IgM	PerCP-eFluor 710	II/41	eBioscience
CD19	PE	1D3	BD Biosciences
CD3e	PE-Cy7	145-2C11	eBioscience
CD11b	Alexa Fluor 647	M1/70	BD Biosciences
IgD	APC	11-26c.2a	BD Biosciences
GR1 (Ly6C/Ly6G)	APC-Cy7	RB6-8C5	BD Biosciences
CD4	APC-Cy7	GK1.5	BD Biosciences
CD8a	V450	53-6.7	BD Biosciences
CD45R/B220 <sup>c</sup>	FITC	RA3-6B2	BD Biosciences
CD45.1	FITC	A20	BD Biosciences
Myeloid staining			
CD11b	APC-Cy7	M1/70	BD Biosciences
Ly6G	PECy7	1A8	BD Biosciences
Ly6C	PerCP-Cy5.5	HK1.4	eBioscience
F4/80	BV421	T45-2342	BD Biosciences
CD45.1	APC	A20	BD Biosciences
CD45.2	FITC	104	BD Biosciences

Blood staining			
CD19	PE	1D3	BD Biosciences
CD3e	PE-Cy7	145-2C11	eBioscience
GR1 (Ly6C/Ly6G)	APC-Cy7	RB6-8C5	BD Biosciences
CD11b <sup>c</sup>	Alexa Fluor 647	M1/70	BD Biosciences
CD45.1	APC	A10	BD Biosciences
CD45.2	FITC	104	BD Biosciences
Red Blood Cell (RBC) staining			
CD71	eFluor 450	R17217	eBioscience
CD41	PE	MWReg30	BD Biosciences
CD45	PE-CF594	30-F11	BD Biosciences
Ter119	Biotin	TER-119	BD Biosciences
Streptavidin	FITC		BD Biosciences
Intracellular staining			
Phospho-Akt (Thr308)	Purified	D25E6	Cell Signaling Technology
Phospho- $\beta$ -catenin (Ser552)	Purified	D8E11	Cell Signaling Technology

Phospho-AMPK $\alpha$ (Thr172)	Purified	40H9	Cell Signaling Technology
PGC1 $\alpha$	Purified	Polyclonal	Abcam
Phospho-JNK1+JNK2+JNK3 (Thr183;T183;T221)	Purified	EPR5693	Abcam
CDNK2A/p16INK4a	Purified	PABLO33B	Abcam
F(ab') <sub>2</sub> -Goat anti-rabbit IgG (H+L)	Alexa Fluor 488	A-11070	Invitrogen
Ki-67	FITC	SolA15	eBioscience
TEC enrichment			
CD45	Biotin	30-F11	BioLegend
TEC sorting			
CD45.2	FITC	104	BD Biosciences
CD326 (Epcam)	APC	G8.8	BD Biosciences
LSK sorting			
CD117 (cKit)	PE	2B8	BD Biosciences
Sca1 (Ly6A/Ly6E)	PECy7	D7	BD Biosciences
CD11b	Biotin	M1/70	BD Biosciences
CD3e	Biotin	145-2C11	BD Biosciences

Ter119	Biotin	TER-119	BD Biosciences
CD45R/B220	Biotin	RA3-6B2	BD Biosciences
GR1 (Ly6C/Ly6G)	Biotin	RB6-8C5	BD Biosciences
CD8a	Biotin	53-6.7	BD Biosciences
CD11c	Biotin	HL3	BD Biosciences
NK1.1	Biotin	PK136	BD Biosciences
Streptavidin	FITC		BD Biosciences

<sup>a</sup> Used if CD48 is absent of the mix

<sup>b</sup> Used if CD48 is present in the mix

<sup>c</sup> Used in the analysis of sub-lethal irradiated mice (without CD45.1 and CD45.2); not used in the analysis of transplanted mice

Tableau 3.2 Supplemental Table 2. TaqMan gene expression assays used for qRT-PCR

GENE	TAQMAN ASSAY ID
<i>Wnt4</i>	Mm01194003_m1
<i>Cdkn1a</i>	Mm00432448_m1
<i>Cdkn1b</i>	Mm00438168_m1
<i>Cdkn1c</i>	Mm00438170_m1
<i>Cdkn2a (Ex1a; p16<sup>Ink4a</sup>)</i>	Mm00494449_m1
<i>Cdkn2a (Ex1b; p19<sup>Arf</sup>)</i>	Mm01257348_m1
<i>Cdkn2b</i>	Mm00483241_m1
<i>Cdkn2c</i>	Mm00483243_m1
<i>Cdkn2d</i>	Mm00486943_m1
<i>Trp53</i>	Mm01731290_g1
<i>Rb1</i>	Mm00485586_m1
<i>Ccnd1</i>	Mm00432359_m1
<i>Ccnd2</i>	Mm00438070_m1
<i>Ccnd3</i>	Mm01612362_m1
<i>Ccne1</i>	Mm01266311_m1
<i>Cdk4</i>	Mm00726334_s1

<i>Cdk6</i>	Mm01311342_m1
<i>Myc</i>	Mm00487804_m1
<i>Axin2</i>	Mm00443610_m1
<i>Ctnnb1</i>	Mm00483039_m1
<i>Tcf7</i>	Mm00493445_m1
<i>B2m</i>	Mm00437762_m1



### 3.3 Results

#### 3.3.1 Hematopoietic *Wnt4* deficiency perturbs lymphocyte development

Although *Wnt4* overexpression in fetal liver cells improved post-transplant recovery (Louis et al., 2008, Heinonen et al., 2011b), the physiological role of hematopoietic *Wnt4* has not yet been conclusively demonstrated. To better address the importance of cell-intrinsic *Wnt4* in HSPCs and hematopoiesis, we generated mice in which *Wnt4* was ablated from all hematopoietic cells by Vav-iCre-mediated excision (*Wnt4<sup>Δ/Δ</sup>*). The deletion was highly efficient in hematopoietic progenitor cells [BM LSKs or early thymocyte progenitors (ETPs)] while sparing thymic epithelial cells (Supplemental Fig. 3.2).

*Wnt4<sup>Δ/Δ</sup>* spleen, BM and thymus displayed a 20-40% decrease in cellularity (Fig. 3.1A), suggesting perturbations in the differentiation or maintenance of at least one hematopoietic lineage. T lymphocytes, but not B lymphocytes, were significantly decreased in number in the spleen (Fig. 3.1B, 3.1C), suggesting that hematopoietic *Wnt4* contributes to T lymphocyte generation or maintenance. In contrast, there was no difference in the number of granulocytes (GR1<sup>hi</sup>) or monocyte subsets (GR1<sup>low</sup> or GR1<sup>neg</sup>) in spleen (Fig. 3.1D, E) or BM (Fig. 3.1F, 3.1G). Therefore, the absence of *Wnt4* did not alter the size of major myeloid populations. Although the numbers of B lymphocytes were not decreased in the spleen, their development in BM was somewhat affected by the hematopoietic deletion of *Wnt4*, as we observed a decreased number of pro-B lymphocytes (IgM<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup>) and immature B lymphocytes (IgM<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup>). However, this decrease did not affect the number of mature B lymphocytes returning to the BM (IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup>) (Fig. 3.1H, I), indicating that their proliferation and maturation in the periphery were not negatively impacted by the absence of *Wnt4*. Moreover, T lymphocyte progenitors were significantly decreased in the thymus (Fig. 3.1J, K and Supplemental Fig. 3.2A), starting with ETPs, which corroborates the decrease of T lymphocytes observed in the spleen (Fig. 3.1B, 3.1C) and suggests that the decrease in mature T lymphocytes is most likely due to reduced thymopoiesis. Similar to what we had previously shown in the complete absence of *Wnt4* (Heinonen et al., 2011a, Louis et al., 2008), there were no major alterations in the proportions of various thymocyte subsets.

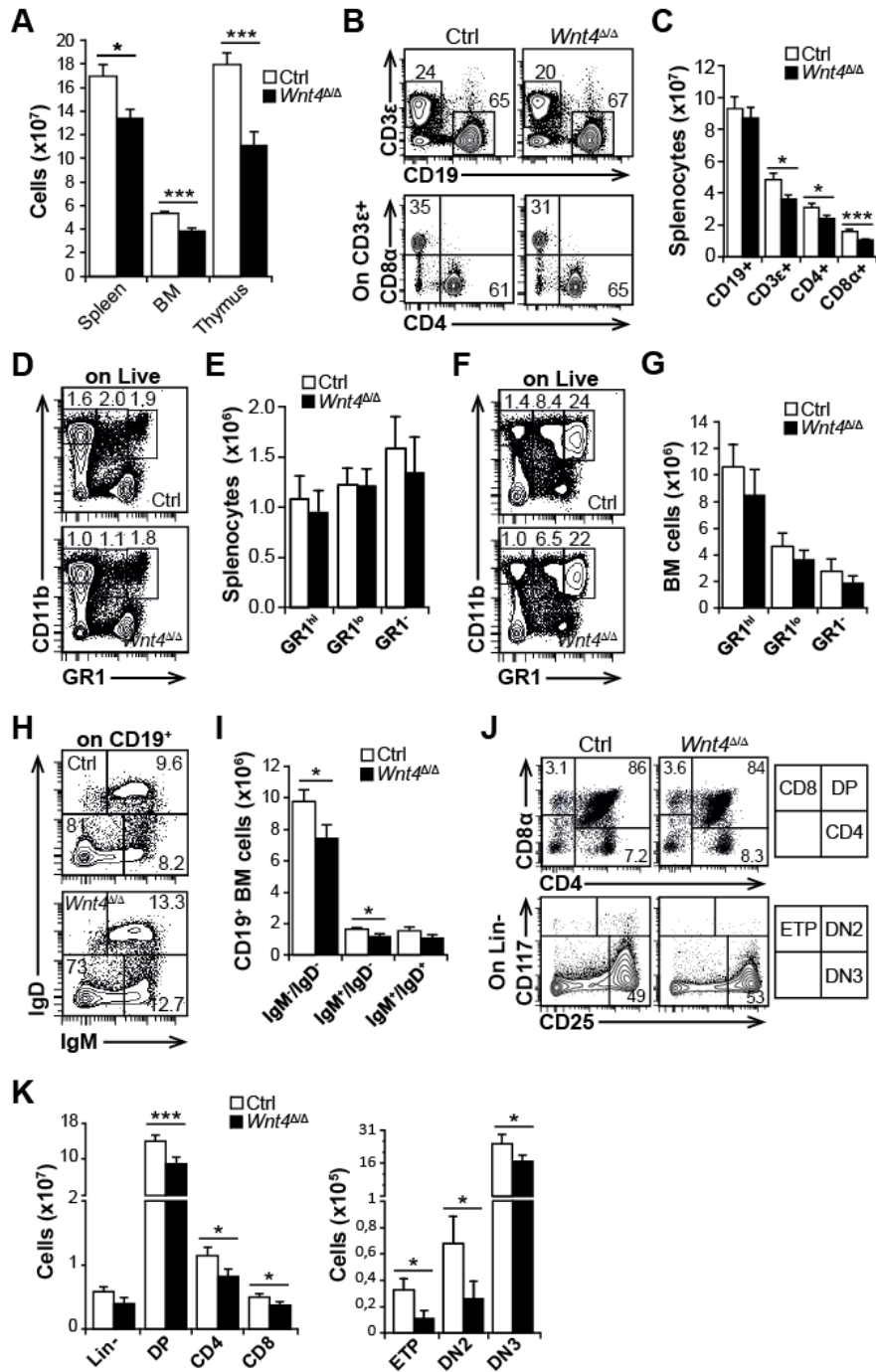


Figure 3.1 Hematopoietic Wnt4 is required for efficient lymphopoiesis

A) Numbers of splenocytes, BM cells (two femora + two tibiae) and thymocytes in 2-month-old mice. B) Flow cytometry analysis of splenic T and B lymphocyte populations. Numbers within the flow cytometry panels represent percentages of the different subsets over total splenocytes (top panels) or within CD3  $\epsilon^+$  cells (bottom panels). C) Numbers of cells within different lymphocyte subsets in the spleen. D-F) Flow cytometry analysis of myeloid populations D) in the spleen and F) in the bone marrow. Numbers within the flow cytometry

panels represent percentages of the different subsets within live cells. Numbers of cells in different myeloid subsets E) in the spleen and G) in the bone marrow. H) Flow cytometry analysis of the bone marrow B lymphocyte populations. Numbers within the flow cytometry panels represent percentages of the different subsets within CD19<sup>+</sup> cells. I) Number of cells within different B lymphocyte subsets in the bone marrow. J) Flow cytometry analysis of thymocyte subpopulations. Numbers within the flow cytometry panels represent percentages of the different subsets over total thymocytes (top panels) or within Lin<sup>-</sup> cells (bottom panels). K) Numbers of various thymocyte subsets. Flow cytometry analysis are from a representative 2-month-old *Wnt4<sup>Δ/Δ</sup>* mouse and a littermate *Vav-iCre<sup>+</sup> Wnt4<sup>fl/+</sup>* control. The histograms represent compiled data (mean + SEM) from 12 mice per genotype for spleen, 11 for BM and 20 for thymus. \*P <0.05, \*\*P <0.005, \*\*\*P <0.0005 (two-tailed, unpaired student's t-test).

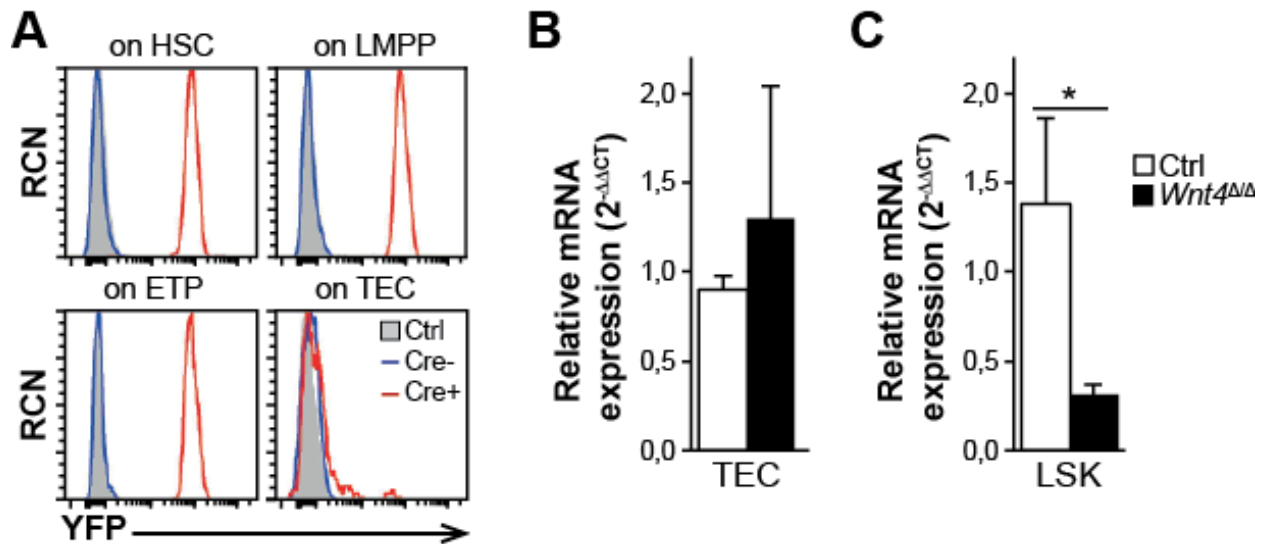
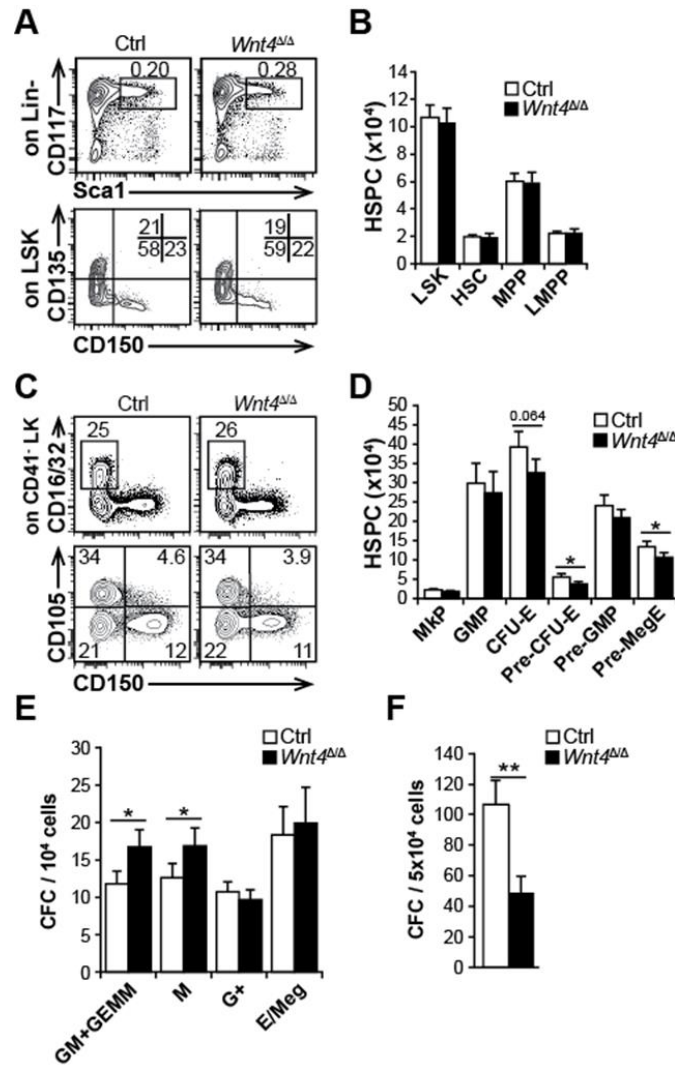


Figure 3.2 Wnt4 is efficiently ablated in hematopoietic cells but expressed in thymic stroma

A) Overlays representing YFP expression in different cell populations of *Vav-iCre<sup>+</sup>* and *Vav-iCre<sup>-</sup>* mice by flow cytometry. B, C) Quantitative RT-PCR for *Wnt4* expression in B) thymic epithelial cells (TEC) sorted from thymic capsules and C) LSK sorted from bone marrow. \*P <0.05 (one-tailed, unpaired student's t-test).

*Wnt4* overexpression promotes the expansion of Flt3<sup>hi</sup> LMPPs, BM precursors for lymphocytes (Louis et al., 2008, Heinonen et al., 2011b). We therefore reasoned that the reduced lymphoid cellularity could be the result of quantitative or functional bias within the progenitor cell compartment in *Wnt4<sup>Δ/Δ</sup>* BM. There was no major difference in the number or frequency of different HSPCs in *Wnt4<sup>Δ/Δ</sup>* mice as compared to controls (Fig. 3.3A-3.3D and Supplemental Fig. 3.2B, 3.2C). However, *Wnt4<sup>Δ/Δ</sup>* BM cells showed a slightly increased tendency to form myeloid colonies

(Fig. 3.3E), concomitant with a 2-fold decrease in the number of pre-B lymphocyte colonies (Fig. 3.3F). Together with the results obtained with mature cells, these data suggest that deletion of *Wnt4* in hematopoietic cells did not influence HSPC numbers, but interferes with their function, including their ability to differentiate into lymphocytes, resulting in a decrease in spleen and thymus cellularity.



**Figure 3.3** *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> HSPCs are present in normal numbers but contain fewer functional lymphocyte precursors.

**A, C)** Flow cytometry analysis of the bone marrow progenitor cell populations from a representative 2-month-old *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> mouse and a littermate control. Numbers within the flow cytometry panels represent percentages of **A)** Lin<sup>-</sup> cKit<sup>hi</sup> Sca1<sup>+</sup> (LSK) cells over total bone marrow (top panels) or subpopulations within LSKs (bottom panels) and **C)** granulocyte-monocyte progenitor (GMP) cells (top panels) or subpopulations within Lin<sup>-</sup>

Sca1<sup>+</sup>CD41<sup>-</sup>CD16/32<sup>-</sup> cells (bottom panels) over total BM. B, D) Numbers of cells within different progenitor subsets in two femora + two tibiae of 2-month-old mice. The histograms represent compiled data from B) 31 animals and D) 13 animals per group (mean + SEM). E) Numbers of colonies having grown from 10<sup>4</sup> BM cells plated in M3434 methylcellulose-based medium. CFC, Colony forming cell; E/Meg, Erythroid/megakaryocyte; G, Granulocyte; M, Monocyte/Macrophage; GM+GEMM, Granulocyte/macrophage or Granulocyte/erythroid/macrophage/megakaryocyte. F) Number of colonies having grown from 5x10<sup>4</sup> BM cells plated in M3630 methylcellulose-based medium (pre-B CFC). \*P <0.05, \*\*P <0.005 (two-tailed, paired student's t-test).

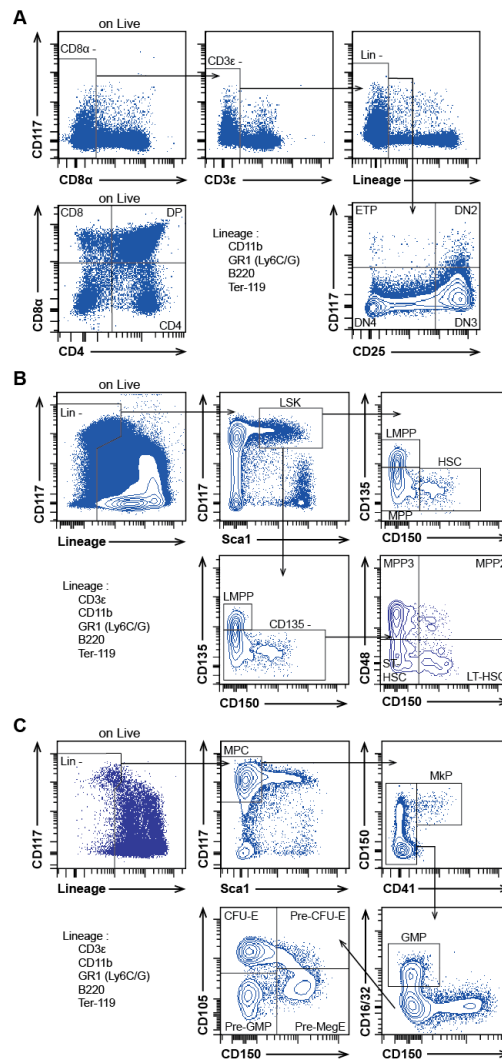


Figure 3.4 Steady-state progenitor cell analysis templates

A) Within live single thymocytes, CD8  $\alpha$ , CD3  $\epsilon$  and lineage (CD11b, GR1, B220 and Ter-119) negative cells are first selected. These negative cells are then divided into ETP, DN2, DN3 and DN4 cells using CD117 and CD25 markers. Also, CD4<sup>+</sup> and CD8  $\alpha$ <sup>+</sup> single positive cells are identified as well as double positive (DP) cells. B)

HSPCs are first selected from the lineage negative (Lin<sup>-</sup>) compartment of live single cells. Within this population, cKit<sup>hi</sup> and Sca1<sup>+</sup> form the LSK population, where HSCs and different progenitors are identified using CD135, CD48 and CD150. C) Cells are first selected from the lineage negative (Lin<sup>-</sup>) compartment of live single cells. Within this population, cKit<sup>hi</sup> and Sca1<sup>-</sup> form the myeloid progenitor cell (MPC) population, which can be further divided in Megakaryocyte progenitors (MkP; CD150<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup>); Granulocyte-monocyte progenitors (GMP; CD16/CD32<sup>+</sup> CD41<sup>-</sup> CD150<sup>-</sup>); Erythroid colony-forming units (CFU-E; CD16/CD32<sup>-</sup> CD41<sup>-</sup> CD105<sup>+</sup> CD150<sup>-</sup>) and their precursor cells (Pre-CFU-E; CD16/CD32<sup>-</sup> CD41<sup>-</sup> CD105<sup>+</sup> CD150<sup>+</sup>); megakaryocyte-erythrocyte precursors (Pre-MegE ; CD16/CD32<sup>-</sup> CD41<sup>-</sup> CD105<sup>-</sup> CD150<sup>+</sup>); and pre-GMPs (CD16/CD32<sup>-</sup> CD41<sup>-</sup> CD105<sup>-</sup> CD150<sup>-</sup>).

### 3.3.2 *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup> HSCs display impaired self-renewal and long-term reconstitution

To study the impact of *Wnt4* in HSC function, we generated mixed BM chimeras and analyzed their hematolymphopoietic output over 20 weeks in a competitive transplantation assay (Fig. 3.5A). Peripheral blood analysis showed that *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup> donor-derived cells generated myeloid and lymphoid cells at lower than expected frequencies (Fig. 3.5B and Supplemental Fig. 3.6). This was reflected in a decreased contribution of *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup> donor cells to the BM stem/progenitor cell compartment (Fig. 3.5C), although the number of *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup> CD150<sup>+</sup> LSKs was comparable to controls (Fig. 3.5C). Moreover, *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup> donor cells generated a reduced number of myeloid and lymphoid progeny in BM (Fig. 3.5D) as well as in thymus (Fig. 3.5E). These results collectively indicate that although *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup> HSCs were able to seed the recipient BM, their hematopoietic output could not compare to that of wild-type cells in the face of competition.

To verify the function of *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup> long-term HSCs, we performed secondary transplants (Fig. 3.5F). The contribution of *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup> donor cells was already disproportionately low at the early time points in peripheral blood and decreased more than ten-fold to near negligible levels by 18 weeks (Fig. 3.5G). In comparison, the proportion of donor-derived cells in control mice at 6 weeks reflected very closely their contribution to the BM in primary recipients, and although this proportion also declined over time, they still represented approximately 30% peripheral blood granulocytes at 18 weeks. Indeed, although present in the BM of secondary transplant recipients, the function of *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup> HSCs appeared significantly reduced, as only a small number of *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup> MPPs was detected (Fig. 3.5H). Moreover, when we normalized the number of donor CD150<sup>+</sup> LSKs recovered from secondary transplant recipients to the number of donor CD150<sup>+</sup> LSKs found in individual grafts, the expansion of *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup> cells was decreased by three-fold as compared to controls (Fig. 3.5I). Taken together, these results demonstrate that hematopoietic *Wnt4* has a crucial role in regulating HSC self-renewal and differentiation, as *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup> HSCs compete less effectively compared to controls.

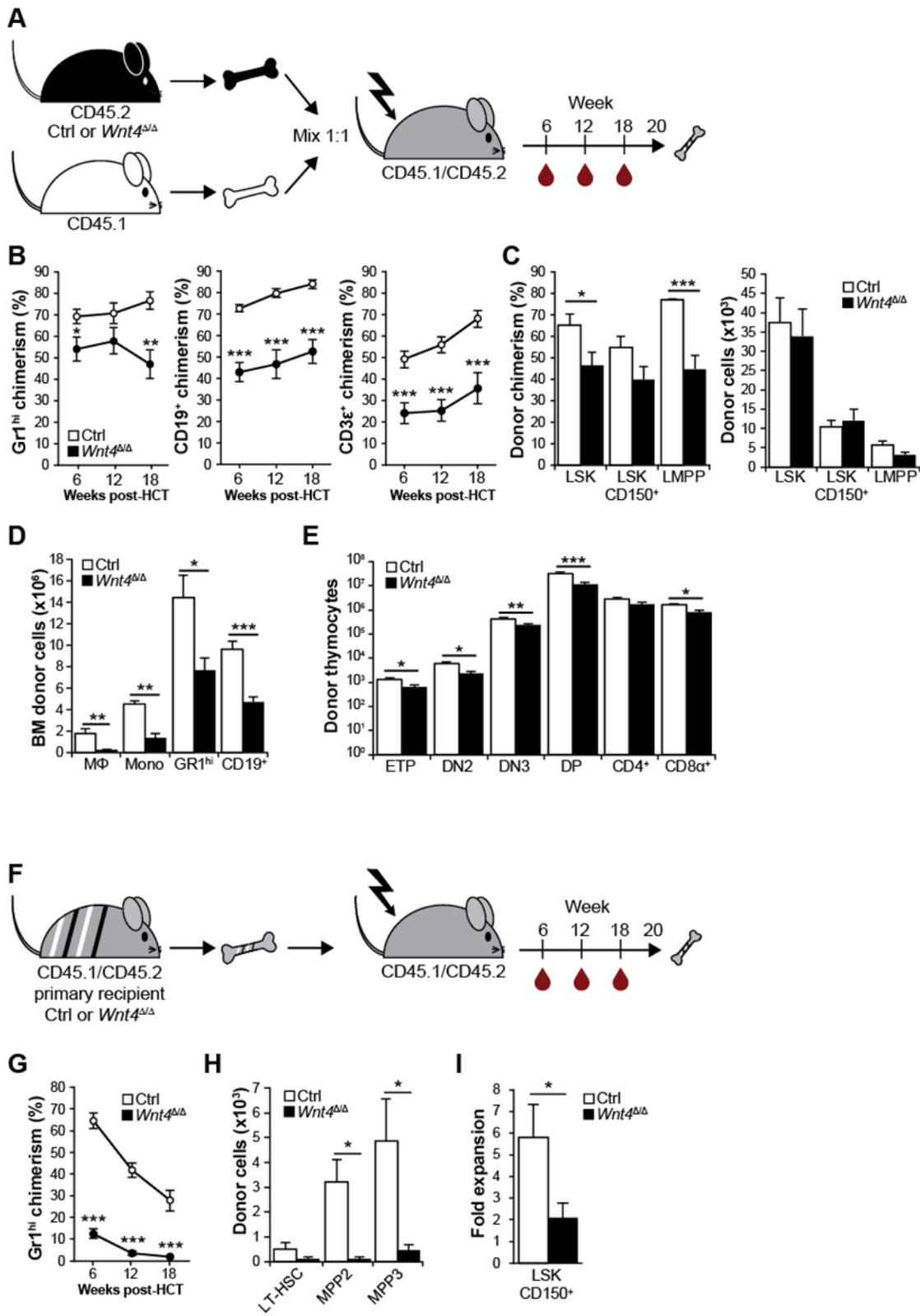


Figure 3.5 Hematopoietic cell-intrinsic Wnt4 promotes BM reconstitution and HSC self-renewal



A) Experimental design of primary competitive transplant. B) Donor chimerism for Gr1<sup>hi</sup> cells (left panel), CD19<sup>+</sup> B lymphocytes (middle panel) and CD3 ε<sup>+</sup> T lymphocytes (right panel) in recipient mice at different times after transplant. C) Proportion (left panel) and number (right panel) of donor-derived HSPCs in BM (two femora + two tibiae) 20 weeks after transplant. D) Number of different donor-derived BM cells 20 weeks after transplant. E) Number of donor-derived thymocytes 20 weeks after transplant. The data for primary transplants are compiled (mean + SEM) from at least four independent transplant experiments (seven for peripheral blood and HSPCs; six for thymocytes) for a total of 20-30 recipients per group. F) Experimental design of secondary transplant, where the donor mice are the primary transplant recipients. G) Donor chimerism for Gr1<sup>hi</sup> cells at different times after secondary transplant. H) Number of donor-derived HSPCs in BM (two femora + two tibiae) 20 weeks after transplant. I) CD150<sup>+</sup> LSK expansion from primary to secondary transplant. The data for secondary transplants are compiled from three independent transplant experiments. \*P <0.05, \*\*P <0.005, \*\*\*P <0.0005 (two-tailed, unpaired student's t-test).

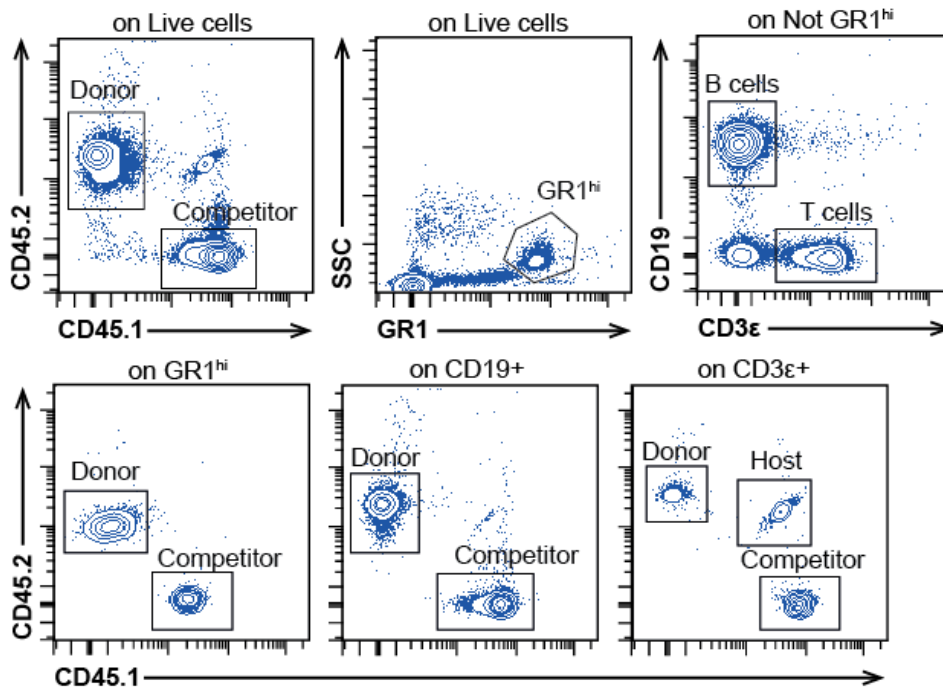


Figure 3.6 Post-transplant peripheral blood analysis template

Within live single cells, select SSC<sup>hi</sup> GR1<sup>hi</sup> cells to form the granulocyte population. On the rest of the cells, CD3ε<sup>+</sup> cells are T cells, CD 19<sup>+</sup> cells are B cells. From these three populations, a CD45.1 and CD45.2 graph is used to identify the donor (CD 45.2<sup>+</sup>), competitor (CD45.1<sup>+</sup>) and host (CD45.1<sup>+</sup> CD45.2<sup>+</sup>) cells.

### 3.3.3 *Wnt4* deletion impairs CD150<sup>+</sup> LSK expansion upon LPS stimulation

Reduced competitive repopulation could be due to impaired migration or an impaired activation and expansion in the post-transplant BM. HSCs are known to exit their dormant state and proliferate in response to inflammatory signals in order to replenish the hematopoietic system (Nagai et al., 2006, Pietras, 2017). When the mice were challenged with lipopolysaccharide (LPS) to generate systemic inflammation and to evaluate HSC activation in their native environment, *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> HSC expansion in BM was suppressed when compared to control littermates (Fig. 3.7A, 3.7B). However, this decrease appeared specific to the BM, since there was no difference in CD150<sup>+</sup> LSK accumulation in the spleen (Fig. 3.7B), the major site of extramedullary hematopoiesis in pathological conditions (Chiu et al., 2015, Oda et al., 2018). These data suggest that *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> HSCs have a reduced capacity to expand in response to an inflammatory stimulus. Alternatively, although not exclusively, the absence of *Wnt4* could alter the systemic response and result in changes in BM cytokine environment.

A broader assessment of the cytokine and chemokine profile revealed a more inflammatory environment in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BM treated with LPS compared to the treated control (Fig. 3.7C), implicating an increase in several inflammatory mediators (IL-1  $\alpha/\beta$ , IL-12/IFN- $\gamma$ , CCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL11) (Fig. 3.7C and Supplemental Fig.3.8). Furthermore, there was an important increase of granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BM (Fig. 3.7C and Supplemental Fig. 3.8), indicative of a strong response to LPS. Some factors, such as IL-1  $\alpha/\beta$  and IL-3, were already elevated at baseline in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> mice. These data point towards a pro-inflammatory BM environment contributing to an inherent bias against lymphopoiesis.

HSC activation has also been associated to a switch from non-canonical to canonical Wnt signaling (Sugimura et al., 2012). Moreover, although  $\beta$ -catenin alone will ultimately result in HSC exhaustion, it has been shown to promote HSC expansion when in combination with active Akt signaling (Perry et al., 2011). Conversely, inflammation-induced HSC proliferation is often accompanied by PI3K/Akt activation (Essers et al., 2009, Porter et al., 2016, Hemmati et al., 2019). Therefore, we evaluated the expression of phosphorylated  $\beta$ -catenin (Ser552) and Akt (Thr308) in BM HSCs with and without LPS. Control HSCs showed an increase of  $\beta$ -catenin (Ser552) and Akt (Thr308) phosphorylation upon LPS injections compared to steady state (Fig. 3.7D, 3.7E). In contrast,  $\beta$ -catenin and Akt activation was not significantly increased in LPS-stimulated *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> HSCs, although it must be noted that *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> HSCs tended toward increased activation of  $\beta$ -catenin already at steady state (Fig. 3.7D,3.7E). These results show that  $\beta$ -catenin levels were not decreased in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> HSCs and suggest that imbalanced Akt/ $\beta$ -catenin signaling

could be involved in the decreased expansion of *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> HSCs in inflammatory context. Furthermore, the pro-inflammatory state in the *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BM environment could not only interfere with lymphopoiesis but also disturb HSC long-term maintenance.

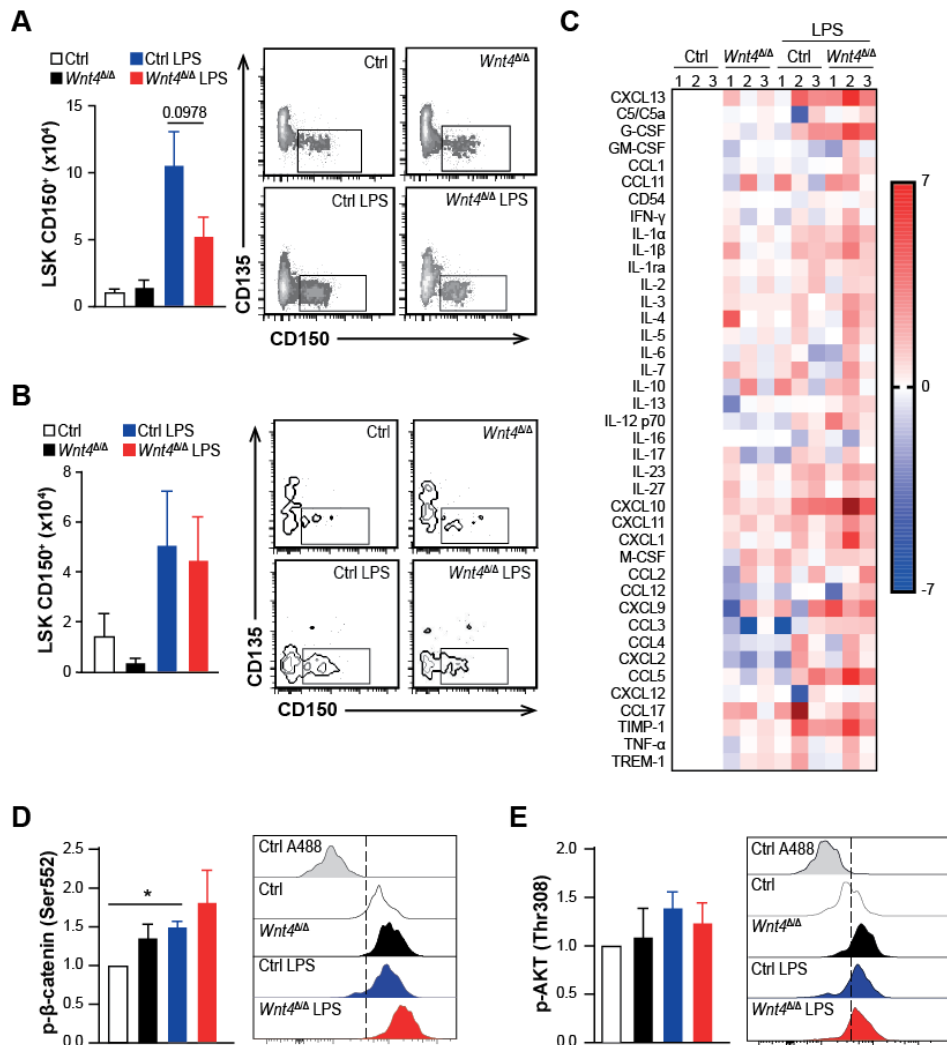
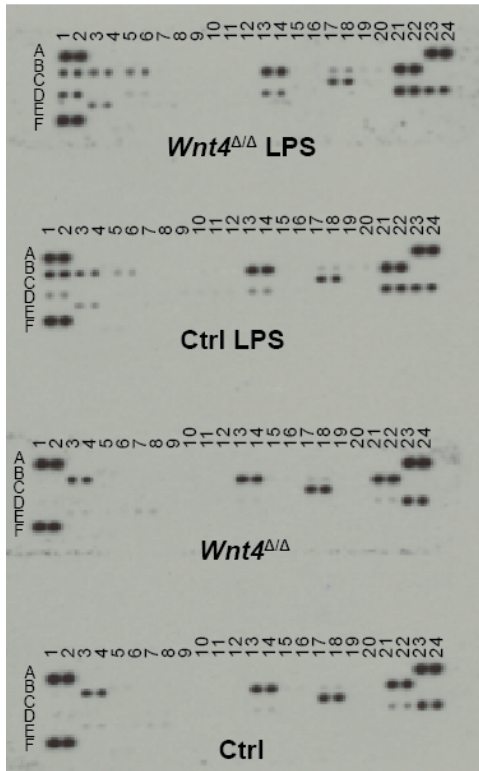


Figure 3.7 LPS stimulation affects *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> HSC expansion

A, B) Top panels, numbers LSK CD150<sup>+</sup> cells within A) BM and B) spleen of 2-month-old *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> mice and littermate controls, injected or not with LPS. Left panels show numbers per leg (1 femur + 1 tibia), while representative flow cytometry analysis are shown on the right. The histograms represent compiled data from 5-6 animals per group (mean + SEM). C) Cytokine profile analysis in BM plasma of 2-month-old mice. Mean fluorescence intensity (MFI) of D) phosphorylated-β-catenin (Ser552) and E) phosphorylated-AKT (Thr308) in BM HSPCs (LSK CD150<sup>+</sup>), normalized to non-injected control mice (left panels). Flow cytometry analysis from a representative experiment (right panel). The histograms represent compiled data from 4 independent experiments (mean + SEM). \*P < 0.05, \*\*P < 0.005, \*\*\*P < 0.0005 (two-tailed, paired ANOVA).

**A****B**

Spot ID	Cytokines/chemokines	Spot ID	Cytokines/chemokines
A1, A2	Reference spot	C17, C18	IL-16
A23, A24	Reference spot	C19, C20	IL-17
B1, B2	CXCL13	C21, C22	IL-23
B3, B4	C5/C5a	C23, C24	IL-27
B5, B6	G-CSF	D1, D2	CXCL10
B7, B8	GM-CSF	D3, D4	CXCL11
B9, B10	CCL1	D5, D6	CXCL1
B11, B12	CCL11	D7, D8	M-CSF
B13, B14	CD54	D9, D10	CCL2
B15, B16	IFN- $\gamma$	D11, D12	CCL12
B17, B18	IL-1 $\alpha$	D13, D14	CXCL9
B19, B20	IL-1 $\beta$	D15, D16	CCL3
B21, B22	IL-1ra	D17, D18	CCL4
B23, B24	IL-2	D19, D20	CXCL2
C1, C2	IL-3	D21, D22	CCL5
C3, C4	IL-4	D23, D24	CXCL12
C5, C6	IL-5	E1, E2	CCL17
C7, C8	IL-6	E3, E4	TIMP-1
C9, C10	IL-7	E5, E6	TNF- $\alpha$
C11, C12	IL-10	E7, E8	TREM-1
C13, C14	IL-13	F1, F2	Reference spot
C15, C16	IL-12 p70	F23, F24	Control -

**Figure 3.8 Cytokine profile in bone marrow supernatant**

**A) Every pair of dots represent one cytokine detected in the BM supernatant of 2-month-old *Wnt4 $\Delta\Delta$*  mice and a littermate control, injected or not with LPS. B) The dots refer to the cytokines listed.**

### 3.3.4 *Wnt4* deficiency in the myeloid lineage is not sufficient to interfere with lymphopoiesis or LPS-induced HSC expansion

The deletion of *Wnt4* in hematopoietic cells impaired HSC expansion upon LPS injection. However, HSCs receive instruction from multiple sources, including other cells of hematopoietic origin. Among these cells, macrophages (Winkler et al., 2010) and granulocytes (Zhu et al., 2017) contribute to HSC maintenance and mobilization not only at steady state but also during emergency myelopoiesis in response to an inflammatory environment. In addition, granulocytes contribute to hematopoietic recovery after BM transplant (Bowers et al., 2018). Considering that overexpression of *Wnt4* had a cell-intrinsic impact on myeloid cells (Heinonen et al., 2011b), and that the pro-inflammatory cytokine and chemokine signature included several factors secreted mainly by myeloid cells, we decided to further investigate whether the lack of *Wnt4* in the myeloid compartment were sufficient to affect HSC behaviour.

Therefore, to better evaluate the contribution of other hematopoietic cells in the BM, we opted to ablate *Wnt4* in macrophages and granulocytes using the LysM-Cre strain (Shi et al., 2018, Abram et al., 2014). As expected, LysM-Cre activity was most efficient in granulocytes, followed by macrophages and monocytes both in spleen and BM (Supplemental Fig. 3.10A). Unlike Vav-iCre, LysM-Cre-mediated *Wnt4* deletion did not disturb BM, spleen or thymus cellularity (Supplemental Fig. 3.10B). Furthermore, it had no major impact on myeloid populations in the BM or spleen (Supplemental Fig. 3.10C, 3.10D); T lymphocytes were present at expected numbers in the thymus (Supplemental Fig. 3.10E); and there was no difference in HSPC numbers in the BM (Fig. 3.9A and Supplemental Fig. 3.10F). Finally, when LysM-Cre *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> mice were challenged with LPS, HSC expansion was not impaired (Fig. 5A, B). These data thus indicate that *Wnt4* regulates HSC function independently of myeloid cells and support the finding that the effect of *Wnt4* on HSCs is truly cell-intrinsic.

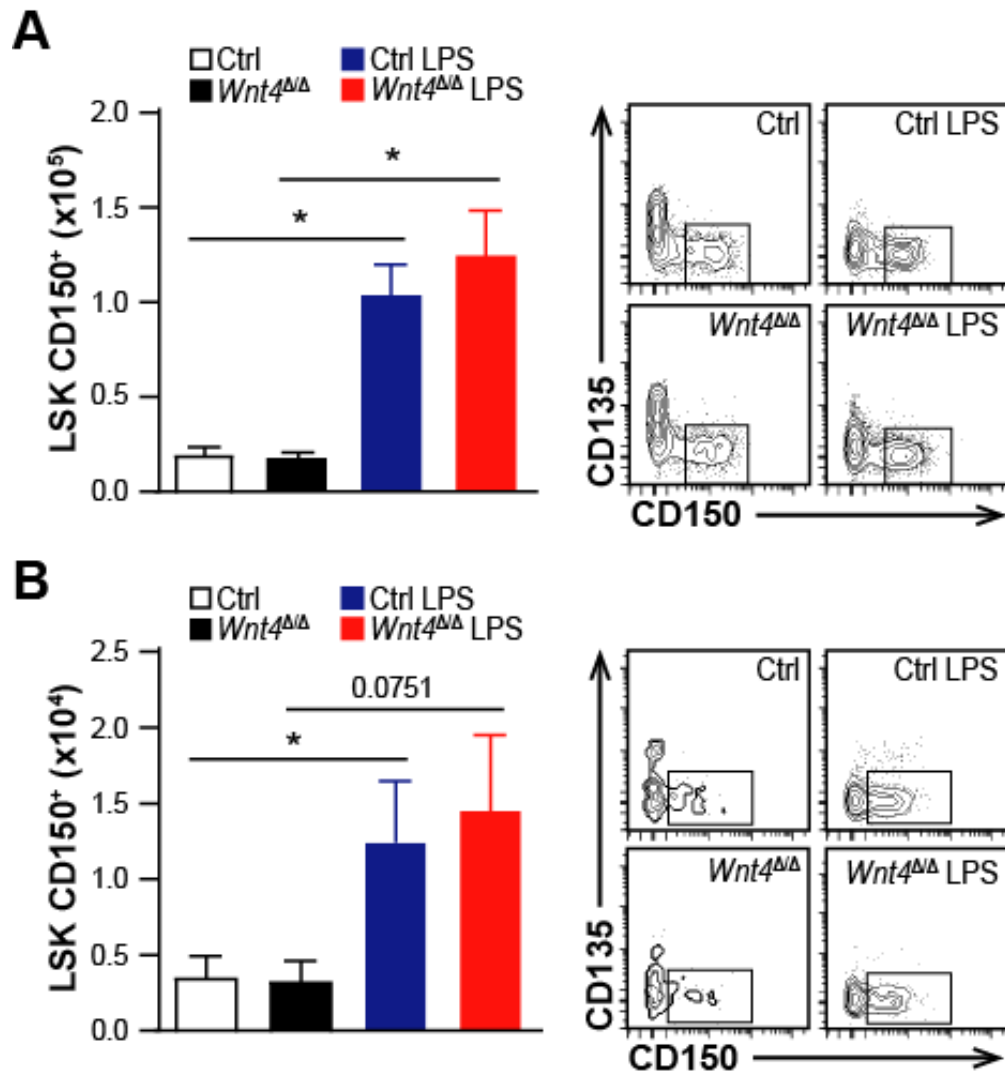


Figure 3.9 HSC expansion is independent of Wnt4 depletion in myeloid cells

A, B) Numbers of LSK CD150<sup>+</sup> cells within A) BM and B) spleen of 2-month-old *LysMCre<sup>+</sup> Wnt4<sup>fl/fl</sup>* (*LysM Wnt4<sup>Δ/Δ</sup>*) mice and littermate controls, injected or not with LPS. The histograms represent compiled data from 7 independent experiments (mean + SEM). Representative flow cytometry analyses are shown on the right. \*P < 0.05 (two-tailed, paired ANOVA).

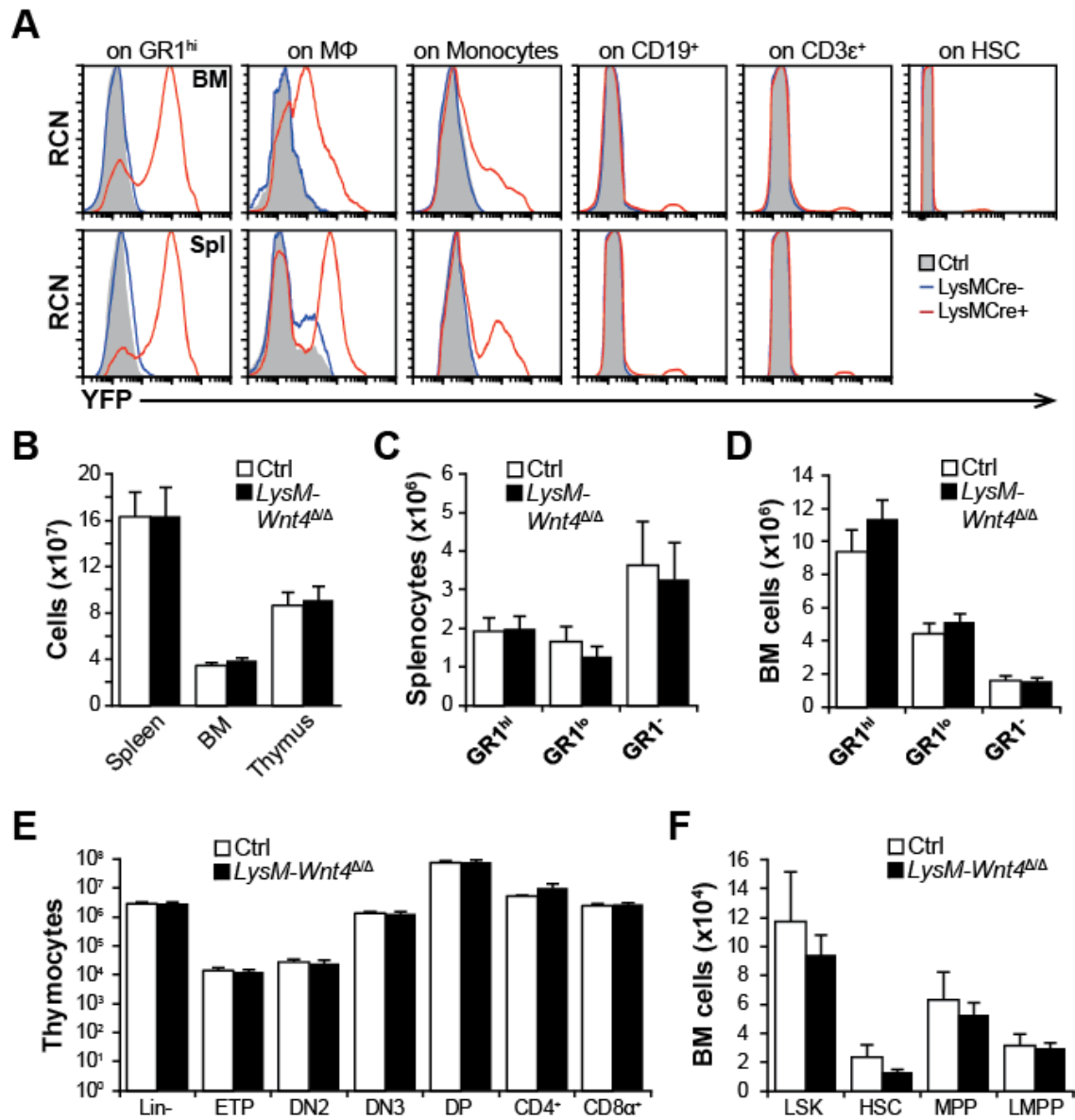


Figure 3.10 Mice with myeloid-specific Wnt4-deletion have normal hematolymphopoiesis

A) Overlays representing YFP expression in different cell populations of *LysM-Cre*<sup>+</sup> and *LysM-Cre*<sup>-</sup> mice by flow cytometry. B) Numbers of splenoctyes, BM cells (2 femora + 2 tibiae) and thymocytes in 2-month-old *LysMCre*<sup>+</sup> *Wnt4*<sup>fl/fl</sup> (*LysM Wnt4*<sup>ΔΔ</sup>) mice and their littermate controls. Numbers of cells within different myeloid subsets in the C) spleen and D) BM. E) Numbers of cells within different thymocytes populations. F) Numbers of cells within different progenitor subsets in the BM. See also Supplemental Fig. 2 for gating strategies. The histograms represent compiled data from 10 animals per group (mean + SEM) for spleen and BM and 8 for thymus. None of the differences were statistically significant.

### 3.3.5 *Wnt4* deficiency alters the expression of cell cycle regulators

Given the importance of non-canonical Wnt signaling in maintaining HSC quiescence (Sugimura et al., 2012, Povinelli and Nemeth, 2014), we hypothesized that the decrease in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> HSC self-renewal and differentiation capacity could be a consequence of an early exhaustion. Reactive oxygen species (ROS) production in mitochondria is normally very low in quiescent HSCs and intermediate in cycling cells, while elevated levels of ROS can lead to HSC exhaustion (Ludin et al., 2014). *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> CD150<sup>+</sup> LSKs displayed on average an increased level of ROS, with individual levels ranging from low to high (Fig. 3.11A). However, there was no change in mitochondrial membrane potential (Fig. 3.11B) or in the level of transcription factor PGC1  $\alpha$  responsible for mitochondrial biogenesis (Fig. 3.11C), suggesting that there was no major difference in the number or integrity of mitochondria in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> HSCs. Moreover, there was no change in the activity of the energy sensor AMPK (Fig. 3.11D) or in the overall oxygen consumption between control and *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> cells (Supplemental Fig. 3.12A), suggesting that *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> HSCs were not more metabolically active than control cells. Instead, we observed an increased activation of the stress-associated kinase JNK as seen by an increased phosphorylation of the active site tyrosine residue (Fig. 3.11E), as well as increased expression of the cell cycle inhibitor p16<sup>INK4a</sup> (Fig. 3.11F) in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> HSCs. A more global assessment of the expression of a panel of cell cycle associated genes revealed also an upregulation of *Cdkn2a/p19<sup>Arf</sup>*, which is a splice variant expressed from the same gene locus as *Cdkn2a/p16<sup>INK4a</sup>* (Supplemental Fig. 3.12B). There was also a tendency towards the upregulation of other cyclin-dependent kinase inhibitor genes, such as *Cdkn1b/p27<sup>Kip</sup>* and *Cdkn2c/p18<sup>INK4c</sup>* in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> LSKs (Supplemental Fig. 3.12B). However, there was no significant difference in the proportion of Ki-67<sup>+</sup> cycling HSCs (Supplemental Fig. 3.12C), suggesting that *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> cells are not more quiescent than their normal counterparts, but may present signs of other forms of cellular stress that could interfere with their cell cycle entry and/or progression.

Aging is associated with the expansion of phenotypic HSCs that are frequently biased toward myeloid differentiation and whose capacity to clonally expand is reduced (Rossi et al., 2005). To evaluate the impact of *Wnt4* in early HSC aging, we analyzed HSCs from 8-12-month old mice. These cells would not be considered aged in the case of wild-type mice. Similar to what we had seen in younger mice, there was no difference in HSC numbers between *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BM and littermate controls (Fig. 3.11G), confirming that the absence of *Wnt4* did not promote their accumulation. Rather, when we evaluated the proportion of cycling HSCs using Ki-67, we observed reduced frequencies of active *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> CD150<sup>+</sup> LSKs in these older mice (Fig. 3.11H),



in line with the apparent increase in cell cycle inhibitors seen in younger mice. A permanent growth arrest could be further associated with cellular senescence. We therefore assessed senescence-associated- $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ gal) activity in older HSCs and observed an increased percentage of CD150<sup>+</sup> LSKs positive for SA- $\beta$ gal from *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BM as compared to littermate controls (Fig. 3.11I). This difference was not observed in young adult mice (Supplemental Fig. 3.12D). Together these results suggest that *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> HSCs present problems with activation, which would result in their decreased long-term competitive repopulation ability after transplant.

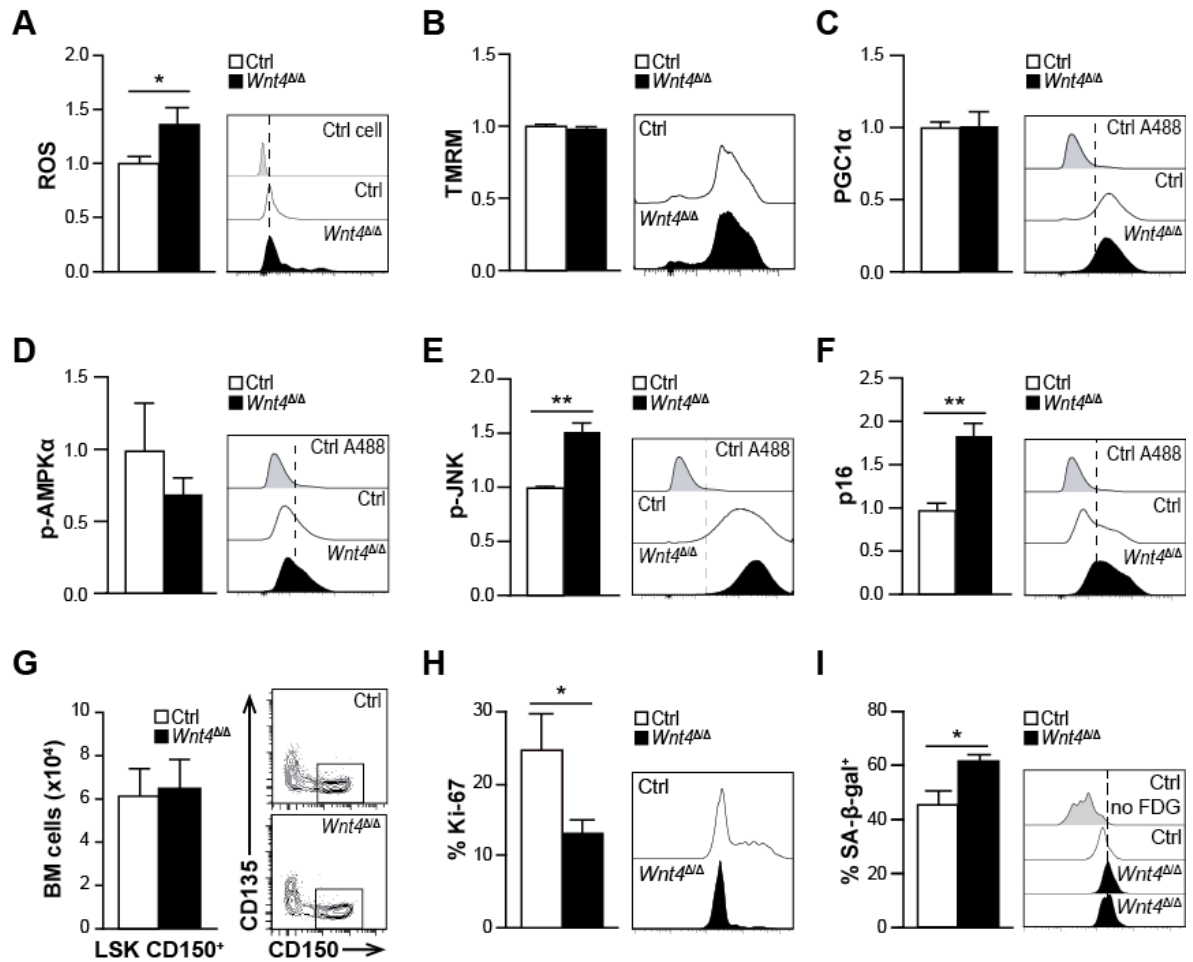


Figure 3.11 *Wnt4* depletion enforces p16INK4A expression and promotes HSC quiescence

A-F) Flow cytometry analysis (expressed as relative MFI) of A) mitochondrial superoxide (ROS), B) mitochondrial membrane potential (TMRM), C) mitochondrial numbers (PGC1  $\alpha$ ), D) cellular energy levels (phospho-AMPK $\alpha$ ), E) stress-associated phospho-JNK activity and F) cell cycle inhibitor p16/INK4A in BM CD150<sup>+</sup> LSKs from 2 to 4-month-old *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> mice and littermate controls (left panels). The data are normalized to a negative control. Representative flow cytometry data are shown on the right panels. G) Number of BM

CD150<sup>+</sup> LSKs from 8-12-month-old *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> mice and littermate controls (left panel) with representative flow cytometry analysis (right panel). Frequency of H) Ki-67 and I) SA-β-galactosidase positive cells within CD150<sup>+</sup> LSKs from 8 to 12-month-old *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> mice and littermate controls (left panels). Representative flow cytometry analyses are shown on the right. Histograms represent compiled data from 4 to 11 animals per group (mean + SEM). \*P <0.05 (two-tailed, unpaired student's t-test).

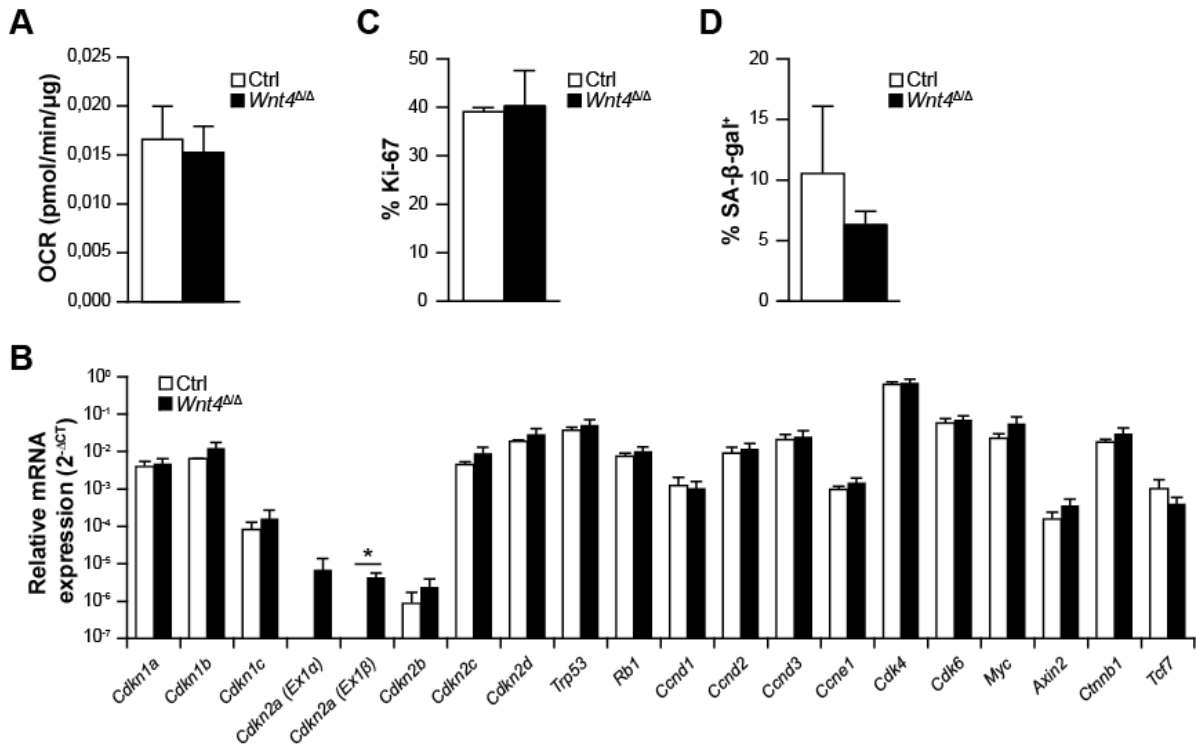


Figure 3.12 Metabolic and cell cycle analysis.

A) Oxygen consumption rate for Lin<sup>-</sup>cKit<sup>hi</sup> progenitor cells in culture. B) Relative expression of cell cycle genes by quantitative RT-PCR in LSK sorted from bone marrow. Frequency of C) Ki-67 and D) SA-β-galactosidase positive cells within CD150<sup>+</sup> LSKs from young adult *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> mice and littermate controls. \*P <0.05 (one-tailed, unpaired student's t-test). N=3 for both groups.

### 3.3.6 *Wnt4* is dispensable for short-term recovery but promotes the function of stem-cell-like progenitors after sub-lethal irradiation

To determine if aging further affected the impact of *Wnt4* on HSC activation and differentiation, we evaluated hematopoietic recovery after sub-lethal irradiation in 9-month-old *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> mice and littermate controls (Fig. 3.13A). There were no major differences in the recovery of myeloid cells or platelets in peripheral blood up to 17 days after irradiation (Fig. 3.13B, Supplemental Fig. 3.14A), although we did observe a peak of CD71<sup>hi</sup> pro-erythroblasts in *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> mice on day 14 (Fig. 3.13B). Erythroblasts were also present in larger numbers in the *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> BM and

spleen on day 14 (Supplemental Fig. 3.14B, 3.14C), while myeloid cells (granulocytes and monocytes) were specifically upregulated in the *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* spleen. These differences were lost by day 17, suggesting that the *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* mice recovered slightly more rapidly, but displayed no major overall advantage. There was no difference in the number of BM HSPCs on day 14 or day 17 (HSCs, MPPs; Fig. 3.13C), but their ability to form colonies with high proliferative potential was significantly reduced (Fig. 3.13D). This was further demonstrated by replating, which resulted in a 3-fold decrease in the number of secondary colonies from *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* BM cells (Fig. 3.13E). Similar to what was already seen at steady state, there was an increase in mitochondrial ROS levels (Fig. 3.13F) as well as in active phospho-JNK (Fig. 3.13G) in *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* HSCs. These results show that *Wnt4* is dispensable for short-term myeloid recovery, but confirm our results from the transplant experiments, indicating impaired long-term repopulating potential.

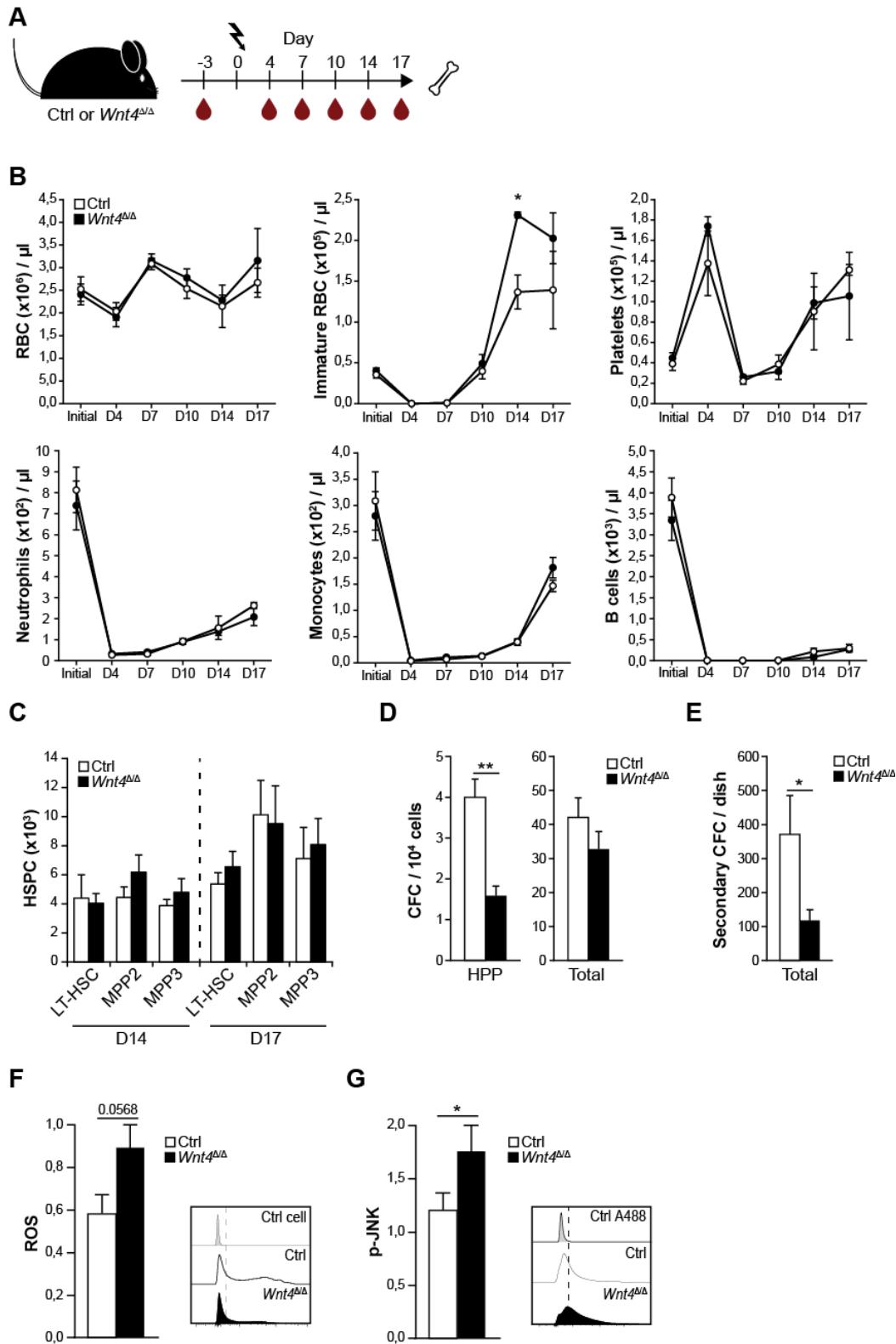
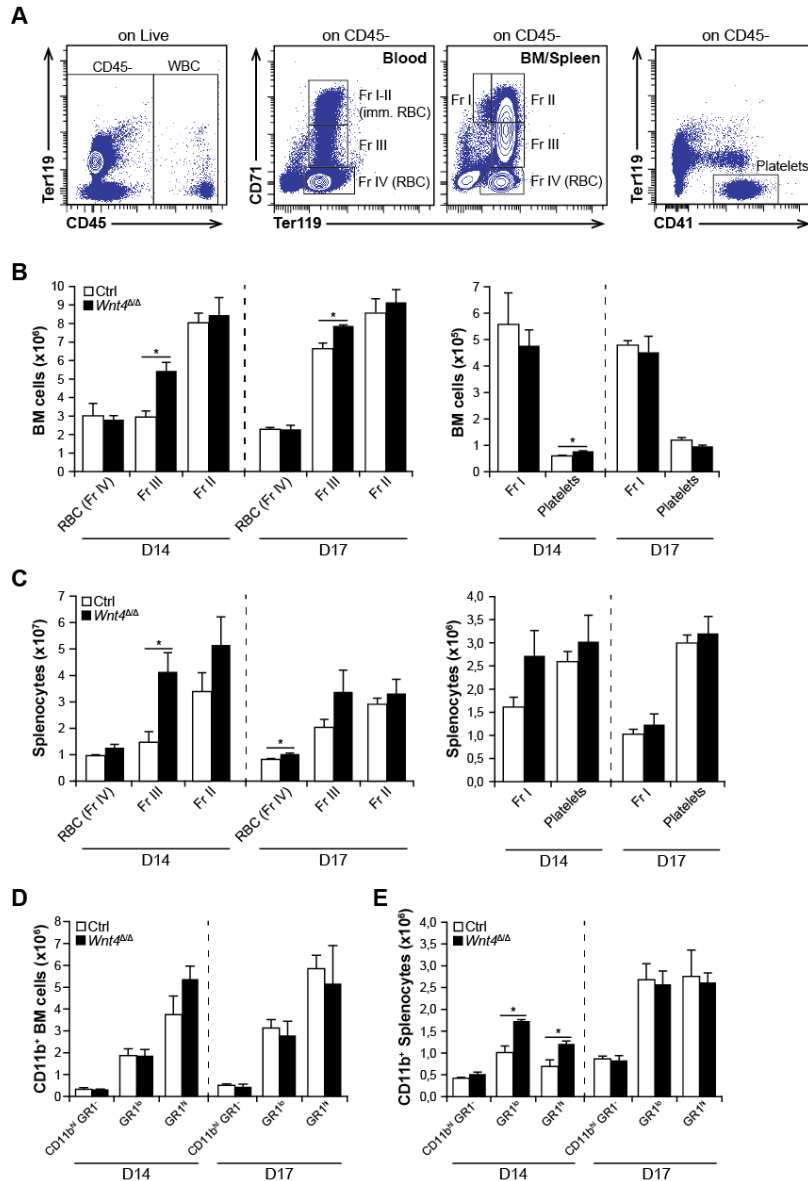


Figure 3.13 Wnt4 promotes functional recovery of stem-like progenitors with high proliferative potential

A) Experimental design of sub-lethally irradiated mice. B) Number of red blood cells (RBC), immature RBC, platelets, neutrophils (GR1<sup>hi</sup>), monocytes (GR1<sup>lo</sup>) and B cells (CD19<sup>+</sup>) in the blood of *Wnt4<sup>Δ/Δ</sup>* mice and littermate controls at different times after irradiation. C) Numbers of HSPCs in BM (one femur + one tibia) 14 days and 17 days after irradiation. D) Number of colony forming cells (CFC) with high proliferative potential (HPP) (left panel) and total CFC (right panel) having grown from 10<sup>4</sup> BM cells plated in M3434 methylcellulose-based medium. E) Number of secondary CFC after replating a fixed fraction of cells recovered from primary colonies. F-G) Flow cytometry analysis (expressed as relative MFI) of F) mitochondrial ROS and G) phospho-JNK in BM CD150<sup>+</sup> LSKs on day 17 after irradiation. The data are normalized to an unirradiated control. Representative flow cytometry data are shown on the right panel. Histograms represent compiled data from 3 animals per group for HSPCs and replated CFCs (mean + SEM) and from 6 animals per group for primary CFCs. \*P <0.05 \*\*P <0.005 (two-tailed, unpaired student's t-test).



**Figure 3.14** Wnt4 is dispensable for sort-term hematopoietic recovery after sub-lethal irradiation

**A)** Post-irradiation red blood cells (RBC) analysis template. Within live single cells, CD45 negative cells are first selected. RBCs are divided in Fractions I (CD71<sup>high</sup> Ter119<sup>low/-</sup> proerythroblasts), II (CD71<sup>high</sup> Ter119<sup>high</sup> early erythroblasts), III (CD71<sup>int</sup> Ter119<sup>high</sup>) and IV (CD71<sup>low/-</sup> Ter119<sup>+</sup> late erythroblasts and mature RBCs) using CD71 and Ter119 markers. Platelets are found in the CD41<sup>+</sup> Ter119<sup>-</sup> population within CD45<sup>-</sup> cells. CD45<sup>+</sup> cells were considered white blood cells (WBC). **B-E)** Number of cells in sub-lethally irradiated 9-month-old *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> mice and littermate controls at 14 and 17 days after irradiation. Number of RBC fractions and platelets in the **B)** BM and the **C)** spleen. Number of cells within different myeloid subsets in the **D)** BM and the **E)** spleen. The histograms represent compiled data from 3 animals per group (mean + SEM). \*P < 0.05 (two-tailed, unpaired student's t-test).

### 3.4 Discussion

Despite the existence of numerous studies on canonical Wnt signaling in HSC self-renewal and differentiation, relatively little is still known about the role of Wnt/PCP pathway (Richter et al., 2017, Staal et al., 2016). Moreover, the importance of Wnt secretion in general on BM hematopoiesis has been questioned with the development and testing of Porcupine inhibitors that interfere with Wnt post-translational processing and secretion (Kabiri et al., 2015). We have focused our study on Wnt4, a non-canonical ligand in HSPCs (Louis et al., 2008, Heinonen et al., 2011b), which has also been shown to signal in an autocrine fashion, independent of acylation and secretion (Rao et al., 2019). Wnt4 overexpression in fetal liver cells has been shown to promote thymic recovery after hematopoietic cell transplantation (Louis et al., 2008), but its direct impact on HSPCs and BM hematopoiesis has not been conclusively demonstrated. We were therefore interested in determining the impact of hematopoietic cell-intrinsic *Wnt4* deletion on HSPC fate, behavior and maintenance. Our results presented here show that Wnt4 deficiency in hematopoietic cells reduces HSC expansion and long-term self-renewal while disturbing lymphoid differentiation.

The role of Wnt4 in regulating thymus cellularity has been well established (Louis et al., 2008, Heinonen et al., 2011a, Mulroy et al., 2002), but the impact of pre-thymic Wnt4 on T lymphopoiesis has remained unclear. Most importantly, although overexpression of Wnt4 in hematopoietic cells facilitated thymic recovery after transplant (Louis et al., 2008), enhanced thymopoiesis did not correlate directly with the frequency of Wnt4 overexpressing cells (Heinonen et al., 2011b), suggesting that at least part of the impact was not cell-autonomous. Moreover, the absence of Wnt4 in the thymus stroma certainly has a dominant effect on thymus size and cannot be compensated for by the presence of precursors that have been generated in a Wnt4-sufficient BM environment (Heinonen et al., 2011a). However, Wnt4 is expressed by both fetal and BM HSPCs (Florian et al., 2013, Luis et al., 2010), in addition to BM stromal components, including those found in the vascular niche (Sugimura et al., 2012, Tan et al., 2014, Silberstein et al., 2016). We therefore generated hematopoietic-specific *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* mice, and found that although stromal Wnt4 was sufficient to maintain normal HSPC numbers, including those of lymphoid-primed Flt3<sup>+</sup> LMPPs, in contrast to conventional *Wnt4<sup>-/-</sup>* mice (Louis et al., 2008), *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* HSPCs were much less efficient in promoting lymphopoiesis as shown by a decrease in thymic cellularity (Fig. 3.1K) and in immature BM B lymphocytes (Fig. 3.1H, 3.1I). This was corroborated by *in vitro* colony-forming assays, showing reduced B-lymphoid potential in the *Wnt4<sup>ΔΔ</sup>* BM (Fig. 3.3C). We

therefore conclude that both intrathymic and BM Wnt4 are important for promoting T lymphopoiesis and appear to act via discreet but complementary mechanisms.

HSPCs are responsible for the replenishment of the immune system by maintaining homeostatic peripheral blood cells counts at steady state and by adapting the output in response to inflammation to generate increased numbers of myeloid cells to counter pathogens (Boettcher and Manz, 2017). Among other receptors to recognize pro-inflammatory cues, HSPCs express TLR4, and its stimulation by LPS induces stem cells to quit their dormant state and promotes a myeloid bias (Nagai et al., 2006, MacNamara et al., 2011) via cell-intrinsic and –extrinsic mechanisms. When persistent, LPS stimulation will lead to HSC exhaustion and the depletion of lymphocyte potential (Takizawa et al., 2017, Liu et al., 2015). Furthermore, inflammatory cytokines, such as IL-1  $\beta$  (Pietras et al., 2016) and IFN- $\gamma$  (de Bruin et al., 2013, de Bruin et al., 2012) can directly promote myeloid-biased differentiation and, in the long-term, impair HSC self-renewal. Although *Wnt4* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  HSC numbers were not affected at steady state (Fig. 3.3B, 3.7A), their expansion was reduced in response to LPS in *Wnt4* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  BM (Fig. 3.7A). *Wnt4* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  BM environment was rich in pro-inflammatory cytokines, including IL-1  $\alpha/\beta$ , IL-12, and IFN- $\gamma$ , and in IFN- $\gamma$ -responsive chemokines, CXCL9, CXCL10 and CXCL11, indicating that Wnt4 would have an anti-inflammatory effect in the BM. Interestingly, myeloid-specific Wnt4 deletion using LysMCre mice did not have the same impact, indicating that the impact of Wnt4 on HSPCs was not due to its absence in surrounding myeloid cells (Fig. 3.9A), although they comprise a significant proportion of BM hematopoietic cells. LPS-mediated cytokine storm has been shown to involve peritoneal CD5<sup>+</sup> B1a lymphocytes (Weber et al., 2015) that would not be affected by LysM-Cre-mediated deletion. However, HSPCs may also directly contribute to cytokine secretion (Zhao et al., 2014a), which could alter the BM environment in Vav-Cre *Wnt4* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  mice. Alternatively, the absence of Wnt4 may sensitize HSPCs to stress (as suggested by increased ROS, phospho-JNK and p16<sup>INK4a</sup> expression in *Wnt4* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  HSPCs). Inflammatory cell death would then lead to the release of DAMPs (or death-associated molecular patterns) that will further promote the secretion of inflammatory cytokines and contribute to decreased HSPC function (Wagner et al., 2019). Overexpression of Wnt4 in osteoblasts inhibits NF- $\kappa$ B, thereby reducing inflammation in mouse model of osteoporosis (Wang et al., 2014b). Our results imply that hematopoietic Wnt4 has a similar function in regulating inflammation in the BM.

Wnt4 has been associated with various intracellular signaling pathways in different cell types (Wang et al., 2014b, Bernard et al., 2008, Ring et al., 2014), but its role in HSPCs appears  $\beta$ -catenin-independent and rather dependent on the PCP receptor Fzd6 (Louis et al., 2008,



Heinonen et al., 2011b). Non-canonical Wnt signaling has been alternatively linked to HSC maintenance (Sugimura et al., 2012, Abidin et al., 2015, Lhoumeau et al., 2016) or ageing (Florian et al., 2013), depending on the individual ligands and receptors under study. Notably, Wnt/PCP receptors have been mostly associated with HSC maintenance, either via suppression of  $\beta$ -catenin and IFN-mediated HSC activation (Sugimura et al., 2012) or by regulating HSC migration and cell cycle (Lhoumeau et al., 2016). Although we observed increased inflammation in the *Wnt4* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  BM, including the secretion of IFN-responsive factors, *Wnt4* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  CD150<sup>+</sup> LSKs did not show consistently enhanced  $\beta$ -catenin activation, in contrast to what was shown for *Fzd8*<sup>-/-</sup> or *Celsr2/Fmi*<sup>-/-</sup> HSCs (Sugimura et al., 2012). It remains still possible that a subpopulation of cells could display such an increase in canonical Wnt signaling, but it would not appear to lead to increased HSC activation. To the contrary, there was a decrease in Ki-67<sup>+</sup> cycling HSCs in older *Wnt4* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  mice, as well as an increased expression of the cell cycle inhibitor CDKN2A (p16<sup>INK4a</sup>). These results are more in line with the phenotype of *Ptk7*<sup>-/-</sup> mice (Lhoumeau et al., 2016), whose functional HSC pool is diminished due to increased quiescence combined with impaired migration. There is no difference in the number of donor-derived HSPCs in the BM of primary transplant recipients, suggesting that *Wnt4* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  HSPCs are able to reach the BM and settle there. Although we cannot formally exclude the possibility of impaired migration, similar to *Ptk7*<sup>-/-</sup> (Lhoumeau et al., 2016) or *Wnt5a*<sup>+/-</sup> mice (Schreck et al., 2017), our results with LPS stimulation (Fig. 4) and the sublethal irradiation model (Fig. 3.13) demonstrate that *Wnt4* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  HSPCs present deficiencies in expansion and/or self-renewal even in their native environment. Interestingly, p16<sup>INK4a</sup> expression has been associated with decreased repopulation capacity independent of homing to the BM (Janzen et al., 2006).

The reason behind enforced p16<sup>INK4a</sup> expression in *Wnt4* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  HSCs remains still unknown. One possible mechanism is the increased activation of the stress-associated kinase JNK in *Wnt4* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  HSCs. Although JNK activation is one of the hallmarks of Wnt/PCP pathway, and exogenous Wnt4 promotes JNK phosphorylation (Heinonen et al., 2011b, Louis et al., 2008), JNK phosphorylation is also enhanced at baseline in HSCs lacking the putative Wnt4 receptor *Fzd6* (Abidin et al., 2015). Moreover, JNK activity is also linked to different types of cellular stress, and it can promote both survival and death, depending on the strength and duration of the signal, making the interpretation of the result less straightforward.

### **3.5 Conclusion**

These results identify a new, largely autocrine role of Wnt4 in HSC self-renewal and hematopoiesis. We report here that hematopoietic Wnt4 favors HSC maintenance, particularly in a situation of BM recovery, likely in part by regulating cell cycle. Moreover, hematopoietic Wnt4 deficiency leads to the development of a pro-inflammatory BM environment, which would contribute to decreased lymphopoiesis. Wnt4 expression is reported to be downregulated in leukemia (Wang et al., 2016), where the lack of Wnt4 could also contribute to inflammation and the loss of HSC function. Based on these data, Wnt4 represents an intriguing candidate to promote efficient hematolymphopoiesis and to modulate HSC differentiation and self-renewal.

#### **Acknowledgements**

We are grateful to Drs. Claude Perreault (University of Montreal, QC) and Seppo Vainio (Oulu University, Finland) for the gift of *Wnt4<sup>fl/fl</sup>* mice; to Dr. Géraldine Delbès (INRS-AFSB) for access to cell sorting; and to the staff of the Centre National de Biologie Expérimentale for excellent animal care.

#### **Disclosure of potential conflicts of interest**

The authors have no interests to disclose.

#### **Data availability statement**

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

## 4 DISCUSSION ET CONCLUSIONS

---

### 4.1 Les systèmes LysM-Cre et Vav-iCre

La fonction du ligand non canonique Wnt4 n'est pas encore connue dans les macrophages et peu étudiée dans les cellules souches hématopoïétiques. Ces travaux ont permis d'identifier un nouveau rôle métabolique et fonctionnel de Wnt4 dans les macrophages et dans les cellules souches hématopoïétiques respectivement. L'utilisation du système Cre-loxP est un puissant outil pour étudier la fonction de gènes spécifiques aux cellules ou aux tissus chez la souris. Cette technique repose sur la reconnaissance de l'enzyme recombinase (Cre) du site LoxP tous deux issus des bactériophages P1 (Kwan, 2002). Concrètement, l'obtention de souris déficientes en un gène donné nécessite deux lignées de souris transgéniques. La première comprend le gène *Cre* sous le contrôle du promoteur du gène d'intérêt A (*LysM*). Ensuite, ces souris sont croisées avec une autre lignée de souris transgéniques comportant deux copies des gènes des sites LoxP qui dans notre modèle sont insérés aux deux extrémités du gène d'intérêt B (*Wnt4*) pour obtenir les souris homozygotes Cre+LoxP<sup>+/+</sup> (Kwan, 2002, Shi et al., 2018).

En vue d'étudier l'impact de la délétion de Wnt4 sur les macrophages, nous avons utilisé le système LysM-Cre. Ce système cible les lysozymes qui sont des enzymes antimicrobiaux produits par les cellules de l'immunité innée dans les eucaryotes (Akinbi et al., 2000). Le gène *Lyz2* code pour le lysozyme M (LysM) qui est exprimé par les monocytes, les macrophages et les granulocytes (Cross and Renkawitz, 1990, Shi et al., 2018). Donc, en utilisant le système LysM-Cre nous avons inactivé l'expression de *Wnt4* dans la population myélomonocytaire. Par ailleurs, pour l'étude du rôle de Wnt4 dans les CSH nous avons utilisé le système Vav1-iCre. iCre est la forme améliorée de la Cre recombinase conventionnelle, elle contient moins de sites CpG ce qui la rend moins susceptible aux modifications épigénétiques, ce qui augmente sa spécificité et son efficacité (Shimshek et al., 2002). La protéine Vav1 fait partie de la famille des GEF qui active les RhoGTPases en facilitant l'échange du GDP en GTP (Hornstein et al., 2004). De plus, le gène *vav1* est exprimé dans toutes les lignées hématopoïétiques qui proviennent des CSH définitives dans le foie fœtale (de Boer et al., 2003, Ogilvy et al., 1998, Farago et al., 2020).

En somme, les systèmes LysM-Cre et Vav1-iCre ont permis l'étude de l'effet intrinsèque du ligand Wnt4 sur les macrophages et les CSH. Néanmoins, nous ne pouvons exclure l'effet des autres Wnt de l'environnement qui peuvent prendre le relais et compenser. En effet, les macrophages sont une source et des récepteurs pour les protéines Wnt (Malsin et al., 2019). Quant aux CSH, elles sont maintenues dans un environnement où les ligands Wnt sont en

abondance (Fleming et al., 2008, Ichii et al., 2012). Considérant que Wnt4 est présent dans la niche hématopoïétique et qu'il est exprimé par les précurseurs endothéliaux, les cellules mésenchymateuses (Nestin<sup>+</sup>), les ostéoblastes et les fibroblastes (Sugimura et al., 2012, Heinonen et al., 2011b), alors les CSH sont sujettes à une influence paracrine par Wnt4. Par conséquent, les CSH ne sont pas totalement privées de l'impact de Wnt4.

En résumé, il est difficile de déceler ou d'affirmer de façon catégorique que les phénotypes engendrés dans les deux systèmes utilisés sont propres et exclusifs à la délétion de Wnt4 et faire abstraction de l'éventuelle implication des autres ligands Wnt de l'environnement qui d'ailleurs activent dans certains cas la même voie de signalisation. Il serait intéressant d'approfondir ces recherches en bloquant les autres Wnt ou les voies de signalisations Wnt qui pourraient interférer et avoir un rôle de compensation. Par exemple, bloquer la voie de Wnt/ $\beta$ -caténine dans les CSH *Vav1-iCre Wnt4<sup>Δ/Δ</sup>* et refaire l'évaluation fonctionnelle de ces cellules en procédant à une greffe compétitive et en série dans des souris receveuses irradiées tel que réalisé avec les CSH *Vav1-iCre Wnt4<sup>Δ/Δ</sup>*. Cette expérience peut être effectuée en ajoutant un inhibiteur de la voie canonique, plus précisément un inhibiteur de la tankyrase, une enzyme qui bloque la phosphorylation de l'Axine, ce qui aboutit à la destruction de la  $\beta$ -caténine par le complexe GSK3- $\beta$ . Cet inhibiteur est nommé G007-LK et se démarque par sa stabilité et sa biodisponibilité ainsi qu'une efficacité prouvée *in vivo* (Lau et al., 2013). Expérimentalement, le G007-LK peut être administré aux souris *Vav1-iCre Wnt4<sup>Δ/Δ</sup>* par la nourriture (400 $\mu$ g d'inhibiteur par jour pendant quatre semaines), ce protocole a été utilisé auparavant pour étudier l'effet de l'inhibition de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine sur l'ostéogenèse *in vivo* (Fujita et al., 2018). Par la suite, procéder à une greffe compétitive en série des CSH *Vav1-iCre Wnt4<sup>Δ/Δ</sup>* provenant des souris traitées au G007-LK et analyser leur capacité de reconstitution de souris receveuses irradiées. Enfin, comparer les résultats obtenus avec G007-LK aux ceux obtenus sans traitement. Bien qu'une surexpression de Wnt4 dans les cellules du foie fœtal a montré une augmentation des progéniteurs hématopoïétiques dans des souris irradiées (Louis et al., 2008), il n'y a cependant pas encore d'études qui montrent un lien direct entre la surexpression de Wnt4 dans les CSH et l'augmentation de la capacité de reconstitution. Dans l'optique de démontrer l'effet propre de Wnt4 sur la fonction des CSH, il serait intéressant de surexprimer Wnt4 spécifiquement dans les CSH et de procéder à des greffes compétitives. La surexpression de Wnt4 dans les cellules de la moelle osseuse permettrait d'étudier la fonction de Wnt4 dans un système adulte comparativement à la surexpression dans le foie fœtal et de maintenir ainsi le même paramètre de l'âge étudié dans les souris *Vav1-iCre Wnt4<sup>Δ/Δ</sup>*. Cette expérience pourrait être réalisée selon les étapes décrites ci-dessous. Tout d'abord, isoler les cellules de la moelle osseuse des souris

préalablement traités par le 5-fluorouracile (5-FU). Ensuite, cultiver la suspension cellulaire dans un milieu qui les stimule (DMEM, 15% FBS, 10 ng/ml IL-6, 6 ng/ml IL-3 et 100 ng/ml le ligand c-Kit) pendant 48h. Puis, les cellules sont resuspendues dans le même milieu qui contient du polybrène (6µg/ml). L'ajout du polybrène est nécessaire pour assurer l'efficacité de l'infection des cellules par le rétrovirus. Finalement, les cellules sont mises en coculture avec des cellules GP+E-86 (fibroblastes) irradiées et transfectées avec un vecteur viral contenant le gène Wnt4-GFP (Kroon et al., 1998, Thorsteinsdottir et al., 2002, Louis et al., 2008). 48h après la coculture, les cellules de la moelle osseuse peuvent être collectées et injectées en intraveineuse à des souris irradiées suivant le protocole des greffes compétitives (Hetu-Arbour et al., 2021b). Concernant les macrophages, un séquençage ARN serait adéquat afin d'identifier les autres ligands Wnt exprimés dans les macrophages LysM-Cre *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup>. Ensuite, nous pourrions cibler ceux qui sont les plus fortement exprimés et les bloquer dans les macrophages LysM *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup> *in vitro*, ou encore surexprimer Wnt4 dans les macrophages. Puis, analyser les paramètres métaboliques étudiés dans les macrophages LysM-Cre *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup> pour pouvoir les comparer aux macrophages LysM-Cre *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup> en présence des inhibiteurs Wnt ou à ceux qui surexpriment Wnt4.

En conclusion, ces différentes expériences pourront démontrer avec certitude la contribution éventuelle des autres ligands Wnt ainsi que le rôle spécifique de Wnt4 dans les macrophages et CSH.

## 4.2 Le rôle de Wnt4 dans les macrophages

La délétion de Wnt4 dans les macrophages stimule leur métabolisme énergétique. En effet, nous avons démontré que l'absence de Wnt4 dans les macrophages leur confère un métabolisme mitochondrial prononcé. De plus, nous avons mis en évidence l'implication des lipides comme substrat dans l'augmentation de l'activité de l'OXPPOS. Tout bien considéré, les macrophages déficients en Wnt4 (LysM *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup>) sont métaboliquement plus actifs, mais n'adoptent pourtant pas de biais M1 ou M2 en particulier. Par conséquent, l'impact biologique de ces observations n'est pas encore totalement élucidé. En revanche, la mise des macrophages dans un contexte infectieux nous a permis d'identifier que l'absence de Wnt4 est bénéfique pour la survie et/ou la réplication du parasite *Leishmania donovani* ce qui est par conséquent nocif pour l'hôte.

D'ailleurs, l'étude des ligands Wnt dans les infections parasitaires de type *Leishmania* n'est pas encore bien explorée à l'exception du ligand non canonique Wnt5a. Effectivement, Wnt5a a été récemment identifié comme étant impliqué dans l'infection par *L. donovani*. En effet, l'infection de macrophages par *L. donovani* diminue considérablement l'expression de Wnt5a. Toutefois,

l'ajout exogène de Wnt5a diminue la charge parasitaire mais n'affecte pas la phagocytose du parasite (Chakraborty et al., 2017). Ces données suggèrent que les modifications apportées par Wnt5a sont au niveau du maintien intracellulaire du parasite. En effet, Wnt5a modifie le cytosquelette d'actine via la voie RhoGTPase qui favorise la fusion des endosomes/lysosomes pour la dégradation du parasite et augmente l'activité de NOX. La délétion de Wnt5a dans les macrophages infectés *in vitro* augmente la survie parasitaire (Chakraborty et al., 2017) ce qui est similaire aux données obtenues avec les macrophages LysM *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup> infectés par *L. donovani*. Tout compte fait, à la suite de l'infection des macrophages par *L. donovani* les deux ligands non canoniques Wnt5a et Wnt4 ne semblent pas compenser l'un pour l'autre dans ce contexte, étant donné que l'absence de l'un ou l'autre engendre le même phénotype. Dans cette optique, il serait judicieux d'approfondir les recherches en vue de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques qui pourraient contrer le changement de l'environnement provoqué par le parasite. Tout d'abord, la confirmation de la diminution de la charge parasitaire à la suite de la délétion de Wnt4 dans les macrophages *in vivo* serait essentielle pour la concrétisation de l'observation. Pour cette expérience il serait plus adéquat d'utiliser un modèle de souris Csf1r-Cre *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup> pour assurer une délétion plus efficace dans les macrophages de la rate comparé au système LysM *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup> qui montre une délétion de seulement 40% dans les macrophages de la rate (Shi et al., 2018). De plus, le maintien de la survie du parasite suggère que les macrophages LysM *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup> ont acquis des fonctions anti-inflammatoires. Pour ce faire, il serait intéressant d'analyser les caractéristiques des macrophages M2 telles que l'expression des marqueurs de surface CD206 et CD301 ainsi que les gènes associés au profil M2 (*Ym1*, *Fizz1*) et de mesurer l'activité de l'arginase. L'infection par *L. donovani* induit un biais myéloïde et amorce l'hématopoïèse d'urgence (Abidin et al., 2017). Pour cette raison il serait intéressant d'analyser les cytokines présentes dans l'environnement de la MO et de la rate grâce à la technique du « *Proteome profiler* ». Ces éléments pourront identifier le profil entrepris par les macrophages déficients en Wnt4 lors de l'infection par *L. donovani*. Ensuite, déterminer si le phénotype M2 induit dans les macrophages infectés par *L. donovani* lors de l'absence de Wnt4 est aussi accompagné de modulations métaboliques. Dans ce contexte, l'investigation du métabolisme mitochondriale devient importante. Par la technologie « *Seahorse* », il est possible d'analyser l'activité mitochondriale et l'implication de la glycolyse dans les macrophages infectés par *L. donovani*. De surcroît, l'évaluation de l'état oxydatif cellulaire est importante dans les infections aux *Leishmania*. Bien que la génération des ROS soit dans la plupart des cas un indicateur de l'inflammation et de la destruction des pathogènes (Hong et al., 2019), cette observation n'est tout de même pas appliquée lors des infections par les parasites *Leishmania*. Il est constaté que pour acquérir la

virulence, le parasite se différencie de la forme promastigote à la forme amastigote à l'intérieur du macrophage (Killick-Kendrick, 1990). Cette différenciation requiert la présence des ROS (Khan et al., 2018, Mittra et al., 2013). En outre, le stress oxydatif enclenche l'autophagie, un mécanisme de survie pour contrer l'effet toxique sur la cellule (Li et al., 2015, Filomeni et al., 2015).

L'autophagie consiste à la formation d'une double membrane (phagophore) qui sert à encapsuler le contenu à dégrader et constituera l'autophagosome plus tard. Ce mécanisme implique 16 complexes protéiques identifiés par Atg et des systèmes de conjugaisons « ubiquitine like » qui forment des Atg modifiés, l'Atg12-Atg5 et l'Atg8-phosphatidylethanolamine (Atg8-PE) ou LC3-PE dans les mammifères (Yorimitsu and Klionsky, 2005). Ces deux complexes sont impliqués dans la formation du phagophore et de la formation finale de l'autophagosome respectivement (Zachari and Ganley, 2017, Yorimitsu and Klionsky, 2005). Chez les mammifères, l'initiation de l'autophagie se déroule par deux complexes ULK1 (Atg13, ULK1, Atg101, FIP200) et le VPS34 (Pi3K de type III, Vps15, Beclin1, Atg14). ULK1 transloque au site d'initiation de l'autophagie et recrute le second complexe VPS34. Ce dernier produit le PI3P (phospholipide phosphatidylinositol 3-phosphate) au niveau du phagophore qui par conséquent recrute les protéines WIPI2B et DFCP1. Ces étapes aboutissent à la formation et l'expansion de l'autophagosome et sont donc essentielles à sa biogenèse et à sa fusion subséquente avec les lysosomes pour la dégradation de son contenu (Meijer and Codogno, 2004, Zachari and Ganley, 2017). En effet, l'activité autophagique est vitale pour la survie des parasites *Leishmania* et à leur virulence (Franco et al., 2017). Les parasites de la leishmaniose cutanée (*major*) et viscérale (*donovani*) expriment le gène *Atg8* sur leur chromosome 19 qui s'accumule autour des mitochondries ce qui indique que l'infection par *leishmania* mène à une activité mitochondriale anormale incitant son élimination. De plus, la délétion d'*Atg8* ou d'*Atg5* du parasite augmente la vulnérabilité des promastigotes aux ROS et prévient leur différenciation en amastigotes (Giri and Shaha, 2019, Besteiro et al., 2006, Williams et al., 2012). Ainsi, l'autophagie est un mécanisme important pour le maintien du parasite *Leishmania*.

Bien que nous avons montré que l'autophagie est maintenue dans les macrophages LysM *Wnt4*<sup>Δ/Δ</sup> non infectés, il est cependant clair que la diminution de LC3-II en absence de *Wnt4* induit une altération dans l'initiation de l'autophagie. Ce résultat peut être expliqué par la diminution de l'activité de ERK1/2. En effet, il a été montré que la voie MEK/ERK1/2 induit l'autophagie en inhibant mTOR. L'inhibition de mTOR active l'expression de la protéine Beclin-1 et amorce par conséquent le mécanisme autophagique (Wang et al., 2009). Par contre, l'inactivation de ERK1/2 inhibe partiellement la réponse autophagique mais ne la bloque pas. En

effet, il a été démontré que l'autophagie peut quand même être activée par l'action de MEK en absence de l'activité de ERK1/2 qui dans ce contexte MEK est activée par AMPK (Wang et al., 2009). Donc, l'action de ERK1/2 sur l'induction de l'autophagie n'est pas essentielle.

Nos résultats montrent que l'absence de Wnt4 augmente la survie du parasite *L. donovani*. Ces données suggèrent que l'augmentation de la survie parasitaire implique le mécanisme de l'autophagie d'une part et l'effet de la délétion intrinsèque de Wnt4 d'autre part. En perspective il serait intéressant d'approfondir cette piste et d'évaluer en premier lieu le mécanisme de l'autophagie en réponse à l'infection par *L. donovani* dans les macrophages LysM *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup> et les contrôles. Il est possible de détecter les vacuoles autophagiques par le colorant fluorescent MDC (monodansylcadaverine) (Niemann et al., 2000, Niemann et al., 2001) et aussi d'évaluer les différentes étapes du processus autophagique : 1) l'initiation, 2) la formation de l'autophagosome et 3) la fusion de l'autophagosome avec le lysosome. Ces étapes peuvent être analysées par l'évaluation de l'expression de Beclin-1 par Western Blot, de LC3-II par immunofluorescence et par la colocalisation de LC3-II avec LAMP-1 respectivement. En deuxième lieu, surexprimer Wnt4 dans les macrophages et les infectés avec *L. donovani* afin de déterminer si l'augmentation de la survie parasitaire est spécifique au Wnt4 intrinsèque ou à un effet compensatoire des autres Wnt exprimés par les macrophages. À cet effet, il faudra comparer la charge parasitaire lors de la surexpression de Wnt4 et les contrôles et évaluer l'impact de Wnt4 sur la virulence des parasites donc leur différenciation de promastigotes en amastigotes dans les macrophages. Ces expériences pourront apporter de nouvelles données quant à l'effet de Wnt4 sur la progression de l'infection par *L. donovani*.

Bien que Wnt5a soit connu pour maintenir les fonctions immunitaires inflammatoires des macrophages lors d'infections virales ou bactériennes ou par une stimulation par LPS (Naskar et al., 2014), Wnt4 semble avoir l'effet opposé. La stimulation par LPS des macrophages LysM *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup> induit plus de stress oxydatif que celui produit par les contrôles. En outre, ils ont une OCR plus faible ce qui dénote d'une activité mitochondriale plus faible, ceci suggère que les LysM *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup> traités au LPS sont plus glycolytiques. Il est établi que la stimulation du TLR4 par LPS induit l'activation de l'autophagie pour permettre l'élimination du pathogène (Xu et al., 2007). Cependant, une production excessive de NO inhibe la synthèse de l'autophagosome (Sarkar et al., 2011). Par ailleurs, le blocage du flux autophagique dans les macrophages induit une inflammation excessive (Agrawal et al., 2015). Ces données suggèrent encore une fois que l'autophagie peut être altérée dans les macrophages LysM *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup> traités au LPS et nécessite



plus d'investigations. En résumé, dans ce contexte l'absence de Wnt4 promeut la fonction inflammatoire des macrophages lors d'une stimulation par LPS.

Finalement, les données actuelles ne permettent pas de déterminer un seul rôle fonctionnel clair du ligand Wnt4 dans les macrophages. Tout de même, sa fonction biologique semble être façonnée dépendamment du contexte environnemental. De sorte que son absence induit une fonction anti-inflammatoire dans les infections intracellulaires, alors qu'elle engendre une fonction inflammatoire lors d'une stimulation par LPS. Néanmoins, l'autophagie semble être le mécanisme en commun qui pourrait être modulé dans les différentes situations.

### 4.3 Le rôle de Wnt4 dans les cellules souches hématopoïétiques

L'étude de la délétion de Wnt4 dans les CSH a contribué à élucider un rôle fonctionnel du ligand Wnt4 dans les cellules hématopoïétiques. Son absence affecte non seulement la taille cellulaire de la MO, de la rate et du thymus en général, mais diminue aussi la différenciation lymphoïde. De plus, les CSH déficientes en Wnt4 (*Vav-iCre Wnt4<sup>Δ/Δ</sup>*) sont dysfonctionnelles à long terme. Elles ont une capacité d'autorenouvellement faible qui les rend incapables de reconstituer les lignées hématopoïétiques chez des souris soumises à une irradiation létale. En outre, les CSH *Vav-iCre Wnt4<sup>Δ/Δ</sup>* répondent inefficacement au stress physiologique induit par LPS. Par conséquent, elles ne sont pas aptes à se maintenir au sein de la MO et donc à s'autorenouveler. En résumé, ces données décrivent clairement que Wnt4 est essentiel au maintien et à l'autorenouvellement des CSH, de sorte qu'il puisse être considéré comme un élément indispensable pour le bon fonctionnement des greffes de la MO. Par ailleurs, bien que les CSH *Vav-iCre Wnt4<sup>Δ/Δ</sup>* montrent des signes d'épuisement, il n'est toujours pas possible d'affirmer le mécanisme exact par lequel Wnt4 contrôle la fonction des CSH. Effectivement, l'augmentation des ROSmt et de JNK témoigne de l'augmentation du stress oxydatif dans les CSH qui pourrait être responsable de la perte de leur fonction observée. Cependant, l'implication de l'autophagie demeure le mécanisme métabolique principal impliqué dans le maintien des CSH dans la MO. Une inhibition de l'autophagie dans les CSH adultes interfère grandement avec leur activité et les prédispose à un vieillissement prématuré ce qui induit par conséquent une diminution de la capacité d'autorenouvellement des CSH ainsi qu'une augmentation du biais myéloïde (Ho et al., 2017, Mortensen et al., 2011a, Revuelta and Matheu, 2017). En effet, une greffe compétitive et en série de CSH *Vav-iCre Atg7<sup>Δ/Δ</sup>* où la formation de l'autophagosome est inhibée ne parvient pas à reconstituer ni à court et ni à long terme la MO des souris receveuses indépendamment du ratio initial (CSH/CSH *Vav-iCre Atg7<sup>Δ/Δ</sup>*) injecté aux souris. De plus, une

greffe non compétitive de CSH Vav-iCre *Atg7*<sup>ΔΔ</sup> engendre la mort des souris receveuses dans un intervalle de quatre semaines post-greffe (Mortensen et al., 2011b). Ces observations confirment la perte de fonction des CSH à la suite à la déficience de l'autophagie. Également, les souris Vav-iCre *Atg7*<sup>ΔΔ</sup> se distinguent par un profil myéloprolifératif avec une infiltration myéloïde atypique qui exprime fortement le marqueur CD47. Ce marqueur donne le signal « ne me mange pas » ce qui permet aux cellules d'échapper à la phagocytose (Mortensen et al., 2011a, Mortensen et al., 2011b). Étant donné que CD47 est aussi surexprimé dans leucémies myéloïdes aiguës (Chao et al., 2019), il contribue donc à l'invasion tumorale. Dans ce cas, la perte d'autophagie dans les CSH contribuerait possiblement à l'apparition et/ou la progression des leucémies myéloïdes. En outre, la perte d'autophagie module le métabolisme des CSH. Effectivement, des CSH déficientes en *Atg7* ou *Atg12* montrent une augmentation des ROSmt et une accumulation de mitochondries allongées et fusionnées. Ainsi que des dommages à l'ADN et une augmentation de caspase-3 qui sont des signes de l'apoptose (Ho et al., 2017, Mortensen et al., 2011a). Ces résultats montrent donc une diminution de la survie des cellules. De plus, les CSH *Atg12*<sup>ΔΔ</sup> sont plus actives, elles ont une taille plus importante, une augmentation de la consommation de glucose, d'ATP et d'NADPH ainsi qu'une augmentation de l'OXPPOS (Ho et al., 2017). Pour conclure, la perte d'autophagie augmente l'activité métabolique des CSH. L'impact de la perte de l'autophagie sur l'activité des CSH se déroule par des modifications épigénétiques. En effet, les CSH *Atg12*<sup>ΔΔ</sup> montrent un profil de méthylation de l'ADN altéré se traduisant par une augmentation aberrante d'α-KG, un cofacteur essentiel pour les déméthylases (Ho et al., 2017, Kohli and Zhang, 2013) et un métabolite du cycle de Krebs. Par conséquent, la déméthylation de l'ADN est la conséquence directe de l'augmentation du métabolisme mitochondriale qui mène à la perte fonctionnelle des CSH et à la différenciation myéloïde rapide.

Les résultats que nous avons obtenus avec la délétion de *Wnt4* engendrent de la même manière une perte fonctionnelle des CSH. En d'autres termes, l'incapacité à reconstituer des souris receveuse irradiées à long terme, une perte rapide de la différenciation lymphoïde et une augmentation de la génération de colonies myéloïdes suggérant le maintien du biais myéloïde. Ces critères ressemblent à ceux rapportés dans le vieillissement précoce ainsi que dans la perte du processus autophagique dans les CSH (Mejia-Ramirez and Florian, 2020). Plus encore, nous avons aussi montré une augmentation des ROSmt suggérant une augmentation de l'activité mitochondriale telle qu'observée dans les CSH *Atg12*<sup>ΔΔ</sup>. Cependant, l'analyse de l'OCR montre un niveau similaire de l'activité des mitochondries des CSH Vav-iCre *Wnt4*<sup>ΔΔ</sup> à celle des contrôles. Ce résultat peut être expliqué par le nombre très limité des CSH isolées des souris, étant donné que c'est une population rare. Effectivement, due à la variation induite par la machine,

il est conseillé de faire un minimum de six réplicats de chaque souris. Dans notre cas, nous n'avions pas la quantité suffisante de cellules, ce qui nous a limités à 3 réplicats de chaque souris pour un total de  $n=3$ . Ces données ne peuvent certainement pas confirmer hors de tous doutes qu'il n'y a pas d'impact sur l'activité de l'OXPPOS certes, toutefois le maintien du potentiel mitochondrial membranaire ( $\Delta\psi_m$ ) mesuré par le colorant cationique, le tétraméthylrhodamine ester méthylique (TMRM) indique que l'intégrité des mitochondries des CSH Vav-iCre Wnt4<sup>ΔΔ</sup> n'est pas affectée et donc l'augmentation des ROSmt ne provient pas d'une dégradation mitochondriale. Le  $\Delta\psi_m$  est généré par le gradient des protons expulsés de la matrice mitochondriale par les complexes I-III et IV vers l'espace intermembranaire. Ce  $\Delta\psi_m$  fournit la force nécessaire à l'influx des protons dans la matrice à travers le complexe V pour produire de l'ATP. Par conséquent, une perturbation menant à la rupture de l'intégrité des membranes mitochondriales inciterait une altération du  $\Delta\psi_m$ . Dans notre modèle l'augmentation des ROSmt associée au maintien du niveau des TMRM suggère que l'augmentation des niveaux des ROSmt pourrait corrélérer avec une augmentation de l'activité de l'OXPPOS d'un côté et d'un autre côté l'augmentation des ROSmt pourrait être simplement un indicateur de l'accumulation des mitochondries qui n'est pas régulée par l'autophagie ce qui corroborerait une diminution de l'autophagie. Les deux possibilités excluent une altération structurale des mitochondries.

En résumé, ces données suggèrent fortement que le stress oxydatif engendré par les mitochondries suite à la délétion intrinsèque de Wnt4 n'est ni contrôlé et/ou contrôlé ce qui mène à la perte fonctionnelle des CSH. Etant donné qu'une perte de l'autophagie dans les CSH induit des répercussions similaires aux résultats obtenus en réponse à la délétion intrinsèque de Wnt4 telles qu'une accumulation des mitochondries et une augmentation des ROSmt qui affectent le maintien des CSH, par conséquent l'impact de l'absence de Wnt4 dans les CSH sur le mécanisme de l'autophagie reste une piste privilégiée (Mortensen et al., 2011a). D'ailleurs, l'inhibition de mTORC1 induit l'activation de l'autophagie et donc le maintien des CSH (Nguyen-McCarty and Klein, 2017). L'analyse des protéines cibles de mTORC1 (p-4E-BP1 et p-S6) dans les CSH Vav-iCre Wnt4<sup>ΔΔ</sup> montre une augmentation de la phosphorylation de 4EBP-1 et S6 comparée aux contrôles (figure 4.1). La phosphorylation de 4E-BP1 mène à sa dissociation d'eIF4E ce qui permet la formation du complexe eIF4F. Le complexe eIF4F initie la traduction et la phosphorylation de la sous-unité ribosomale S6 contribue à l'augmentation de la synthèse des protéines (Gingras et al., 1999, Choo et al., 2008). Bien que ces résultats soient préliminaires, ils suggèrent fortement que l'absence de Wnt4 dans les CSH active mTORC1 ce qui inhiberait l'autophagie causant par conséquent la perte du maintien et de l'activité des CSH. Par ailleurs, une investigation plus approfondie du mécanisme de l'autophagie permettrait de corroborer les

données mTORC1 et de démontrer son altération dans les CSH *Vav-iCre Wnt4<sup>Δ/Δ</sup>*. En perspective, la première étape serait de refaire l'analyse métabolique avec le « Seahorse » avec un nombre satisfaisant de cellules et de souris. Ensuite, il serait intéressant d'analyser le nombre d'autophagosomes en utilisant le marqueur LC3-II et de le co-localiser avec le marqueur lysosomal LAMP-1 par immunofluorescence. Et finalement, d'évaluer la masse mitochondriale par le marqueur de biogenèse mitochondriale PGC1 $\alpha$  et par la protéine structurale mitochondriale Tom20 par cytométrie en flux.

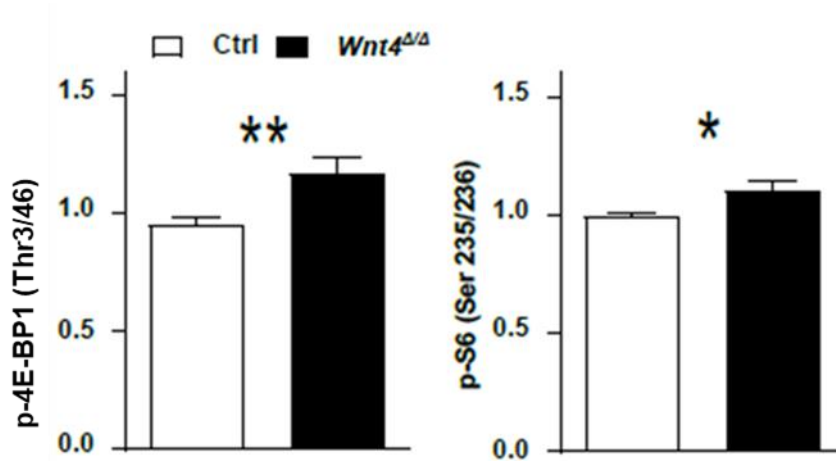


Figure 4.1 Analyse des protéines cibles de mTORC

La délétion de *Wnt4* induit l'augmentation de la phosphorylation de 4E-BP1 et S6

En définitive, ces travaux démontrent le rôle intrinsèque du ligand *Wnt4* dans la fonction des cellules souches hématopoïétiques et l'établissent d'une piste solide sur laquelle des études futures pourront s'appuyer pour élucider le mécanisme exact emprunté par *Wnt4* afin de maintenir les lignées hématopoïétiques.

## 4.4 Conclusions générales

### 4.4.1 Les souris LysM-Cre

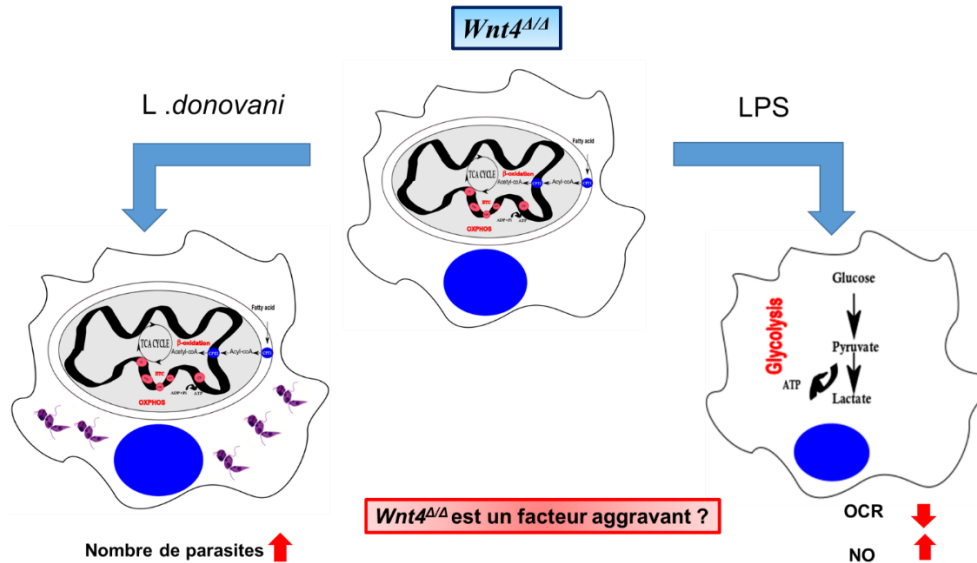


Figure 4.2 Conclusion générale de la délétion de *Wnt4* dans les macrophages

En conclusion, la délétion de *Wnt4* dans les macrophages induit l'activation du métabolisme mitochondrial. Cependant ces modifications métaboliques ne semblent pas être irréversibles. Il est clair que ces mêmes macrophages sujets à une stimulation inflammatoire par LPS sont capables d'adopter un métabolisme glycolytique et répondent activement et intensément au stimulus et ceci par une forte production de NO. Par contre, lors d'une stimulation anti-inflammatoire par le parasite *L. donovani*, les macrophages déficients en *Wnt4* favorisent la survie parasitaire. Ces données nous permettent d'affirmer que la délétion de *Wnt4* dans les macrophages est un facteur aggravant indépendamment des stimuli (figure 4.2). Éventuellement, le ligand *Wnt4* atténue les infections parasitaires et contribue potentiellement à la résorption de l'inflammation du moins celle générée par les infections bactériennes.

#### 4.4.2 Les souris Vav-iCre

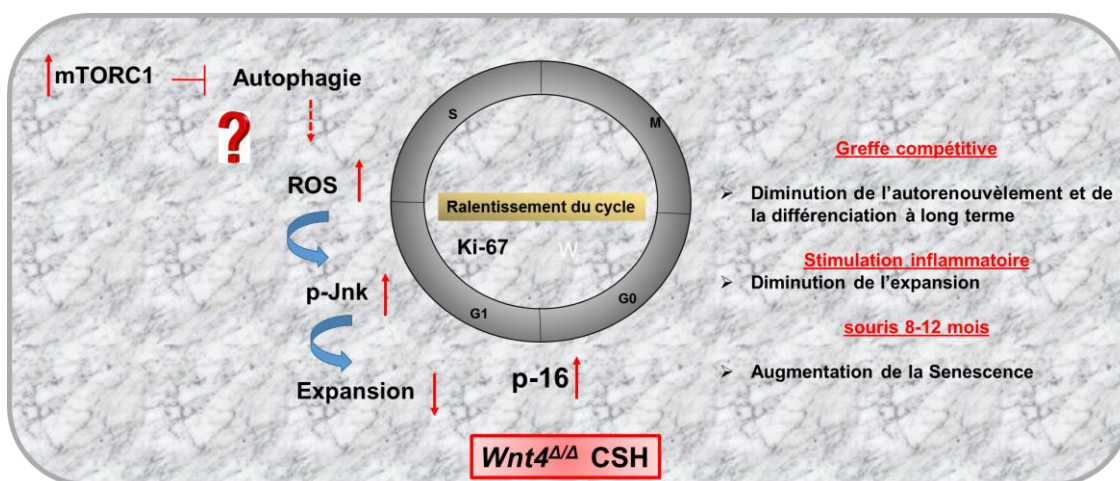


Figure 4.3 Conclusion générale de la délétion de Wnt4 dans les CSH

En conclusion, la délétion de Wnt4 dans les cellules souches hématopoïétiques induit un état oxydatif et incite le ralentissement du cycle cellulaire. Ces changements affectent leurs fonctions d'autorenouvellement et de différenciation (figure 4.3). La perte de la fonction adéquate des lignées hématopoïétiques mène à des pathologies hématologiques comme les leucémies (Juliusson and Hough, 2016). De surcroît, il est précédemment décrit que Wnt4 est sous exprimé dans différentes lignées leucémiques humaines (Garcia-Castro et al., 2013). Par conséquent, l'étude de Wnt4 dans un modèle leucémique est une piste prometteuse qui contribuerait à la compréhension des mécanismes affectés par la déficience en Wnt4 impliquée dans l'établissement des leucémies

#### 4.4.3 Conclusion générale

Le rôle des ligands Wnt varie selon le type cellulaire, la stimulation et la disponibilité des récepteurs Frizzled. Ces travaux de recherche menés dans les CSH et les macrophages corroborent la difficulté à identifier un rôle unique au ligand Wnt4. Cependant, ils mettent en relief l'importance du ligand Wnt4 dans le système hématopoïétique. Une délétion intrinsèque de Wnt4 engendre la perte de la fonction d'autorenouvellement et de la capacité de reconstitution du système hématopoïétique. De plus, ces cellules produisent des macrophages qui répondent plus intensément à la stimulation inflammatoire par LPS et maintiennent la survie du parasite *Leishmania donovani*. En conclusion, la présence du ligand Wnt4 intrinsèque aux cellules souches hématopoïétiques est requise pour le maintien et le bon fonctionnement du système hématopoïétique ainsi que pour le contrôle de la réponse immunitaire.

## 5 RÉFÉRENCES

---

1990. The Nobel lectures in immunology. The Nobel prize for physiology or medicine, 1908, awarded to Elie Metchnikoff & Paul Ehrlich "in recognition of their work on immunity". *Scand J Immunol*, 31, 1-13.
- ABARICIA, J. O., SHAH, A. H., CHAUBAL, M., HOTCHKISS, K. M. & OLIVARES-NAVARRETE, R. 2020. Wnt signaling modulates macrophage polarization and is regulated by biomaterial surface properties. *Biomaterials*, 243, 119920.
- ABBAS, A. K., MURPHY, K. M. & SHER, A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383, 787-93.
- ABDELAZIZ, M. H., ABDELWAHAB, S. F., WAN, J., CAI, W., HUIXUAN, W., JIANJUN, C., KUMAR, K. D., VASUDEVAN, A., SADEK, A., SU, Z., WANG, S. & XU, H. 2020. Alternatively activated macrophages; a double-edged sword in allergic asthma. *J Transl Med*, 18, 58.
- ABEBE, T., TAKELE, Y., WELDEGEBREAL, T., CLOKE, T., CLOSS, E., CORSET, C., HAILU, A., HAILU, W., SISAY, Y., CORWARE, K., CORSET, M., MODOLELL, M., MUNDER, M., TACCHINI-COTTIER, F., MULLER, I. & KROPF, P. 2013. Arginase activity - a marker of disease status in patients with visceral leishmaniasis in ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis*, 7, e2134.
- ABIDIN, B. M., HAMMAMI, A., STAGER, S. & HEINONEN, K. M. 2017. Infection-adapted emergency hematopoiesis promotes visceral leishmaniasis. *Plos Pathogens*, 13, e1006422.
- ABIDIN, B. M., OWUSU KWARTENG, E. & HEINONEN, K. M. 2015. Frizzled-6 Regulates Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Survival and Self-Renewal. *J Immunol*, 195, 2168-76.
- ABRAM, C. L., ROBERGE, G. L., HU, Y. & LOWELL, C. A. 2014. Comparative analysis of the efficiency and specificity of myeloid-Cre deleting strains using ROSA-EYFP reporter mice. *J Immunol Methods*, 408, 89-100.
- ADAMS, G. B., CHABNER, K. T., ALLEY, I. R., OLSON, D. P., SZCZEPIORKOWSKI, Z. M., POZNANSKY, M. C., KOS, C. H., POLLAK, M. R., BROWN, E. M. & SCADDEN, D. T. 2006. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature*, 439, 599-603.
- ADEVA-ANDANY, M. M., CARNEIRO-FREIRE, N., SECO-FILGUEIRA, M., FERNANDEZ-FERNANDEZ, C. & MOURINO-BAYOLO, D. 2019. Mitochondrial beta-oxidation of saturated fatty acids in humans. *Mitochondrion*, 46, 73-90.
- ADLER, L. N., JIANG, W., BHAMIDIPATI, K., MILLICAN, M., MACAUBAS, C., HUNG, S. C. & MELLINS, E. D. 2017. The Other Function: Class II-Restricted Antigen Presentation by B Cells. *Front Immunol*, 8, 319.
- AGOSTINO, M., POHL, S. O. & DHARMARAJAN, A. 2017. Structure-based prediction of Wnt binding affinities for Frizzled-type cysteine-rich domains. *J Biol Chem*, 292, 11218-11229.
- AGRAWAL, V., JAISWAL, M. K., MALLERS, T., KATARA, G. K., GILMAN-SACHS, A., BEAMAN, K. D. & HIRSCH, E. 2015. Altered autophagic flux enhances inflammatory responses during inflammation-induced preterm labor. *Sci Rep*, 5, 9410.

- AJAMI, B., BENNETT, J. L., KRIEGER, C., MCNAGNY, K. M. & ROSSI, F. M. 2011. Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci*, 14, 1142-9.
- AJAMI, B., BENNETT, J. L., KRIEGER, C., TETZLAFF, W. & ROSSI, F. M. 2007. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci*, 10, 1538-43.
- AKINBI, H. T., EPAUD, R., BHATT, H. & WEAVER, T. E. 2000. Bacterial killing is enhanced by expression of lysozyme in the lungs of transgenic mice. *J Immunol*, 165, 5760-6.
- ALBANESE, A., DALY, L. A., MENNERICH, D., KIETZMANN, T. & SEE, V. 2020. The Role of Hypoxia-Inducible Factor Post-Translational Modifications in Regulating Its Localisation, Stability, and Activity. *Int J Mol Sci*, 22.
- ALBERTS B, J. A., LEWIS J, ET AL 2002. Innate Immunity. *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*.
- ALEXANDER, W. S. 2002. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2, 410-6.
- ALTOMARE, D. A. & KHALED, A. R. 2012. Homeostasis and the importance for a balance between AKT/mTOR activity and intracellular signaling. *Curr Med Chem*, 19, 3748-62.
- ALVES-FILHO, J. C. & PALSSON-MCDERMOTT, E. M. 2016. Pyruvate Kinase M2: A Potential Target for Regulating Inflammation. *Front Immunol*, 7, 145.
- ANASTASIOU, D., YU, Y., ISRAELSEN, W. J., JIANG, J. K., BOXER, M. B., HONG, B. S., TEMPEL, W., DIMOV, S., SHEN, M., JHA, A., YANG, H., MATTAINI, K. R., METALLO, C. M., FISKE, B. P., COURTNEY, K. D., MALSTROM, S., KHAN, T. M., KUNG, C., SKOUMBOURDIS, A. P., VEITH, H., SOUTHALL, N., WALSH, M. J., BRIMACOMBE, K. R., LEISTER, W., LUNT, S. Y., JOHNSON, Z. R., YEN, K. E., KUNII, K., DAVIDSON, S. M., CHRISTOFK, H. R., AUSTIN, C. P., INGLESE, J., HARRIS, M. H., ASARA, J. M., STEPHANOPOULOS, G., SALITURO, F. G., JIN, S., DANG, L., AULD, D. S., PARK, H. W., CANTLEY, L. C., THOMAS, C. J. & VANDER HEIDEN, M. G. 2012. Pyruvate kinase M2 activators promote tetramer formation and suppress tumorigenesis. *Nat Chem Biol*, 8, 839-47.
- ANDRE, P., WANG, Q., WANG, N., GAO, B., SCHILIT, A., HALFORD, M. M., STACKER, S. A., ZHANG, X. & YANG, Y. 2012. The Wnt coreceptor Ryk regulates Wnt/planar cell polarity by modulating the degradation of the core planar cell polarity component Vangl2. *J Biol Chem*, 287, 44518-25.
- ANDROULIDAKI, A., ILIOPOULOS, D., ARRANZ, A., DOXAKI, C., SCHWORER, S., ZACHARIOUDAKI, V., MARGIORIS, A. N., TSICHLIS, P. N. & TSATSANIS, C. 2009. The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. *Immunity*, 31, 220-31.
- ANGERS, S. & MOON, R. T. 2009. Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 468-77.
- ARAI, F., HIRAO, A., OHMURA, M., SATO, H., MATSUOKA, S., TAKUBO, K., ITO, K., KOH, G. Y. & SUDA, T. 2004. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*, 118, 149-61.
- ARANGO DUQUE, G. & DESCOTEAUX, A. 2014. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol*, 5, 491.



- ARENDA, W. P. 1990. Interleukin-1 receptor antagonist: discovery, structure and properties. *Prog Growth Factor Res*, 2, 193-205.
- ARRANZ, A., DOXAKI, C., VERGADI, E., MARTINEZ DE LA TORRE, Y., VAPORIDI, K., LAGOUDAKI, E. D., IERONYMAKI, E., ANDROULIDAKI, A., VENIHAKI, M., MARGIORIS, A. N., STATHOPOULOS, E. N., TSICHLIS, P. N. & TSATSANIS, C. 2012. Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 9517-22.
- ARTYOMOV, M. N., SERGUSHICHEV, A. & SCHILLING, J. D. 2016. Integrating immunometabolism and macrophage diversity. *Semin Immunol*, 28, 417-424.
- ATRI, C., GUERFALI, F. Z. & LAOUINI, D. 2018. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci*, 19.
- AUFFRAY, C., FOGG, D., GARFA, M., ELAIN, G., JOIN-LAMBERT, O., KAYAL, S., SARNACKI, S., CUMANO, A., LAUVAU, G. & GEISSMANN, F. 2007. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*, 317, 666-70.
- AUFFRAY, C., FOGG, D. K., NARNI-MANCINELLI, E., SENECHAL, B., TROUILLET, C., SAEDERUP, N., LEEMPUT, J., BIGOT, K., CAMPISI, L., ABITBOL, M., MOLINA, T., CHARO, I., HUME, D. A., CUMANO, A., LAUVAU, G. & GEISSMANN, F. 2009. CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med*, 206, 595-606.
- BAARSMA, H. A., KONIGSHOFF, M. & GOSENS, R. 2013. The WNT signaling pathway from ligand secretion to gene transcription: molecular mechanisms and pharmacological targets. *Pharmacol Ther*, 138, 66-83.
- BALDRIDGE, M. T., KING, K. Y. & GOODELL, M. A. 2011. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. *Trends Immunol*, 32, 57-65.
- BANSAL, V. & OCHOA, J. B. 2003. Arginine availability, arginase, and the immune response. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 6, 223-8.
- BARKAL, A. A., WEISKOPF, K., KAO, K. S., GORDON, S. R., ROSENTAL, B., YIU, Y. Y., GEORGE, B. M., MARKOVIC, M., RING, N. G., TSAI, J. M., MCKENNA, K. M., HO, P. Y., CHENG, R. Z., CHEN, J. Y., BARKAL, L. J., RING, A. M., WEISSMAN, I. L. & MAUTE, R. L. 2018. Engagement of MHC class I by the inhibitory receptor LILRB1 suppresses macrophages and is a target of cancer immunotherapy. *Nat Immunol*, 19, 76-84.
- BASELER, W. A., DAVIES, L. C., QUIGLEY, L., RIDNOUR, L. A., WEISS, J. M., HUSSAIN, S. P., WINK, D. A. & MCVICAR, D. W. 2016. Autocrine IL-10 functions as a rheostat for M1 macrophage glycolytic commitment by tuning nitric oxide production. *Redox Biol*, 10, 12-23.
- BAUGH, J. A. & BUCALA, R. 2001. Mechanisms for modulating TNF alpha in immune and inflammatory disease. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 4, 635-50.
- BELYAEV, N. N., BIRO, J., LANGHORNE, J. & POTOCHNIK, A. J. 2013. Extramedullary myelopoiesis in malaria depends on mobilization of myeloid-restricted progenitors by IFN-gamma induced chemokines. *PLoS Pathog*, 9, e1003406.
- BERNARD, P., FLEMING, A., LACOMBE, A., HARLEY, V. R. & VILAIN, E. 2008. Wnt4 inhibits beta-catenin/TCF signalling by redirecting beta-catenin to the cell membrane. *Biol Cell*, 100, 167-77.

- BERTRAND, J. Y., JALIL, A., KLAINE, M., JUNG, S., CUMANO, A. & GODIN, I. 2005. Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood*, 106, 3004-11.
- BESTEIRO, S., WILLIAMS, R. A., MORRISON, L. S., COOMBS, G. H. & MOTTRAM, J. C. 2006. Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. *J Biol Chem*, 281, 11384-96.
- BILLIN, A. N., THIRLWELL, H. & AYER, D. E. 2000. Beta-catenin-histone deacetylase interactions regulate the transition of LEF1 from a transcriptional repressor to an activator. *Mol Cell Biol*, 20, 6882-90.
- BISWAS, S. K. & MANTOVANI, A. 2012. Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell Metab*, 15, 432-7.
- BITTNER, J. J. 1936. Some Possible Effects of Nursing on the Mammary Gland Tumor Incidence in Mice. *Science*, 84, 162.
- BLUMENTHAL, A., EHLERS, S., LAUBER, J., BUER, J., LANGE, C., GOLDMANN, T., HEINE, H., BRANDT, E. & REILING, N. 2006. The Wingless homolog WNT5A and its receptor Frizzled-5 regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation. *Blood*, 108, 965-73.
- BO YU, J. C., YUNSONG LIU, JIONG LI, KAREENA KEVORK, KHALID AL-HEZAIMI, DANA T GRAVES, NO-HEE PARK AND CUN-YU WANG 2014. Non-canonical Wnt4 prevents skeletal aging and inflammation by inhibiting NF- $\kappa$ B. *Nat Med*.
- BOETTCHER, S. & MANZ, M. G. 2017. Regulation of Inflammation- and Infection-Driven Hematopoiesis. *Trends Immunol*, 38, 345-357.
- BOISSET, J. C., VAN CAPPELLEN, W., ANDRIEU-SOLER, C., GALJART, N., DZIERZAK, E. & ROBIN, C. 2010. In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature*, 464, 116-20.
- BOVOLENTA, P., ESTEVE, P., RUIZ, J. M., CISNEROS, E. & LOPEZ-RIOS, J. 2008. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci*, 121, 737-46.
- BOWEN, A., KOS, K., WHATMORE, J., RICHARDSON, S. & WELTERS, H. J. 2016. Wnt4 antagonises Wnt3a mediated increases in growth and glucose stimulated insulin secretion in the pancreatic beta-cell line, INS-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 479, 793-799.
- BOWERS, E., SLAUGHTER, A., FRENETTE, P. S., KUICK, R., PELLO, O. M. & LUCAS, D. 2018. Granulocyte-derived TNF $\alpha$  promotes vascular and hematopoietic regeneration in the bone marrow. *Nat Med*, 24, 95-102.
- BOXER, M. B., JIANG, J. K., VANDER HEIDEN, M. G., SHEN, M., SKOUMBOURDIS, A. P., SOUTHALL, N., VEITH, H., LEISTER, W., AUSTIN, C. P., PARK, H. W., INGLESE, J., CANTLEY, L. C., AULD, D. S. & THOMAS, C. J. 2010. Evaluation of substituted N,N'-diarylsulfonamides as activators of the tumor cell specific M2 isoform of pyruvate kinase. *J Med Chem*, 53, 1048-55.
- BOYER, A., LAPOINTE, E., ZHENG, X., COWAN, R. G., LI, H., QUIRK, S. M., DEMAYO, F. J., RICHARDS, J. S. & BOERBOOM, D. 2010. WNT4 is required for normal ovarian follicle development and female fertility. *FASEB J*, 24, 3010-25.
- BRADLEY, E. W., RUAN, M. M., VRABLE, A. & OURSLER, M. J. 2008. Pathway crosstalk between Ras/Raf and PI3K in promotion of M-CSF-induced MEK/ERK-mediated osteoclast survival. *J Cell Biochem*, 104, 1439-51.

- BROMBERG, O., FRISCH, B. J., WEBER, J. M., PORTER, R. L., CIVITELLI, R. & CALVI, L. M. 2012. Osteoblastic N-cadherin is not required for microenvironmental support and regulation of hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 120, 303-13.
- BROWNLIE, R. J. & ZAMOYSKA, R. 2013. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat Rev Immunol*, 13, 257-69.
- BRUNS, I., LUCAS, D., PINHO, S., AHMED, J., LAMBERT, M. P., KUNISAKI, Y., SCHEIERMANN, C., SCHIFF, L., PONCZ, M., BERGMAN, A. & FRENETTE, P. S. 2014. Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat Med*, 20, 1315-20.
- BRYAN, N. S. & GRISHAM, M. B. 2007. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med*, 43, 645-57.
- BURKE, B., GIANNOUDIS, A., CORKE, K. P., GILL, D., WELLS, M., ZIEGLER-HEITBROCK, L. & LEWIS, C. E. 2003. Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy. *Am J Pathol*, 163, 1233-43.
- BUTLER, J. M., NOLAN, D. J., VERTES, E. L., VARNUM-FINNEY, B., KOBAYASHI, H., HOOPER, A. T., SEANDEL, M., SHIDO, K., WHITE, I. A., KOBAYASHI, M., WITTE, L., MAY, C., SHAWBER, C., KIMURA, Y., KITAJEWSKI, J., ROSENWAKS, Z., BERNSTEIN, I. D. & RAFII, S. 2010. Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 6, 251-64.
- BUTLER, M. T. & WALLINGFORD, J. B. 2017. Planar cell polarity in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18, 375-388.
- BYLES, V., COVARRUBIAS, A. J., BEN-SAHRA, I., LAMMING, D. W., SABATINI, D. M., MANNING, B. D. & HORNG, T. 2013. The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. *Nat Commun*, 4, 2834.
- CADER, M. Z., BOROVIK, K., ZHANG, Q., ASSADI, G., KEMPSTER, S. L., SEWELL, G. W., SAVELJEVA, S., ASHCROFT, J. W., CLARE, S., MUKHOPADHYAY, S., BROWN, K. P., TSCHURTSCHENTHALER, M., RAINE, T., DOE, B., CHILVERS, E. R., GRIFFIN, J. L., KANEIDER, N. C., FLOTO, R. A., D'AMATO, M., BRADLEY, A., WAKELAM, M. J., DOUGAN, G. & KASER, A. 2016. C13orf31 (FAMIN) is a central regulator of immunometabolic function. *Nat Immunol*, 17, 1046-56.
- CALLE, P., MUNOZ, A., SOLA, A. & HOTTER, G. 2019. CPT1a gene expression reverses the inflammatory and anti-phagocytic effect of 7-ketocholesterol in RAW264.7 macrophages. *Lipids Health Dis*, 18, 215.
- CALVI, L. M., ADAMS, G. B., WEIBRECHT, K. W., WEBER, J. M., OLSON, D. P., KNIGHT, M. C., MARTIN, R. P., SCHIPANI, E., DIVIETI, P., BRINGHURST, F. R., MILNER, L. A., KRONENBERG, H. M. & SCADDEN, D. T. 2003. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 425, 841-6.
- CAO, Y., FANG, Y., CAI, J., LI, X., XU, F., YUAN, N., ZHANG, S. & WANG, J. 2016. ROS functions as an upstream trigger for autophagy to drive hematopoietic stem cell differentiation. *Hematology*, 21, 613-618.
- CAO, Z., LIAO, Q., SU, M., HUANG, K., JIN, J. & CAO, D. 2019. AKT and ERK dual inhibitors: The way forward? *Cancer Lett*, 459, 30-40.
- CAPPARELLI, C., CHIAVARINA, B., WHITAKER-MENEZES, D., PESTELL, T. G., PESTELL, R. G., HULIT, J., ANDO, S., HOWELL, A., MARTINEZ-OUTSCHOORN, U. E., SOTGIA, F.

- & LISANTI, M. P. 2012. CDK inhibitors (p16/p19/p21) induce senescence and autophagy in cancer-associated fibroblasts, "fueling" tumor growth via paracrine interactions, without an increase in neo-angiogenesis. *Cell Cycle*, 11, 3599-610.
- CARGNELLO, M. & ROUX, P. P. 2011. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 75, 50-83.
- CARMELIET, P. & JAIN, R. K. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407, 249-57.
- CASSIM, S., VUCETIC, M., ZDRALEVIC, M. & POUYSSEGUR, J. 2020. Warburg and Beyond: The Power of Mitochondrial Metabolism to Collaborate or Replace Fermentative Glycolysis in Cancer. *Cancers (Basel)*, 12.
- CASTRILLO, A. & TONTONOZ, P. 2004. PPARs in atherosclerosis: the clot thickens. *J Clin Invest*, 114, 1538-40.
- CATALINA-RODRIGUEZ, O., KOLUKULA, V. K., TOMITA, Y., PREET, A., PALMIERI, F., WELLSTEIN, A., BYERS, S., GIACCIA, A. J., GLASGOW, E., ALBANESE, C. & AVANTAGGIATI, M. L. 2012. The mitochondrial citrate transporter, CIC, is essential for mitochondrial homeostasis. *Oncotarget*, 3, 1220-35.
- CAVAILLON, J. M. 2011. The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff. *J Leukoc Biol*, 90, 413-24.
- CAVALLO-MEDVED, D., MOIN, K. & SLOANE, B. 2011. Cathepsin B: Basis Sequence: Mouse. *AFCS Nat Mol Pages*, 2011.
- CERADINI, D. J., KULKARNI, A. R., CALLAGHAN, M. J., TEPPER, O. M., BASTIDAS, N., KLEINMAN, M. E., CAPLA, J. M., GALIANO, R. D., LEVINE, J. P. & GURTNER, G. C. 2004. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*, 10, 858-64.
- CERPA, W., LATORRE-ESTEVEZ, E. & BARRIA, A. 2015. RoR2 functions as a noncanonical Wnt receptor that regulates NMDAR-mediated synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 4797-802.
- CHAIX, J., TESSMER, M. S., HOEBE, K., FUSERI, N., RYFFEL, B., DALOD, M., ALEXOPOULOU, L., BEUTLER, B., BROSSAY, L., VIVIER, E. & WALZER, T. 2008. Cutting edge: Priming of NK cells by IL-18. *J Immunol*, 181, 1627-31.
- CHAKRABORTY, A., KURATI, S. P., MAHATA, S. K., SUNDAR, S., ROY, S. & SEN, M. 2017. Wnt5a Signaling Promotes Host Defense against *Leishmania donovani* Infection. *J Immunol*, 199, 992-1002.
- CHALLEN, G. A., BOLES, N., LIN, K. K. & GOODELL, M. A. 2009. Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis. *Cytometry A*, 75, 14-24.
- CHAMBARD, J. C., LEFLOCH, R., POUYSSEGUR, J. & LENORMAND, P. 2007. ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1773, 1299-310.
- CHAO, M. P., TAKIMOTO, C. H., FENG, D. D., MCKENNA, K., GIP, P., LIU, J., VOLKMER, J. P., WEISSMAN, I. L. & MAJETI, R. 2019. Therapeutic Targeting of the Macrophage Immune Checkpoint CD47 in Myeloid Malignancies. *Front Oncol*, 9, 1380.
- CHAVAKIS, T., MITROULIS, I. & HAJISHENGALLIS, G. 2019. Hematopoietic progenitor cells as integrative hubs for adaptation to and fine-tuning of inflammation. *Nat Immunol*, 20, 802-811.

- CHAVEZ-GALAN, L., OLLEROS, M. L., VESIN, D. & GARCIA, I. 2015. Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+) Macrophages. *Front Immunol*, 6, 263.
- CHEN, C., LIU, Y., LIU, Y. & ZHENG, P. 2010. Mammalian target of rapamycin activation underlies HSC defects in autoimmune disease and inflammation in mice. *J Clin Invest*, 120, 4091-101.
- CHEN, L., WANG, S., WANG, Y., ZHANG, W., MA, K., HU, C., ZHU, H., LIANG, S., LIU, M. & XU, N. 2018a. IL-6 influences the polarization of macrophages and the formation and growth of colorectal tumor. *Oncotarget*, 9, 17443-17454.
- CHEN, S., XIA, Y., HE, F., FU, J., XIN, Z., DENG, B., HE, L., ZHOU, X. & REN, W. 2020. Serine Supports IL-1beta Production in Macrophages Through mTOR Signaling. *Front Immunol*, 11, 1866.
- CHEN, X. & JENSEN, P. E. 2008. The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 56, 77-83.
- CHEN, X. S., LI, L. Y., GUAN, Y. D., YANG, J. M. & CHENG, Y. 2016. Anticancer strategies based on the metabolic profile of tumor cells: therapeutic targeting of the Warburg effect. *Acta Pharmacol Sin*, 37, 1013-9.
- CHEN, Y., ZHANG, P., TANG, P., LV, P., LI, X., WANG, Y., LV, Y. & LIU, Y. 2018b. Wnt4 overexpression promotes thymoma development through a JNK-mediated planar cell polarity-like pathway. *Oncol Lett*, 15, 83-90.
- CHENG, H., WANG, Z., FU, L. & XU, T. 2019. Macrophage Polarization in the Development and Progression of Ovarian Cancers: An Overview. *Front Oncol*, 9, 421.
- CHING, W. & NUSSE, R. 2006. A dedicated Wnt secretion factor. *Cell*, 125, 432-3.
- CHIU, S. C., LIU, H. H., CHEN, C. L., CHEN, P. R., LIU, M. C., LIN, S. Z. & CHANG, K. T. 2015. Extramedullary hematopoiesis (EMH) in laboratory animals: offering an insight into stem cell research. *Cell Transplant*, 24, 349-66.
- CHOO, A. Y., YOON, S. O., KIM, S. G., ROUX, P. P. & BLENIS, J. 2008. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 17414-9.
- CHOW, A., LUCAS, D., HIDALGO, A., MENDEZ-FERRER, S., HASHIMOTO, D., SCHEIERMANN, C., BATTISTA, M., LEBOEUF, M., PROPHETE, C., VAN ROOIJEN, N., TANAKA, M., MERAD, M. & FRENETTE, P. S. 2011. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med*, 208, 261-71.
- CHOW, D. C., WENNING, L. A., MILLER, W. M. & PAPOUTSAKIS, E. T. 2001. Modeling pO(2) distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J*, 81, 685-96.
- CHRISTENSEN, J. L. & WEISSMAN, I. L. 2001. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 14541-6.
- CHRISTOFK, H. R., VANDER HEIDEN, M. G., HARRIS, M. H., RAMANATHAN, A., GERSZTEN, R. E., WEI, R., FLEMING, M. D., SCHREIBER, S. L. & CANTLEY, L. C. 2008. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*, 452, 230-3.

- CHRISTOPHER, M. J., RAO, M., LIU, F., WOLOSZYNEK, J. R. & LINK, D. C. 2011. Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice. *J Exp Med*, 208, 251-60.
- CLARKE, B. 2008. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3 Suppl 3, S131-9.
- CLAUSEN, B. E., BURKHARDT, C., REITH, W., RENKAWITZ, R. & FORSTER, I. 1999. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res*, 8, 265-77.
- CLEMENTS, W. K., KIM, A. D., ONG, K. G., MOORE, J. C., LAWSON, N. D. & TRAVER, D. 2011. A somitic Wnt16/Notch pathway specifies haematopoietic stem cells. *Nature*, 474, 220-4.
- COMALADA, M., VALLEDOR, A. F., SANCHEZ-TILLO, E., UMBERT, I., XAUS, J. & CELADA, A. 2003. Macrophage colony-stimulating factor-dependent macrophage proliferation is mediated through a calcineurin-independent but immunophilin-dependent mechanism that mediates the activation of external regulated kinases. *Eur J Immunol*, 33, 3091-100.
- COMALADA, M., XAUS, J., SANCHEZ, E., VALLEDOR, A. F. & CELADA, A. 2004. Macrophage colony-stimulating factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, or IL-3-dependent survival of macrophages, but not proliferation, requires the expression of p21(Waf1) through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Eur J Immunol*, 34, 2257-67.
- CONGDON, K. L., VOERMANS, C., FERGUSON, E. C., DIMASCIO, L. N., UQOEZWA, M., ZHAO, C. & REYA, T. 2008. Activation of Wnt signaling in hematopoietic regeneration. *Stem Cells*, 26, 1202-10.
- COOPER, E. L. 2008. From Darwin and Metchnikoff to Burnet and beyond. *Contrib Microbiol*, 15, 1-11.
- COPLEY, M. R. & EAVES, C. J. 2013. Developmental changes in hematopoietic stem cell properties. *Exp Mol Med*, 45, e55.
- COSKUN, S. & HIRSCHI, K. K. 2010. Establishment and regulation of the HSC niche: Roles of osteoblastic and vascular compartments. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 90, 229-42.
- COSSIO, I., LUCAS, D. & HIDALGO, A. 2019. Neutrophils as regulators of the hematopoietic niche. *Blood*, 133, 2140-2148.
- COUDREUSE, D. & KORSWAGEN, H. C. 2007. The making of Wnt: new insights into Wnt maturation, sorting and secretion. *Development*, 134, 3-12.
- COVARRUBIAS, A. J., AKSOYLAR, H. I. & HORNG, T. 2015. Control of macrophage metabolism and activation by mTOR and Akt signaling. *Semin Immunol*, 27, 286-96.
- CRANE, G. M., JEFFERY, E. & MORRISON, S. J. 2017. Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat Rev Immunol*, 17, 573-590.
- CROSS, M., MANGELSDORF, I., WEDEL, A. & RENKAWITZ, R. 1988. Mouse lysozyme M gene: isolation, characterization, and expression studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 6232-6.
- CROSS, M. & RENKAWITZ, R. 1990. Repetitive sequence involvement in the duplication and divergence of mouse lysozyme genes. *EMBO J*, 9, 1283-8.
- CUMANO, A. & GODIN, I. 2007. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol*, 25, 745-85.

- CUNHA, C., GOMES, C., VAZ, A. R. & BRITES, D. 2016. Exploring New Inflammatory Biomarkers and Pathways during LPS-Induced M1 Polarization. *Mediators Inflamm*, 2016, 6986175.
- DAI, X. M., ZONG, X. H., SYLVESTRE, V. & STANLEY, E. R. 2004. Incomplete restoration of colony-stimulating factor 1 (CSF-1) function in CSF-1-deficient *Csf1op/Csf1op* mice by transgenic expression of cell surface CSF-1. *Blood*, 103, 1114-23.
- DAIRAKU, T., IWAMOTO, T., NISHIMURA, M., ENDO, M., OHASHI, T. & ETO, Y. 2014. A practical fluorometric assay method to measure lysosomal acid lipase activity in dried blood spots for the screening of cholesteryl ester storage disease and Wolman disease. *Mol Genet Metab*, 111, 193-6.
- DAL PORTO, J. M., GAULD, S. B., MERRELL, K. T., MILLS, D., PUGH-BERNARD, A. E. & CAMBIER, J. 2004. B cell antigen receptor signaling 101. *Mol Immunol*, 41, 599-613.
- DANHIER, P., BANSKI, P., PAYEN, V. L., GRASSO, D., IPPOLITO, L., SONVEAUX, P. & PORPORATO, P. E. 2017. Cancer metabolism in space and time: Beyond the Warburg effect. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 1858, 556-572.
- DANIELS, D. L. & WEIS, W. I. 2005. Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol*, 12, 364-71.
- DARWICH, L., COMA, G., PENA, R., BELLIDO, R., BLANCO, E. J., ESTE, J. A., BORRAS, F. E., CLOTET, B., RUIZ, L., ROSELL, A., ANDREO, F., PARKHOUSE, R. M. & BOFILL, M. 2009. Secretion of interferon-gamma by human macrophages demonstrated at the single-cell level after costimulation with interleukin (IL)-12 plus IL-18. *Immunology*, 126, 386-93.
- DAVIES, L. C., ROSAS, M., JENKINS, S. J., LIAO, C. T., SCURR, M. J., BROMBACHER, F., FRASER, D. J., ALLEN, J. E., JONES, S. A. & TAYLOR, P. R. 2013. Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. *Nat Commun*, 4, 1886.
- DE, A. 2011. Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 43, 745-56.
- DE BOER, J., WILLIAMS, A., SKAVDIS, G., HARKER, N., COLES, M., TOLAINI, M., NORTON, T., WILLIAMS, K., RODERICK, K., POTOCHNIK, A. J. & KIOUSSIS, D. 2003. Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre. *Eur J Immunol*, 33, 314-25.
- DE BRUIN, A. M., DEMIREL, O., HOOIBRINK, B., BRANDTS, C. H. & NOLTE, M. A. 2013. Interferon-gamma impairs proliferation of hematopoietic stem cells in mice. *Blood*, 121, 3578-85.
- DE BRUIN, A. M., LIBREGTS, S. F., VALKHOF, M., BOON, L., TOUW, I. P. & NOLTE, M. A. 2012. IFN $\gamma$  induces monopoiesis and inhibits neutrophil development during inflammation. *Blood*, 119, 1543-54.
- DEBERARDINIS, R. J. & CHANDEL, N. S. 2020. We need to talk about the Warburg effect. *Nat Metab*, 2, 127-129.
- DICKSON, C., SMITH, R., BROOKES, S. & PETERS, G. 1984. Tumorigenesis by mouse mammary tumor virus: proviral activation of a cellular gene in the common integration region int-2. *Cell*, 37, 529-36.
- DINARELLO, C. A. 2018. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*, 281, 8-27.

- DING, L., SAUNDERS, T. L., ENIKOLOPOV, G. & MORRISON, S. J. 2012. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*, 481, 457-62.
- DISKIN, C. & PALSSON-MCDERMOTT, E. M. 2018. Metabolic Modulation in Macrophage Effector Function. *Front Immunol*, 9, 270.
- DIVAKARUNI, A. S., HSIEH, W. Y., MINARRIETA, L., DUONG, T. N., KIM, K. K. O., DESOUSA, B. R., ANDREYEV, A. Y., BOWMAN, C. E., CARADONNA, K., DRANKA, B. P., FERRICK, D. A., LIESA, M., STILES, L., ROGERS, G. W., BRAAS, D., CIARALDI, T. P., WOLFGANG, M. J., SPARWASSER, T., BEROD, L., BENSINGER, S. J. & MURPHY, A. N. 2018. Etomoxir Inhibits Macrophage Polarization by Disrupting CoA Homeostasis. *Cell Metab*, 28, 490-503 e7.
- DORSHKIND, K., HOFER, T., MONTECINO-RODRIGUEZ, E., PIOLI, P. D. & RODEWALD, H. R. 2020. Do haematopoietic stem cells age? *Nat Rev Immunol*, 20, 196-202.
- DUDEK, J. 2017. Role of Cardiolipin in Mitochondrial Signaling Pathways. *Front Cell Dev Biol*, 5, 90.
- EAVES, C. J. 2015. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood*, 125, 2605-13.
- EDWARDS, J. P., ZHANG, X., FRAUWIRTH, K. A. & MOSSER, D. M. 2006. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol*, 80, 1298-307.
- EIZ-VESPER, B. & SCHMETZER, H. M. 2020. Antigen-Presenting Cells: Potential of Proven und New Players in Immune Therapies. *Transfus Med Hemother*, 47, 429-431.
- ELIASSON, P. & JONSSON, J. I. 2010. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J Cell Physiol*, 222, 17-22.
- ELIASSON, P., REHN, M., HAMMAR, P., LARSSON, P., SIRENKO, O., FLIPPIN, L. A., CAMMENGA, J. & JONSSON, J. I. 2010. Hypoxia mediates low cell-cycle activity and increases the proportion of long-term-reconstituting hematopoietic stem cells during in vitro culture. *Exp Hematol*, 38, 301-310 e2.
- ELINAV, E., NOWARSKI, R., THAISS, C. A., HU, B., JIN, C. & FLAVELL, R. A. 2013. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer*, 13, 759-71.
- ELSTROM, R. L., BAUER, D. E., BUZZAI, M., KARNAUSKAS, R., HARRIS, M. H., PLAS, D. R., ZHUANG, H., CINALLI, R. M., ALAVI, A., RUDIN, C. M. & THOMPSON, C. B. 2004. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res*, 64, 3892-9.
- ENGEL, P., ECK, M. J. & TERHORST, C. 2003. The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat Rev Immunol*, 3, 813-21.
- ENSAN, S., LI, A., BESLA, R., DEGOUSEE, N., COSME, J., ROUFAIEL, M., SHIKATANI, E. A., EL-MAKLIZI, M., WILLIAMS, J. W., ROBINS, L., LI, C., LEWIS, B., YUN, T. J., LEE, J. S., WIEGHOFER, P., KHATTAR, R., FARROKHI, K., BYRNE, J., OUZOUNIAN, M., ZAVITZ, C. C., LEVY, G. A., BAUER, C. M., LIBBY, P., HUSAIN, M., SWIRSKI, F. K., CHEONG, C., PRINZ, M., HILGENDORF, I., RANDOLPH, G. J., EPELMAN, S., GRAMOLINI, A. O., CYBULSKY, M. I., RUBIN, B. B. & ROBBINS, C. S. 2016. Self-renewing resident arterial macrophages arise from embryonic CX3CR1(+) precursors and circulating monocytes immediately after birth. *Nat Immunol*, 17, 159-68.



- EPSTEIN, T., XU, L., GILLIES, R. J. & GATENBY, R. A. 2014. Separation of metabolic supply and demand: aerobic glycolysis as a normal physiological response to fluctuating energetic demands in the membrane. *Cancer Metab*, 2, 7.
- ESPLIN, B. L., SHIMAZU, T., WELNER, R. S., GARRETT, K. P., NIE, L., ZHANG, Q., HUMPHREY, M. B., YANG, Q., BORGHESI, L. A. & KINCADE, P. W. 2011. Chronic exposure to a TLR ligand injures hematopoietic stem cells. *J Immunol*, 186, 5367-75.
- ESSERS, M. A., OFFNER, S., BLANCO-BOSE, W. E., WAIBLER, Z., KALINKE, U., DUCHOSAL, M. A. & TRUMPP, A. 2009. IFN $\alpha$  activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature*, 458, 904-8.
- FARAGO, M., YARNITZKY, T., SHALOM, B. & KATZAV, S. 2020. Vav1 mutations: What makes them oncogenic? *Cell Signal*, 65, 109438.
- FARROW, A. L., RANA, T., MITTAL, M. K., MISRA, S. & CHAUDHURI, G. 2011. Leishmania-induced repression of selected non-coding RNA genes containing B-box element at their promoters in alternatively polarized M2 macrophages. *Mol Cell Biochem*, 350, 47-57.
- FENG, M., JIANG, W., KIM, B. Y. S., ZHANG, C. C., FU, Y. X. & WEISSMAN, I. L. 2019. Phagocytosis checkpoints as new targets for cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 19, 568-586.
- FENG, Y., LIANG, Y., REN, J. & DAI, C. 2018. Canonical Wnt Signaling Promotes Macrophage Proliferation during Kidney Fibrosis. *Kidney Dis (Basel)*, 4, 95-103.
- FERRANTE, C. J. & LEIBOVICH, S. J. 2012. Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 1, 10-16.
- FERRANTE, C. J., PINHAL-ENFIELD, G., ELSON, G., CRONSTEIN, B. N., HASKO, G., OUTRAM, S. & LEIBOVICH, S. J. 2013. The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4R $\alpha$ ) signaling. *Inflammation*, 36, 921-31.
- FESTUCCIA, W. T., POULIOT, P., BAKAN, I., SABATINI, D. M. & LAPLANTE, M. 2014. Myeloid-specific Rictor deletion induces M1 macrophage polarization and potentiates in vivo pro-inflammatory response to lipopolysaccharide. *PLoS One*, 9, e95432.
- FILOMENI, G., DE ZIO, D. & CECCONI, F. 2015. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ*, 22, 377-88.
- FLEETWOOD, A. J., LAWRENCE, T., HAMILTON, J. A. & COOK, A. D. 2007. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol*, 178, 5245-52.
- FLEMING, H. E., JANZEN, V., LO CELSO, C., GUO, J., LEAHY, K. M., KRONENBERG, H. M. & SCADDEN, D. T. 2008. Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. *Cell Stem Cell*, 2, 274-83.
- FLORIAN, M. C., NATTAMAI, K. J., DORR, K., MARKA, G., UBERLE, B., VAS, V., ECKL, C., ANDRA, I., SCHIEMANN, M., OOSTENDORP, R. A., SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K., KESTLER, H. A., ZHENG, Y. & GEIGER, H. 2013. A canonical to non-canonical Wnt signalling switch in haematopoietic stem-cell ageing. *Nature*, 503, 392-6.
- FRAISL, P., ARAGONES, J. & CARMELIET, P. 2009. Inhibition of oxygen sensors as a therapeutic strategy for ischaemic and inflammatory disease. *Nat Rev Drug Discov*, 8, 139-52.

- FRANCO, L. H., FLEURI, A. K. A., PELLISON, N. C., QUIRINO, G. F. S., HORTA, C. V., DE CARVALHO, R. V. H., OLIVEIRA, S. C. & ZAMBONI, D. S. 2017. Autophagy downstream of endosomal Toll-like receptor signaling in macrophages is a key mechanism for resistance to *Leishmania major* infection. *J Biol Chem*, 292, 13087-13096.
- FREEMERMAN, A. J., ZHAO, L., PINGILI, A. K., TENG, B., COZZO, A. J., FULLER, A. M., JOHNSON, A. R., MILNER, J. J., LIM, M. F., GALANKO, J. A., BECK, M. A., BEAR, J. E., ROTTY, J. D., BEZAVADA, L., SMALLWOOD, H. S., PUCHOWICZ, M. A., LIU, J., LOCASALE, J. W., LEE, D. P., BENNETT, B. J., ABEL, E. D., RATHMELL, J. C. & MAKOWSKI, L. 2019. Myeloid Slc2a1-Deficient Murine Model Revealed Macrophage Activation and Metabolic Phenotype Are Fueled by GLUT1. *J Immunol*, 202, 1265-1286.
- FUJISAKI, J., WU, J., CARLSON, A. L., SILBERSTEIN, L., PUTHETI, P., LAROCCA, R., GAO, W., SAITO, T. I., LO CELSO, C., TSUYUZAKI, H., SATO, T., COTE, D., SYKES, M., STROM, T. B., SCADDEN, D. T. & LIN, C. P. 2011. In vivo imaging of Treg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche. *Nature*, 474, 216-9.
- FUJITA, S., MUKAI, T., MITO, T., KODAMA, S., NAGASU, A., KITAKA, M., SONE, T., UEKI, Y. & MORITA, Y. 2018. Pharmacological inhibition of tankyrase induces bone loss in mice by increasing osteoclastogenesis. *Bone*, 106, 156-166.
- FUNES, S. C., RIOS, M., ESCOBAR-VERA, J. & KALERGIS, A. M. 2018. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology*, 154, 186-195.
- FUTERMAN, A. H. & HANNUN, Y. A. 2004. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep*, 5, 777-82.
- GALAN-DIEZ, M. & KOUSTENI, S. 2017. The osteoblastic niche in hematopoiesis and hematological myeloid malignancies. *Curr Mol Biol Rep*, 3, 53-62.
- GALLAHAN, D. & CALLAHAN, R. 1997. The mouse mammary tumor associated gene INT3 is a unique member of the NOTCH gene family (NOTCH4). *Oncogene*, 14, 1883-90.
- GAN, B., HU, J., JIANG, S., LIU, Y., SAHIN, E., ZHUANG, L., FLETCHER-SANANIKONE, E., COLLA, S., WANG, Y. A., CHIN, L. & DEPINHO, R. A. 2010. Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells. *Nature*, 468, 701-4.
- GAO, B. 2012. Wnt regulation of planar cell polarity (PCP). *Curr Top Dev Biol*, 101, 263-95.
- GAO, B., SONG, H., BISHOP, K., ELLIOT, G., GARRETT, L., ENGLISH, M. A., ANDRE, P., ROBINSON, J., SOOD, R., MINAMI, Y., ECONOMIDES, A. N. & YANG, Y. 2011. Wnt signaling gradients establish planar cell polarity by inducing Vangl2 phosphorylation through Ror2. *Dev Cell*, 20, 163-76.
- GAO, S., HU, J., WU, X. & LIANG, Z. 2018. PMA treated THP-1-derived-IL-6 promotes EMT of SW48 through STAT3/ERK-dependent activation of Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Biomed Pharmacother*, 108, 618-624.
- GAO, T., LIN, M., SHAO, B., ZHOU, Q., WANG, Y., CHEN, X., ZHAO, D., DAI, X., SHEN, C., CHENG, H., YANG, S., LI, H., ZHENG, B., ZHONG, X., YU, J., CHEN, L. & HUANG, X. 2020. BMI1 promotes steroidogenesis through maintaining redox homeostasis in mouse MLTC-1 and primary Leydig cells. *Cell Cycle*, 19, 1884-1898.
- GARCIA-CASTRO, B., ALVAREZ-ZAVALA, M., RIVEROS-MAGANA, A. R., ORTIZ-LAZARENO, P. C., RATKOVICH-GONZALEZ, S., HERNANDEZ-FLORES, G., BRAVO-CUELLAR, A., JAVE-SUAREZ, L. F. & AGUILAR-LEMARROY, A. 2013. Restoration of WNT4 inhibits cell growth in leukemia-derived cell lines. *BMC Cancer*, 13, 557.

- GE, T., YANG, J., ZHOU, S., WANG, Y., LI, Y. & TONG, X. 2020. The Role of the Pentose Phosphate Pathway in Diabetes and Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11, 365.
- GEISSMANN, F., MANZ, M. G., JUNG, S., SIEWEKE, M. H., MERAD, M. & LEY, K. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 327, 656-61.
- GEORGIU, K. R., SCHERER, M. A., KING, T. J., FOSTER, B. K. & XIAN, C. J. 2012. Deregulation of the CXCL12/CXCR4 axis in methotrexate chemotherapy-induced damage and recovery of the bone marrow microenvironment. *Int J Exp Pathol*, 93, 104-14.
- GERMANO, G., FRAPOLLI, R., BELGIOVINE, C., ANSELMO, A., PESCE, S., LIGUORI, M., ERBA, E., UBOLDI, S., ZUCCHETTI, M., PASQUALINI, F., NEBULONI, M., VAN ROOIJEN, N., MORTARINI, R., BELTRAME, L., MARCHINI, S., FUSO NERINI, I., SANFILIPPO, R., CASALI, P. G., PILOTTI, S., GALMARINI, C. M., ANICHINI, A., MANTOVANI, A., D'INCALCI, M. & ALLAVENA, P. 2013. Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. *Cancer Cell*, 23, 249-62.
- GHAEDI, M., STEER, C. A., MARTINEZ-GONZALEZ, I., HALIM, T. Y. F., ABRAHAM, N. & TAKEI, F. 2016. Common-Lymphoid-Progenitor-Independent Pathways of Innate and T Lymphocyte Development. *Cell Rep*, 15, 471-480.
- GHOLAMIN, S., MITRA, S. S., FEROZE, A. H., LIU, J., KAHN, S. A., ZHANG, M., ESPARZA, R., RICHARD, C., RAMASWAMY, V., REMKE, M., VOLKMER, A. K., WILLINGHAM, S., PONNUSWAMI, A., MCCARTY, A., LOVELACE, P., STORM, T. A., SCHUBERT, S., HUTTER, G., NARAYANAN, C., CHU, P., RAABE, E. H., HARSH, G. T., TAYLOR, M. D., MONJE, M., CHO, Y. J., MAJETI, R., VOLKMER, J. P., FISHER, P. G., GRANT, G., STEINBERG, G. K., VOGEL, H., EDWARDS, M., WEISSMAN, I. L. & CHESHER, S. H. 2017. Disrupting the CD47-SIRPalpha anti-phagocytic axis by a humanized anti-CD47 antibody is an efficacious treatment for malignant pediatric brain tumors. *Sci Transl Med*, 9.
- GINGRAS, A. C., GYGI, S. P., RAUGHT, B., POLAKIEWICZ, R. D., ABRAHAM, R. T., HOEKSTRA, M. F., AEBERSOLD, R. & SONENBERG, N. 1999. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev*, 13, 1422-37.
- GIORDANO, D., LI, C., SUTHAR, M. S., DRAVES, K. E., MA, D. Y., GALE, M., JR. & CLARK, E. A. 2011. Nitric oxide controls an inflammatory-like Ly6C(hi)PDCA1+ DC subset that regulates Th1 immune responses. *J Leukoc Biol*, 89, 443-55.
- GIRI, S. & SHAHA, C. 2019. Leishmania donovani parasite requires Atg8 protein for infectivity and survival under stress. *Cell Death Dis*, 10, 808.
- GNANT, M., MLINERITSCH, B., STOEGER, H., LUSCHIN-EBENGREUTH, G., HECK, D., MENZEL, C., JAKESZ, R., SEIFERT, M., HUBALEK, M., PRISTAUF, G., BAUERNHOFER, T., EIDTMANN, H., EIERMANN, W., STEGER, G., KWASNY, W., DUBSKY, P., HOCHREINER, G., FORSTHUBER, E. P., FESL, C. & GREIL, R. 2011. Adjuvant endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal women with early-stage breast cancer: 62-month follow-up from the ABCSG-12 randomised trial. *Lancet Oncol*, 12, 631-41.
- GOGGOLIDOU, P. 2014. Wnt and planar cell polarity signaling in cystic renal disease. *Organogenesis*, 10, 86-95.
- GOLAN, T., YANIV, A., BAFICO, A., LIU, G. & GAZIT, A. 2004. The human Frizzled 6 (HFz6) acts as a negative regulator of the canonical Wnt. beta-catenin signaling cascade. *J Biol Chem*, 279, 14879-88.

- GOODELL, M. A., BROSE, K., PARADIS, G., CONNER, A. S. & MULLIGAN, R. C. 1996. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*, 183, 1797-806.
- GOODRICH, L. V. & STRUTT, D. 2011. Principles of planar polarity in animal development. *Development*, 138, 1877-92.
- GORDON, S. 2008. Elie Metchnikoff: father of natural immunity. *Eur J Immunol*, 38, 3257-64.
- GORDON, S. & PLUDDMANN, A. 2017. Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC Biol*, 15, 53.
- GORDON, S. & TAYLOR, P. R. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 5, 953-64.
- GORDON, S. R., MAUTE, R. L., DULKEN, B. W., HUTTER, G., GEORGE, B. M., MCCRACKEN, M. N., GUPTA, R., TSAI, J. M., SINHA, R., COREY, D., RING, A. M., CONNOLLY, A. J. & WEISSMAN, I. L. 2017. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature*, 545, 495-499.
- GOTTLÖB, K., MAJEWSKI, N., KENNEDY, S., KANDEL, E., ROBEY, R. B. & HAY, N. 2001. Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev*, 15, 1406-18.
- GREENBAUM, A. M., REVOLLO, L. D., WOLOSZYNEK, J. R., CIVITELLI, R. & LINK, D. C. 2012. N-cadherin in osteolineage cells is not required for maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood*, 120, 295-302.
- GRIFFIN, G. K., NEWTON, G., TARRIO, M. L., BU, D. X., MAGANTO-GARCIA, E., AZCUTIA, V., ALCAIDE, P., GRABIE, N., LUSCINSKAS, F. W., CROCE, K. J. & LICHTMAN, A. H. 2012. IL-17 and TNF-alpha sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. *J Immunol*, 188, 6287-99.
- GRISHAM, M. B., JOHNSON, G. G. & LANCASTER, J. R., JR. 1996. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol*, 268, 237-46.
- GROSS, A., ZALTSMAN, Y. & MARYANOVICH, M. 2016. The ATM-BID pathway plays a critical role in the DNA damage response by regulating mitochondria metabolism. *Cell Death Differ*, 23, 182.
- GROSS, J. C., CHAUDHARY, V., BARTSCHERER, K. & BOUTROS, M. 2012. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol*, 14, 1036-45.
- GRUMOLATO, L., LIU, G., MONG, P., MUDBHARY, R., BISWAS, R., ARROYAVE, R., VIJAYAKUMAR, S., ECONOMIDES, A. N. & AARONSON, S. A. 2010. Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes Dev*, 24, 2517-30.
- GUERRERO, A. R., UCHIDA, K., NAKAJIMA, H., WATANABE, S., NAKAMURA, M., JOHNSON, W. E. & BABA, H. 2012. Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice. *J Neuroinflammation*, 9, 40.
- GURUMURTHY, S., XIE, S. Z., ALAGESAN, B., KIM, J., YUSUF, R. Z., SAEZ, B., TZATSOS, A., OZSOLAK, F., MILOS, P., FERRARI, F., PARK, P. J., SHIRIHAI, O. S., SCADDEN, D. T. & BARDEESY, N. 2010. The Lkb1 metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival. *Nature*, 468, 659-63.

- GUZY, R. D. & SCHUMACKER, P. T. 2006. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol*, 91, 807-19.
- HAKA, A. S., GROSHEVA, I., CHIANG, E., BUXBAUM, A. R., BAIRD, B. A., PIERINI, L. M. & MAXFIELD, F. R. 2009. Macrophages create an acidic extracellular hydrolytic compartment to digest aggregated lipoproteins. *Mol Biol Cell*, 20, 4932-40.
- HALLESKOG, C., MULDER, J., DAHLSTROM, J., MACKIE, K., HORTOBAGYI, T., TANILA, H., KUMAR PULI, L., FARBER, K., HARKANY, T. & SCHULTE, G. 2011. WNT signaling in activated microglia is proinflammatory. *Glia*, 59, 119-31.
- HAM, M., LEE, J. W., CHOI, A. H., JANG, H., CHOI, G., PARK, J., KOZUKA, C., SEARS, D. D., MASUZAKI, H. & KIM, J. B. 2013. Macrophage glucose-6-phosphate dehydrogenase stimulates proinflammatory responses with oxidative stress. *Mol Cell Biol*, 33, 2425-35.
- HAMILTON, J. A. 2008. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*, 8, 533-44.
- HAMILTON, J. A. 2020. GM-CSF in inflammation. *J Exp Med*, 217.
- HAMMAMI, A., ABIDIN, B. M., CHARPENTIER, T., FABIE, A., DUGUAY, A.-P., HEINONEN, K. M. & STAGER, S. 2017. HIF-1 alpha is a key regulator in potentiating suppressor activity and limiting the microbicidal capacity of MDSC-like cells during visceral leishmaniasis. *Plos Pathogens*, 13.
- HAQUE, A., MORIYAMA, M., KUBOTA, K., ISHIGURO, N., SAKAMOTO, M., CHINJU, A., MOCHIZUKI, K., SAKAMOTO, T., KANEKO, N., MUNEMURA, R., MAEHARA, T., TANAKA, A., HAYASHIDA, J. N., KAWANO, S., KIYOSHIMA, T. & NAKAMURA, S. 2019. CD206(+) tumor-associated macrophages promote proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma via EGF production. *Sci Rep*, 9, 14611.
- HARA, K., MARUKI, Y., LONG, X., YOSHINO, K., OSHIRO, N., HIDAYAT, S., TOKUNAGA, C., AVRUCH, J. & YONEZAWA, K. 2002. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*, 110, 177-89.
- HARBER, K. J., DE GOEDE, K. E., VERBERK, S. G. S., MEINSTER, E., DE VRIES, H. E., VAN WEEGHEL, M., DE WINTHER, M. P. J. & VAN DEN BOSSCHE, J. 2020. Succinate Is an Inflammation-Induced Immunoregulatory Metabolite in Macrophages. *Metabolites*, 10.
- HARMEY, J. H., DIMITRIADIS, E., KAY, E., REDMOND, H. P. & BOUCHIER-HAYES, D. 1998. Regulation of macrophage production of vascular endothelial growth factor (VEGF) by hypoxia and transforming growth factor beta-1. *Ann Surg Oncol*, 5, 271-8.
- HARRISON, J. S., RAMESHWAR, P., CHANG, V. & BANDARI, P. 2002. Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. *Blood*, 99, 394.
- HASHIMOTO, D., CHOW, A., NOIZAT, C., TEO, P., BEASLEY, M. B., LEBOEUF, M., BECKER, C. D., SEE, P., PRICE, J., LUCAS, D., GRETER, M., MORTHA, A., BOYER, S. W., FORSBERG, E. C., TANAKA, M., VAN ROOIJEN, N., GARCIA-SASTRE, A., STANLEY, E. R., GINHOUX, F., FRENETTE, P. S. & MERAD, M. 2013. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*, 38, 792-804.
- HAYASHI, S., YAMADA, T., TSUNETO, M., YAMANE, T., TAKAHASHI, M., SHULTZ, L. D. & YAMAZAKI, H. 2003. Distinct osteoclast precursors in the bone marrow and extramedullary organs characterized by responsiveness to Toll-like receptor ligands and TNF-alpha. *J Immunol*, 171, 5130-9.

- HAYASHI, Y., YOKOTA, A., HARADA, H. & HUANG, G. 2019. Hypoxia/pseudohypoxia-mediated activation of hypoxia-inducible factor-1alpha in cancer. *Cancer Sci*, 110, 1510-1517.
- HEINONEN, K. M., DUBE, N., BOURDEAU, A., LAPP, W. S. & TREMBLAY, M. L. 2006. Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates macrophage development through CSF-1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 2776-81.
- HEINONEN, K. M., VANEGAS, J. R., BROCHU, S., SHAN, J., VAINIO, S. J. & PERREAULT, C. 2011a. Wnt4 regulates thymic cellularity through the expansion of thymic epithelial cells and early thymic progenitors. *Blood*, 118, 5163-5173.
- HEINONEN, K. M., VANEGAS, J. R., LEW, D., KROSL, J. & PERREAULT, C. 2011b. Wnt4 enhances murine hematopoietic progenitor cell expansion through a planar cell polarity-like pathway. *PLoS One*, 6, e19279.
- HELLER, C., KUHN, M. C., MULDER-OPGENOORTH, B., SCHOTT, M., WILLENBERG, H. S., SCHERBAUM, W. A. & SCHINNER, S. 2011. Exendin-4 upregulates the expression of Wnt-4, a novel regulator of pancreatic beta-cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 301, E864-72.
- HELLER, N. M., GWINN, W. M., DONNELLY, R. P., CONSTANT, S. L. & KEEGAN, A. D. 2012. IL-4 engagement of the type I IL-4 receptor complex enhances mouse eosinophil migration to eotaxin-1 in vitro. *PLoS One*, 7, e39673.
- HELLER, N. M., QI, X., JUNTILA, I. S., SHIREY, K. A., VOGEL, S. N., PAUL, W. E. & KEEGAN, A. D. 2008. Type I IL-4Rs selectively activate IRS-2 to induce target gene expression in macrophages. *Sci Signal*, 1, ra17.
- HEMMATI, S., SINCLAIR, T., TONG, M., BARTHOLDY, B., OKABE, R. O., AMES, K., OSTRODKA, L., HAQUE, T., KAUR, I., MILLS, T. S., AGARWAL, A., PIETRAS, E. M., ZHAO, J. J., ROBERTS, T. M. & GRITSMAN, K. 2019. PI3 kinase alpha and delta promote hematopoietic stem cell activation. *JCI Insight*, 5.
- HENDERSON, B. R. & FAGOTTO, F. 2002. The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. *EMBO Rep*, 3, 834-9.
- HENKEL, G. W., MCKERCHER, S. R. & MAKI, R. A. 2002. Identification of three genes up-regulated in PU.1 rescued monocytic precursor cells. *Int Immunol*, 14, 723-32.
- HENZE, A. T. & MAZZONE, M. 2016. The impact of hypoxia on tumor-associated macrophages. *J Clin Invest*, 126, 3672-3679.
- HERSHEY, G. K. 2003. IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. *J Allergy Clin Immunol*, 111, 677-90; quiz 691.
- HETU-ARBOUR, R., BOUALI, S. & HEINONEN, K. M. 2021a. Experimental Competitive Bone Marrow Transplant Assays. *Methods Mol Biol*, 2185, 195-214.
- HETU-ARBOUR, R., TLILI, M., BANDEIRA FERREIRA, F. L., ABIDIN, B. M., KWARTENG, E. O. & HEINONEN, K. M. 2021b. Cell-intrinsic Wnt4 promotes hematopoietic stem and progenitor cell self-renewal. *Stem Cells*.
- HIRATA, Y., FURUHASHI, K., ISHII, H., LI, H. W., PINHO, S., DING, L., ROBSON, S. C., FRENETTE, P. S. & FUJISAKI, J. 2018. CD150(high) Bone Marrow Tregs Maintain Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Immune Privilege via Adenosine. *Cell Stem Cell*, 22, 445-453 e5.

- HIRATA, Y., KAKIUCHI, M., ROBSON, S. C. & FUJISAKI, J. 2019. CD150(high) CD4 T cells and CD150(high) regulatory T cells regulate hematopoietic stem cell quiescence via CD73. *Haematologica*, 104, 1136-1142.
- HIRAYAMA, D., IIDA, T. & NAKASE, H. 2017. The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. *Int J Mol Sci*, 19.
- HITOSUGI, T., KANG, S., VANDER HEIDEN, M. G., CHUNG, T. W., ELF, S., LYTHGOE, K., DONG, S., LONIAL, S., WANG, X., CHEN, G. Z., XIE, J., GU, T. L., POLAKIEWICZ, R. D., ROESEL, J. L., BOGGON, T. J., KHURI, F. R., GILLILAND, D. G., CANTLEY, L. C., KAUFMAN, J. & CHEN, J. 2009. Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth. *Sci Signal*, 2, ra73.
- HO, T. T., WARR, M. R., ADELMAN, E. R., LANSINGER, O. M., FLACH, J., VEROVSKAYA, E. V., FIGUEROA, M. E. & PASSEGUE, E. 2017. Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. *Nature*, 543, 205-210.
- HOEFFEL, G. & GINHOUX, F. 2018. Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. *Cell Immunol*, 330, 5-15.
- HOFER, T. & RODEWALD, H. R. 2018. Differentiation-based model of hematopoietic stem cell functions and lineage pathways. *Blood*, 132, 1106-1113.
- HONG, Y., ZENG, J., WANG, X., DRLICA, K. & ZHAO, X. 2019. Post-stress bacterial cell death mediated by reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 10064-10071.
- HORNSTEIN, I., ALCOVER, A. & KATZAV, S. 2004. Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization. *Cell Signal*, 16, 1-11.
- HOSHINO, K., TAKEUCHI, O., KAWAI, T., SANJO, H., OGAWA, T., TAKEDA, Y., TAKEDA, K. & AKIRA, S. 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol*, 162, 3749-52.
- HOUTEN, S. M. & WANDERS, R. J. 2010. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *J Inherit Metab Dis*, 33, 469-77.
- HSU, P. P. & SABATINI, D. M. 2008. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 134, 703-7.
- HU, X., HERRERO, C., LI, W. P., ANTONIV, T. T., FALCK-PEDERSEN, E., KOCH, A. E., WOODS, J. M., HAINES, G. K. & IVASHKIV, L. B. 2002. Sensitization of IFN-gamma Jak-STAT signaling during macrophage activation. *Nat Immunol*, 3, 859-66.
- HU, X. & IVASHKIV, L. B. 2009. Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity*, 31, 539-50.
- HUANG, H. & HE, X. 2008. Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr Opin Cell Biol*, 20, 119-25.
- HUANG, S. C., EVERTS, B., IVANOVA, Y., O'SULLIVAN, D., NASCIMENTO, M., SMITH, A. M., BEATTY, W., LOVE-GREGORY, L., LAM, W. Y., O'NEILL, C. M., YAN, C., DU, H., ABUMRAD, N. A., URBAN, J. F., JR., ARTYOMOV, M. N., PEARCE, E. L. & PEARCE, E. J. 2014. Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. *Nat Immunol*, 15, 846-55.
- HUANG, S. C., SMITH, A. M., EVERTS, B., COLONNA, M., PEARCE, E. L., SCHILLING, J. D. & PEARCE, E. J. 2016. Metabolic Reprogramming Mediated by the mTORC2-IRF4 Signaling Axis Is Essential for Macrophage Alternative Activation. *Immunity*, 45, 817-830.

- HUI, S., GHERGUROVICH, J. M., MORSCHER, R. J., JANG, C., TENG, X., LU, W., ESPARZA, L. A., REYA, T., LE, Z., YANXIANG GUO, J., WHITE, E. & RABINOWITZ, J. D. 2017. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate. *Nature*, 551, 115-118.
- HUNG, L. Y., JOHNSON, J. L., JI, Y., CHRISTIAN, D. A., HERBINE, K. R., PASTORE, C. F. & HERBERT, D. R. 2019a. Cell-Intrinsic Wnt4 Influences Conventional Dendritic Cell Fate Determination to Suppress Type 2 Immunity. *J Immunol*, 203, 511-519.
- HUNG, L. Y., SEN, D., ONISKEY, T. K., KATZEN, J., COHEN, N. A., VAUGHAN, A. E., NIEVES, W., URISMAN, A., BEERS, M. F., KRUMMEL, M. F. & HERBERT, D. R. 2019b. Macrophages promote epithelial proliferation following infectious and non-infectious lung injury through a Trefoil factor 2-dependent mechanism. *Mucosal Immunol*, 12, 64-76.
- HUR, J., CHOI, J. I., LEE, H., NHAM, P., KIM, T. W., CHAE, C. W., YUN, J. Y., KANG, J. A., KANG, J., LEE, S. E., YOON, C. H., BOO, K., HAM, S., ROH, T. Y., JUN, J. K., LEE, H., BAEK, S. H. & KIM, H. S. 2016. CD82/KAI1 Maintains the Dormancy of Long-Term Hematopoietic Stem Cells through Interaction with DARC-Expressing Macrophages. *Cell Stem Cell*, 18, 508-21.
- HUTCHINS, B. I., LI, L. & KALIL, K. 2012. Wnt-induced calcium signaling mediates axon growth and guidance in the developing corpus callosum. *Sci Signal*, 5, pt1.
- HUYNH, J., KWA, M. Q., COOK, A. D., HAMILTON, J. A. & SCHOLZ, G. M. 2012. CSF-1 receptor signalling from endosomes mediates the sustained activation of Erk1/2 and Akt in macrophages. *Cell Signal*, 24, 1753-61.
- IACOBACCI, V., INFANTINO, V., CASTEGNA, A., MENGA, A., PALMIERI, E. M., CONVERTINI, P. & PALMIERI, F. 2017. Mitochondrial carriers in inflammation induced by bacterial endotoxin and cytokines. *Biol Chem*, 398, 303-317.
- ICHII, M., FRANK, M. B., IOZZO, R. V. & KINCADE, P. W. 2012. The canonical Wnt pathway shapes niches supportive of hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*, 119, 1683-92.
- IMMGEN <http://rstats.immgen.org/Skyline/skyline.html>.
- INABA, K., INABA, M., ROMANI, N., AYA, H., DEGUCHI, M., IKEHARA, S., MURAMATSU, S. & STEINMAN, R. M. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*, 176, 1693-702.
- INFANTINO, V., CONVERTINI, P., CUCCI, L., PANARO, M. A., DI NOIA, M. A., CALVELLO, R., PALMIERI, F. & IACOBACCI, V. 2011. The mitochondrial citrate carrier: a new player in inflammation. *Biochem J*, 438, 433-6.
- INFANTINO, V., IACOBACCI, V., MENGA, A., AVANTAGGIATI, M. L. & PALMIERI, F. 2014. A key role of the mitochondrial citrate carrier (SLC25A1) in TNFalpha- and IFNgamma-triggered inflammation. *Biochim Biophys Acta*, 1839, 1217-1225.
- ISHIHARA, K. & HIRANO, T. 2002. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13, 357-68.
- ITALIANI, P. & BORASCHI, D. 2014. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol*, 5, 514.
- ITASAKI, N., JONES, C. M., MERCURIO, S., ROWE, A., DOMINGOS, P. M., SMITH, J. C. & KRUMLAUF, R. 2003. Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling. *Development*, 130, 4295-305.



- ITO, I., ASAI, A., SUZUKI, S., KOBAYASHI, M. & SUZUKI, F. 2017. M2b macrophage polarization accompanied with reduction of long noncoding RNA GAS5. *Biochem Biophys Res Commun*, 493, 170-175.
- ITO, I., BHOPALE, K. K., NISHIGUCHI, T., LEE, J. O., HERNDON, D. N., SUZUKI, S., SOWERS, L. C., SUZUKI, F. & KOBAYASHI, M. 2016. The Polarization of M2b Monocytes in Cultures of Burn Patient Peripheral CD14(+) Cells Treated with a Selected Human CCL1 Antisense Oligodeoxynucleotide. *Nucleic Acid Ther*, 26, 269-276.
- ITO, K., HIRAO, A., ARAI, F., MATSUOKA, S., TAKUBO, K., HAMAGUCHI, I., NOMIYAMA, K., HOSOKAWA, K., SAKURADA, K., NAKAGATA, N., IKEDA, Y., MAK, T. W. & SUDA, T. 2004. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 431, 997-1002.
- JABLONSKI, K. A., AMICI, S. A., WEBB, L. M., RUIZ-ROSADO JDE, D., POPOVICH, P. G., PARTIDA-SANCHEZ, S. & GUERAU-DE-ARELLANO, M. 2015. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS One*, 10, e0145342.
- JANEWAY CA JR, T. P., WALPORT M, ET AL. 2001. Principles of innate and adaptive immunity. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition*.
- JANG, Y. Y. & SHARKIS, S. J. 2007. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*, 110, 3056-63.
- JANZEN, V., FORKERT, R., FLEMING, H. E., SAITO, Y., WARING, M. T., DOMBKOWSKI, D. M., CHENG, T., DEPINHO, R. A., SHARPLESS, N. E. & SCADDEN, D. T. 2006. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature*, 443, 421-6.
- JAYASINGAM, S. D., CITARTAN, M., THANG, T. H., MAT ZIN, A. A., ANG, K. C. & CH'NG, E. S. 2019. Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice. *Front Oncol*, 9, 1512.
- JEAYS-WARD, K., DANDONNEAU, M. & SWAIN, A. 2004. Wnt4 is required for proper male as well as female sexual development. *Dev Biol*, 276, 431-40.
- JENNY, A., REYNOLDS-KENNEALLY, J., DAS, G., BURNETT, M. & MLODZIK, M. 2005. Diego and Prickle regulate Frizzled planar cell polarity signalling by competing for Dishevelled binding. *Nat Cell Biol*, 7, 691-7.
- JHA, A. K., HUANG, S. C., SERGUSHICHEV, A., LAMPROPOULOU, V., IVANOVA, Y., LOGINICHEVA, E., CHMIELEWSKI, K., STEWART, K. M., ASHALL, J., EVERTS, B., PEARCE, E. J., DRIGGERS, E. M. & ARTYOMOV, M. N. 2015a. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity*, 42, 419-30.
- JHA, M. K., SONG, G. J., LEE, M. G., JEOUNG, N. H., GO, Y., HARRIS, R. A., PARK, D. H., KOOK, H., LEE, I. K. & SUK, K. 2015b. Metabolic Connection of Inflammatory Pain: Pivotal Role of a Pyruvate Dehydrogenase Kinase-Pyruvate Dehydrogenase-Lactic Acid Axis. *J Neurosci*, 35, 14353-69.
- JIANG, H., HARRIS, M. B. & ROTHMAN, P. 2000. IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. *J Allergy Clin Immunol*, 105, 1063-70.
- JIANG, H., WESTERTERP, M., WANG, C., ZHU, Y. & AI, D. 2014. Macrophage mTORC1 disruption reduces inflammation and insulin resistance in obese mice. *Diabetologia*, 57, 2393-404.

- JORDAN, B. K., SHEN, J. H., OLASO, R., INGRAHAM, H. A. & VILAIN, E. 2003. Wnt4 overexpression disrupts normal testicular vasculature and inhibits testosterone synthesis by repressing steroidogenic factor 1/beta-catenin synergy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 10866-71.
- JS, L., CC, N., WK, G. & DD, T. 2017. Mouse mammary tumour virus (MMTV) and human breast cancer with neuroendocrine differentiation. *Infect Agent Cancer*, 12, 24.
- JULIUSSON, G. & HOUGH, R. 2016. Leukemia. *Prog Tumor Res*, 43, 87-100.
- JUNG, H. E., SHIM, Y. R., OH, J. E., OH, D. S. & LEE, H. K. 2019. The autophagy Protein Atg5 Plays a Crucial Role in the Maintenance and Reconstitution Ability of Hematopoietic Stem Cells. *Immune Netw*, 19, e12.
- JUNG, Y. S. & PARK, J. I. 2020. Wnt signaling in cancer: therapeutic targeting of Wnt signaling beyond beta-catenin and the destruction complex. *Exp Mol Med*, 52, 183-191.
- JUNTTILA, I. S. 2018. Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes. *Front Immunol*, 9, 888.
- KABIRI, Z., NUMATA, A., KAWASAKI, A., EDISON, TENEN, D. G. & VIRSHUP, D. M. 2015. Wnts are dispensable for differentiation and self-renewal of adult murine hematopoietic stem cells. *Blood*, 126, 1086-94.
- KAIKO, G. E., HORVAT, J. C., BEAGLEY, K. W. & HANSBRO, P. M. 2008. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology*, 123, 326-38.
- KAMER, I., SARIG, R., ZALTSMAN, Y., NIV, H., OBERKOVITZ, G., REGEV, L., HAIMOVICH, G., LERENTHAL, Y., MARCELLUS, R. C. & GROSS, A. 2005. Proapoptotic BID is an ATM effector in the DNA-damage response. *Cell*, 122, 593-603.
- KAPOOR, N., NIU, J., SAAD, Y., KUMAR, S., SIRAKOVA, T., BECERRA, E., LI, X. & KOLATTUKUDY, P. E. 2015. Transcription factors STAT6 and KLF4 implement macrophage polarization via the dual catalytic powers of MCP1P. *J Immunol*, 194, 6011-23.
- KARNOVSKY, M. L. 1981. Metchnikoff in Messina: a century of studies on phagocytosis. *N Engl J Med*, 304, 1178-80.
- KATAYAMA, Y., BATTISTA, M., KAO, W. M., HIDALGO, A., PEIRED, A. J., THOMAS, S. A. & FRENETTE, P. S. 2006. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell*, 124, 407-21.
- KAWANO, Y., FUKUI, C., SHINOHARA, M., WAKAHASHI, K., ISHII, S., SUZUKI, T., SATO, M., ASADA, N., KAWANO, H., MINAGAWA, K., SADA, A., FURUYASHIKI, T., UEMATSU, S., AKIRA, S., UEDE, T., NARUMIYA, S., MATSUI, T. & KATAYAMA, Y. 2017. G-CSF-induced sympathetic tone provokes fever and primes antimobilizing functions of neutrophils via PGE2. *Blood*, 129, 587-597.
- KAWASAKI, T. & KAWAI, T. 2014. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*, 5, 461.
- KAZANSKAYA, O., GLINKA, A., DEL BARCO BARRANTES, I., STANNEK, P., NIEHRS, C. & WU, W. 2004. R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Dev Cell*, 7, 525-34.
- KE, J., XU, H. E. & WILLIAMS, B. O. 2013. Lipid modification in Wnt structure and function. *Curr Opin Lipidol*, 24, 129-33.

- KELLY, B. & O'NEILL, L. A. 2015. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res*, 25, 771-84.
- KHAN, Y. A., ANDREWS, N. W. & MITTRA, B. 2018. ROS regulate differentiation of visceralizing Leishmania species into the virulent amastigote form. *Parasitol Open*, 4.
- KIDD, P. 2003. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev*, 8, 223-46.
- KIEBISH, M. A., HAN, X., CHENG, H., CHUANG, J. H. & SEYFRIED, T. N. 2008. Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria: lipidomic evidence supporting the Warburg theory of cancer. *J Lipid Res*, 49, 2545-56.
- KIEL, M. J., ACAR, M., RADICE, G. L. & MORRISON, S. J. 2009. Hematopoietic stem cells do not depend on N-cadherin to regulate their maintenance. *Cell Stem Cell*, 4, 170-9.
- KIEL, M. J., YILMAZ, O. H., IWASHITA, T., YILMAZ, O. H., TERHORST, C. & MORRISON, S. J. 2005. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*, 121, 1109-21.
- KILLICK-KENDRICK, R. 1990. The life-cycle of Leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann Parasitol Hum Comp*, 65 Suppl 1, 37-42.
- KIM, J., CHANG, W., JUNG, Y., SONG, K. & LEE, I. 2012. Wnt5a activates THP-1 monocytic cells via a beta-catenin-independent pathway involving JNK and NF-kappaB activation. *Cytokine*, 60, 242-8.
- KIM, S. Y. & NAIR, M. G. 2019. Macrophages in wound healing: activation and plasticity. *Immunol Cell Biol*, 97, 258-267.
- KIMELMAN, D. & XU, W. 2006. beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene*, 25, 7482-91.
- KISPERT, A., VAINIO, S. & MCMAHON, A. P. 1998. Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development*, 125, 4225-34.
- KITAGAWA, R. & KASTAN, M. B. 2005. The ATM-dependent DNA damage signaling pathway. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 70, 99-109.
- KITAJIMA, K., NAKAJIMA, M., KANOKODA, M., KYBA, M., DANDAPAT, A., TOLAR, J., SAITO, M. K., TOYODA, M., UMEZAWA, A. & HARA, T. 2016. GSK3beta inhibition activates the CDX/HOX pathway and promotes hemogenic endothelial progenitor differentiation from human pluripotent stem cells. *Exp Hematol*, 44, 68-74 e1-10.
- KLIONSKY, D. J. 2007. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 931-7.
- KNAPP, D. J., HAMMOND, C. A., AGHAEPOUR, N., MILLER, P. H., PELLACANI, D., BEER, P. A., SACHS, K., QIAO, W., WANG, W., HUMPHRIES, R. K., SAUVAGEAU, G., ZANDSTRA, P. W., BENDALL, S. C., NOLAN, G. P., HANSEN, C. & EAVES, C. J. 2017. Distinct signaling programs control human hematopoietic stem cell survival and proliferation. *Blood*, 129, 307-318.
- KOHLI, R. M. & ZHANG, Y. 2013. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 502, 472-9.
- KOHN, A. D. & MOON, R. T. 2005. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium*, 38, 439-46.

- KOIVUNEN, P., HIRSILA, M., REMES, A. M., HASSINEN, I. E., KIVIRIKKO, K. I. & MYLLYHARJU, J. 2007. Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: possible links between cell metabolism and stabilization of HIF. *J Biol Chem*, 282, 4524-4532.
- KOLLET, O., DAR, A., SHIVTIEL, S., KALINKOVICH, A., LAPID, K., SZTAINBERG, Y., TESIO, M., SAMSTEIN, R. M., GOICHBURG, P., SPIEGEL, A., ELSON, A. & LAPIDOT, T. 2006. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med*, 12, 657-64.
- KOLLIGS, F. T., BOMMER, G. & GOKE, B. 2002. Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion*, 66, 131-44.
- KOMEKADO, H., YAMAMOTO, H., CHIBA, T. & KIKUCHI, A. 2007. Glycosylation and palmitoylation of Wnt-3a are coupled to produce an active form of Wnt-3a. *Genes Cells*, 12, 521-34.
- KOMIYA, Y. & HABAS, R. 2008. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4, 68-75.
- KONDO, M. 2010. Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Immunol Rev*, 238, 37-46.
- KONO, H. & ROCK, K. L. 2008. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol*, 8, 279-89.
- KOPP, H. G., AVECILLA, S. T., HOOPER, A. T. & RAFII, S. 2005. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda)*, 20, 349-56.
- KORZH, V. & BREGESTOVSKI, P. 2016. [Elie Metchnikoff: father of phagocytosis theory and pioneer of experiments in vivo]. *Tsitol Genet*, 50, 75-82.
- KOSCSO, B., CSOKA, B., KOKAI, E., NEMETH, Z. H., PACHER, P., VIRAG, L., LEIBOVICH, S. J. & HASKO, G. 2013. Adenosine augments IL-10-induced STAT3 signaling in M2c macrophages. *J Leukoc Biol*, 94, 1309-15.
- KOTAS, M. E. & MEDZHITOV, R. 2015. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. *Cell*, 160, 816-827.
- KOUNAKIS, K., CHANIOTAKIS, M., MARKAKI, M. & TAVERNARAKIS, N. 2019. Emerging Roles of Lipophagy in Health and Disease. *Front Cell Dev Biol*, 7, 185.
- KOUZARIDES, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128, 693-705.
- KRAMER, O. H., KNAUER, S. K., GREINER, G., JANDT, E., REICHARDT, S., GUHRS, K. H., STAUBER, R. H., BOHMER, F. D. & HEINZEL, T. 2009. A phosphorylation-acetylation switch regulates STAT1 signaling. *Genes Dev*, 23, 223-35.
- KROON, E., KROSL, J., THORSTEINSDOTTIR, U., BABAN, S., BUCHBERG, A. M. & SAUVAGEAU, G. 1998. Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *EMBO J*, 17, 3714-25.
- KUIJL, C., SAVAGE, N. D., MARSMAN, M., TUIN, A. W., JANSSEN, L., EGAN, D. A., KETEMA, M., VAN DEN NIEUWENDIJK, R., VAN DEN EEDEN, S. J., GELUK, A., POOT, A., VAN DER MAREL, G., BEIJERSBERGEN, R. L., OVERKLEEF, H., OTTENHOFF, T. H. & NEEFJES, J. 2007. Intracellular bacterial growth is controlled by a kinase network around PKB/AKT1. *Nature*, 450, 725-30.

- KUMAR, A., DAS, S., MANDAL, A., VERMA, S., ABHISHEK, K., KUMAR, A., KUMAR, V., GHOSH, A. K. & DAS, P. 2018. Leishmania infection activates host mTOR for its survival by M2 macrophage polarization. *Parasite Immunol*, 40, e12586.
- KUNISAKI, Y., BRUNS, I., SCHEIERMANN, C., AHMED, J., PINHO, S., ZHANG, D., MIZOGUCHI, T., WEI, Q., LUCAS, D., ITO, K., MAR, J. C., BERGMAN, A. & FRENETTE, P. S. 2013. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*, 502, 637-43.
- KUWABARA, K., OGAWA, S., MATSUMOTO, M., KOGA, S., CLAUSS, M., PINSKY, D. J., LYN, P., LEAVY, J., WITTE, L., JOSEPH-SILVERSTEIN, J. & ET AL. 1995. Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 4606-10.
- KWAN, K. M. 2002. Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts. *Genesis*, 32, 49-62.
- KWARTENG, E. O. & HEINONEN, K. M. 2016. Competitive Transplants to Evaluate Hematopoietic Stem Cell Fitness. *J Vis Exp*.
- KWARTENG, E. O., HETU-ARBOUR, R. & HEINONEN, K. M. 2018. Frontline Science: Wnt/beta-catenin pathway promotes early engraftment of fetal hematopoietic stem/progenitor cells. *J Leukoc Biol*, 103, 381-393.
- LACEY, D. C., ACHUTHAN, A., FLEETWOOD, A. J., DINH, H., ROINIOTIS, J., SCHOLZ, G. M., CHANG, M. W., BECKMAN, S. K., COOK, A. D. & HAMILTON, J. A. 2012. Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J Immunol*, 188, 5752-65.
- LAMPROPOULOU, V., SERGUSHICHEV, A., BAMBOUSKOVA, M., NAIR, S., VINCENT, E. E., LOGINICHEVA, E., CERVANTES-BARRAGAN, L., MA, X., HUANG, S. C., GRISS, T., WEINHEIMER, C. J., KHADER, S., RANDOLPH, G. J., PEARCE, E. J., JONES, R. G., DIWAN, A., DIAMOND, M. S. & ARTYOMOV, M. N. 2016. Itaconate Links Inhibition of Succinate Dehydrogenase with Macrophage Metabolic Remodeling and Regulation of Inflammation. *Cell Metab*, 24, 158-66.
- LANG, R., RUTSCHMAN, R. L., GREAVES, D. R. & MURRAY, P. J. 2002. Autocrine deactivation of macrophages in transgenic mice constitutively overexpressing IL-10 under control of the human CD68 promoter. *J Immunol*, 168, 3402-11.
- LAOUI, D., MOVAHEDI, K., VAN OVERMEIRE, E., VAN DEN BOSSCHE, J., SCHOUPPE, E., MOMMER, C., NIKOLAOU, A., MORIAS, Y., DE BAETSELIER, P. & VAN GINDERACHTER, J. A. 2011. Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. *Int J Dev Biol*, 55, 861-7.
- LAU, T., CHAN, E., CALLOW, M., WAALER, J., BOGGS, J., BLAKE, R. A., MAGNUSON, S., SAMBRONE, A., SCHUTTEN, M., FIRESTEIN, R., MACHON, O., KORINEK, V., CHOO, E., DIAZ, D., MERCHANT, M., POLAKIS, P., HOLSWORTH, D. D., KRAUSS, S. & COSTA, M. 2013. A novel tankyrase small-molecule inhibitor suppresses APC mutation-driven colorectal tumor growth. *Cancer Res*, 73, 3132-44.
- LAURENTI, E. & GOTTGENS, B. 2018. From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature*, 553, 418-426.

- LECOULTRE, M., DUTOIT, V. & WALKER, P. R. 2020. Phagocytic function of tumor-associated macrophages as a key determinant of tumor progression control: a review. *J Immunother Cancer*, 8.
- LEE, A. J. & ASHKAR, A. A. 2018. The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. *Front Immunol*, 9, 2061.
- LEHRKE, M. & LAZAR, M. A. 2005. The many faces of PPARgamma. *Cell*, 123, 993-9.
- LEIFLER, K. S., SVENSSON, S., ABRAHAMSSON, A., BENDRIK, C., ROBERTSON, J., GAULDIE, J., OLSSON, A. K. & DABROSIN, C. 2013. Inflammation induced by MMP-9 enhances tumor regression of experimental breast cancer. *J Immunol*, 190, 4420-30.
- LENTO, W., ITO, T., ZHAO, C., HARRIS, J. R., HUANG, W., JIANG, C., OWZAR, K., PIRYANI, S., RACIOPPI, L., CHAO, N. & REYA, T. 2014. Loss of beta-catenin triggers oxidative stress and impairs hematopoietic regeneration. *Genes Dev*, 28, 995-1004.
- LERIN LUCKETT-CHASTAIN, K. C., TAYLER SCHATZ AND RANDLE M GALLUCCI 2016. IL-6 influences the balance between M1 and M2 macrophages in a mouse model of irritant contact dermatitis.
- LEVESQUE, J. P., HELWANI, F. M. & WINKLER, I. G. 2010. The endosteal 'osteoblastic' niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. *Leukemia*, 24, 1979-92.
- LEY, K. 2017. M1 Means Kill; M2 Means Heal. *J Immunol*, 199, 2191-2193.
- LHOUMEAU, A. C., ARCANGELI, M. L., DE GRANDIS, M., GIORDANO, M., ORSONI, J. C., LEMBO, F., BARDIN, F., MARCHETTO, S., AURRAND-LIONS, M. & BORG, J. P. 2016. Ptk7-Deficient Mice Have Decreased Hematopoietic Stem Cell Pools as a Result of Deregulated Proliferation and Migration. *J Immunol*, 196, 4367-77.
- LI, H., JIANG, T., LI, M. Q., ZHENG, X. L. & ZHAO, G. J. 2018. Transcriptional Regulation of Macrophages Polarization by MicroRNAs. *Front Immunol*, 9, 1175.
- LI, L., TAN, J., MIAO, Y., LEI, P. & ZHANG, Q. 2015. ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms. *Cell Mol Neurobiol*, 35, 615-21.
- LI, M., FANG, X., BAKER, D. J., GUO, L., GAO, X., WEI, Z., HAN, S., VAN DEURSEN, J. M. & ZHANG, P. 2010. The ATM-p53 pathway suppresses aneuploidy-induced tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 14188-93.
- LI, X., LI, Z., WANG, J., LI, Z., CUI, H., DAI, G., CHEN, S., ZHANG, M., ZHENG, Z., ZHAN, Z. & LIU, H. 2019. Wnt4 signaling mediates protective effects of melatonin on new bone formation in an inflammatory environment. *FASEB J*, 33, 10126-10139.
- LIEN, E. C., LYSSITIS, C. A. & CANTLEY, L. C. 2016. Metabolic Reprogramming by the PI3K-Akt-mTOR Pathway in Cancer. *Recent Results Cancer Res*, 207, 39-72.
- LIN, R., TAO, R., GAO, X., LI, T., ZHOU, X., GUAN, K. L., XIONG, Y. & LEI, Q. Y. 2013. Acetylation stabilizes ATP-citrate lyase to promote lipid biosynthesis and tumor growth. *Mol Cell*, 51, 506-518.
- LIN, S. L., LI, B., RAO, S., YEO, E. J., HUDSON, T. E., NOWLIN, B. T., PEI, H., CHEN, L., ZHENG, J. J., CARROLL, T. J., POLLARD, J. W., MCMAHON, A. P., LANG, R. A. & DUFFIELD, J. S. 2010. Macrophage Wnt7b is critical for kidney repair and regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 4194-9.
- LINTERMAN, M. A. & VINUESA, C. G. 2010. Signals that influence T follicular helper cell differentiation and function. *Semin Immunopathol*, 32, 183-96.

- LIU, A., WANG, Y., DING, Y., BAEZ, I., PAYNE, K. J. & BORGHESI, L. 2015. Cutting Edge: Hematopoietic Stem Cell Expansion and Common Lymphoid Progenitor Depletion Require Hematopoietic-Derived, Cell-Autonomous TLR4 in a Model of Chronic Endotoxin. *J Immunol*, 195, 2524-8.
- LIU, C., YU, S., KAPPES, J., WANG, J., GRIZZLE, W. E., ZINN, K. R. & ZHANG, H. G. 2007. Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host. *Blood*, 109, 4336-42.
- LIU, D. & UZONNA, J. E. 2012. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 83.
- LIU, L., LU, Y., MARTINEZ, J., BI, Y., LIAN, G., WANG, T., MILASTA, S., WANG, J., YANG, M., LIU, G., GREEN, D. R. & WANG, R. 2016. Proinflammatory signal suppresses proliferation and shifts macrophage metabolism from Myc-dependent to HIF1alpha-dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 1564-9.
- LIU, P. S., WANG, H., LI, X., CHAO, T., TEAV, T., CHRISTEN, S., DI CONZA, G., CHENG, W. C., CHOU, C. H., VAVAKOVA, M., MURET, C., DEBACKERE, K., MAZZONE, M., HUANG, H. D., FENDT, S. M., IVANISEVIC, J. & HO, P. C. 2017. alpha-ketoglutarate orchestrates macrophage activation through metabolic and epigenetic reprogramming. *Nat Immunol*, 18, 985-994.
- LIU, Y., XU, R., GU, H., ZHANG, E., QU, J., CAO, W., HUANG, X., YAN, H., HE, J. & CAI, Z. 2021. Metabolic reprogramming in macrophage responses. *Biomark Res*, 9, 1.
- LOEGL, J., HIDEN, U., NUSSBAUMER, E., SCHLIEFSTEINER, C., CVITIC, S., LANG, I., WADSACK, C., HUPPERTZ, B. & DESOYE, G. 2016. Hofbauer cells of M2a, M2b and M2c polarization may regulate fetoplacental angiogenesis. *Reproduction*, 152, 447-55.
- LOUIS, I., HEINONEN, K. M., CHAGRAOUI, J., VAINIO, S., SAUVAGEAU, G. & PERREAULT, C. 2008. The signaling protein Wnt4 enhances thymopoiesis and expands multipotent hematopoietic progenitors through beta-catenin-independent signaling. *Immunity*, 29, 57-67.
- LU, G., ZHANG, R., GENG, S., PENG, L., JAYARAMAN, P., CHEN, C., XU, F., YANG, J., LI, Q., ZHENG, H., SHEN, K., WANG, J., LIU, X., WANG, W., ZHENG, Z., QI, C. F., SI, C., HE, J. C., LIU, K., LIRA, S. A., SIKORA, A. G., LI, L. & XIONG, H. 2015. Myeloid cell-derived inducible nitric oxide synthase suppresses M1 macrophage polarization. *Nat Commun*, 6, 6676.
- LU, J., CAO, Q., ZHENG, D., SUN, Y., WANG, C., YU, X., WANG, Y., LEE, V. W., ZHENG, G., TAN, T. K., WANG, X., ALEXANDER, S. I., HARRIS, D. C. & WANG, Y. 2013. Discrete functions of M2a and M2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease. *Kidney Int*, 84, 745-55.
- LUDIN, A., GUR-COHEN, S., GOLAN, K., KAUFMANN, K. B., ITKIN, T., MEDAGLIA, C., LU, X. J., LEDERGOR, G., KOLLET, O. & LAPIDOT, T. 2014. Reactive oxygen species regulate hematopoietic stem cell self-renewal, migration and development, as well as their bone marrow microenvironment. *Antioxid Redox Signal*, 21, 1605-19.
- LUIS, T. C., NABER, B. A., FIBBE, W. E., VAN DONGEN, J. J. & STAAL, F. J. 2010. Wnt3a nonredundantly controls hematopoietic stem cell function and its deficiency results in complete absence of canonical Wnt signaling. *Blood*, 116, 496-7.

- LUIS, T. C., NABER, B. A., ROOZEN, P. P., BRUGMAN, M. H., DE HAAS, E. F., GHAZVINI, M., FIBBE, W. E., VAN DONGEN, J. J., FODDE, R. & STAAL, F. J. 2011. Canonical wnt signaling regulates hematopoiesis in a dosage-dependent fashion. *Cell Stem Cell*, 9, 345-56.
- LUIS, T. C., WEERKAMP, F., NABER, B. A., BAERT, M. R., DE HAAS, E. F., NIKOLIC, T., HEUVELMANS, S., DE KRIJGER, R. R., VAN DONGEN, J. J. & STAAL, F. J. 2009. Wnt3a deficiency irreversibly impairs hematopoietic stem cell self-renewal and leads to defects in progenitor cell differentiation. *Blood*, 113, 546-54.
- LUKE A. J. O'NEILL, R. J. K. A. J. R. 2016. A guide to immunometabolism for immunologists. *NATURE REVIEWS*.
- LUNT, S. Y. & VANDER HEIDEN, M. G. 2011. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27, 441-64.
- LUO, W., PETERSON, A., GARCIA, B. A., COOMBS, G., KOFAHL, B., HEINRICH, R., SHABANOWITZ, J., HUNT, D. F., YOST, H. J. & VIRSHUP, D. M. 2007. Protein phosphatase 1 regulates assembly and function of the beta-catenin degradation complex. *EMBO J*, 26, 1511-21.
- LUO, W. & SEMENZA, G. L. 2011. Pyruvate kinase M2 regulates glucose metabolism by functioning as a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 in cancer cells. *Oncotarget*, 2, 551-6.
- LUPARDUS, P. J., BIRNBAUM, M. E. & GARCIA, K. C. 2010. Molecular basis for shared cytokine recognition revealed in the structure of an unusually high affinity complex between IL-13 and IL-13Ralpha2. *Structure*, 18, 332-42.
- LURIER, E. B., DALTON, D., DAMPIER, W., RAMAN, P., NASSIRI, S., FERRARO, N. M., RAJAGOPALAN, R., SARMADY, M. & SPILLER, K. L. 2017. Transcriptome analysis of IL-10-stimulated (M2c) macrophages by next-generation sequencing. *Immunobiology*, 222, 847-856.
- LUZINA, I. G., KEEGAN, A. D., HELLER, N. M., ROOK, G. A., SHEA-DONOHUE, T. & ATAMAS, S. P. 2012. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives". *J Leukoc Biol*, 92, 753-64.
- LUZZATTO, L., NANNELLI, C. & NOTARO, R. 2016. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Hematol Oncol Clin North Am*, 30, 373-93.
- LYONS, J. P., MUELLER, U. W., JI, H., EVERETT, C., FANG, X., HSIEH, J. C., BARTH, A. M. & MCCREA, P. D. 2004. Wnt-4 activates the canonical beta-catenin-mediated Wnt pathway and binds Frizzled-6 CRD: functional implications of Wnt/beta-catenin activity in kidney epithelial cells. *Exp Cell Res*, 298, 369-87.
- LYONS, M. J. & MOORE, D. H. 1962. Purification of the mouse mammary tumour virus. *Nature*, 194, 1141-2.
- LYUKSYUTOVA, A. I., LU, C. C., MILANESIO, N., KING, L. A., GUO, N., WANG, Y., NATHANS, J., TESSIER-LAVIGNE, M. & ZOU, Y. 2003. Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. *Science*, 302, 1984-8.
- MACCIO, A., GRAMIGNANO, G., CHERCHI, M. C., TANCA, L., MELIS, L. & MADEDDU, C. 2020. Role of M1-polarized tumor-associated macrophages in the prognosis of advanced ovarian cancer patients. *Sci Rep*, 10, 6096.



- MACDONALD, B. T., TAMAI, K. & HE, X. 2009. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*, 17, 9-26.
- MACDONALD, R., BARNES, K., HASTINGS, C. & MORTIBOYS, H. 2018. Mitochondrial abnormalities in Parkinson's disease and Alzheimer's disease: can mitochondria be targeted therapeutically? *Biochem Soc Trans*, 46, 891-909.
- MACNAMARA, K. C., JONES, M., MARTIN, O. & WINSLOW, G. M. 2011. Transient activation of hematopoietic stem and progenitor cells by IFN $\gamma$  during acute bacterial infection. *PLoS One*, 6, e28669.
- MAITI, G., NASKAR, D. & SEN, M. 2012. The Wntless homolog Wnt5a stimulates phagocytosis but not bacterial killing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 16600-5.
- MAIURI, M. C., ZALCKVAR, E., KIMCHI, A. & KROEMER, G. 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 741-52.
- MALANDRINO, M. I., FUCHO, R., WEBER, M., CALDERON-DOMINGUEZ, M., MIR, J. F., VALCARCEL, L., ESCOTE, X., GOMEZ-SERRANO, M., PERAL, B., SALVADO, L., FERNANDEZ-VELEDO, S., CASALS, N., VAZQUEZ-CARRERA, M., VILLARROYA, F., VENDRELL, J. J., SERRA, D. & HERRERO, L. 2015. Enhanced fatty acid oxidation in adipocytes and macrophages reduces lipid-induced triglyceride accumulation and inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 308, E756-69.
- MALSIN, E. S., KIM, S., LAM, A. P. & GOTTARDI, C. J. 2019. Macrophages as a Source and Recipient of Wnt Signals. *Front Immunol*, 10, 1813.
- MAN, Y., YAO, X., YANG, T. & WANG, Y. 2021. Hematopoietic Stem Cell Niche During Homeostasis, Malignancy, and Bone Marrow Transplantation. *Front Cell Dev Biol*, 9, 621214.
- MANGIALARDI, G., CORDARO, A. & MADEDDU, P. 2016. The bone marrow pericyte: an orchestrator of vascular niche. *Regen Med*, 11, 883-895.
- MANTOVANI, A., SAVINO, B., LOCATI, M., ZAMMATARO, L., ALLAVENA, P. & BONECCHI, R. 2010. The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*, 21, 27-39.
- MANTOVANI, A., SICA, A., SOZZANI, S., ALLAVENA, P., VECCHI, A. & LOCATI, M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 25, 677-86.
- MANTOVANI, A., SOZZANI, S., LOCATI, M., ALLAVENA, P. & SICA, A. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*, 23, 549-55.
- MAO, B., WU, W., DAVIDSON, G., MARHOLD, J., LI, M., MECHLER, B. M., DELIUS, H., HOPPE, D., STANNEK, P., WALTER, C., GLINKA, A. & NIEHRS, C. 2002. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature*, 417, 664-7.
- MARCHETTI, P., FOVEZ, Q., GERMAIN, N., KHAMARI, R. & KLUZA, J. 2020. Mitochondrial spare respiratory capacity: Mechanisms, regulation, and significance in non-transformed and cancer cells. *FASEB J*, 34, 13106-13124.
- MARTINEZ-REYES, I. & CHANDEL, N. S. 2020. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun*, 11, 102.
- MARTINEZ, F. O. & GORDON, S. 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*, 6, 13.

- MARTINEZ, F. O., HELMING, L. & GORDON, S. 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol*, 27, 451-83.
- MARTINEZ, F. O., HELMING, L., MILDE, R., VARIN, A., MELGERT, B. N., DRAIJER, C., THOMAS, B., FABBRI, M., CRAWSHAW, A., HO, L. P., TEN HACKEN, N. H., COBOS JIMENEZ, V., KOOTSTRA, N. A., HAMANN, J., GREAVES, D. R., LOCATI, M., MANTOVANI, A. & GORDON, S. 2013. Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood*, 121, e57-69.
- MARYANOVICH, M., OBERKOVITZ, G., NIV, H., VOROBIYOV, L., ZALTSMAN, Y., BRENNER, O., LAPIDOT, T., JUNG, S. & GROSS, A. 2012. The ATM-BID pathway regulates quiescence and survival of haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol*, 14, 535-41.
- MATSUI, H., SOPKO, N. A., HANNAN, J. L., REINHARDT, A. A., KATES, M., YOSHIDA, T., LIU, X., CASTIGLIONE, F., HEDLUND, P., WEYNE, E., ALBERSEN, M. & BIVALACQUA, T. J. 2017. M1 Macrophages Are Predominantly Recruited to the Major Pelvic Ganglion of the Rat Following Cavernous Nerve Injury. *J Sex Med*, 14, 187-195.
- MCCORMICK, S. M. & HELLER, N. M. 2015. Commentary: IL-4 and IL-13 receptors and signaling. *Cytokine*, 75, 38-50.
- MCGREW, L. L., OTTE, A. P. & MOON, R. T. 1992. Analysis of Xwnt-4 in embryos of *Xenopus laevis*: a Wnt family member expressed in the brain and floor plate. *Development*, 115, 463-73.
- MEIJER, A. J. & CODOGNO, P. 2004. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 2445-62.
- MEJIA-RAMIREZ, E. & FLORIAN, M. C. 2020. Understanding intrinsic hematopoietic stem cell aging. *Haematologica*, 105, 22-37.
- MENDEZ-FERRER, S., BATTISTA, M. & FRENETTE, P. S. 2010a. Cooperation of beta(2)- and beta(3)-adrenergic receptors in hematopoietic progenitor cell mobilization. *Ann N Y Acad Sci*, 1192, 139-44.
- MENDEZ-FERRER, S., MICHURINA, T. V., FERRARO, F., MAZLOOM, A. R., MACARTHUR, B. D., LIRA, S. A., SCADDEN, D. T., MA'AYAN, A., ENIKOLOPOV, G. N. & FRENETTE, P. S. 2010b. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, 466, 829-34.
- MERAD, M., MANZ, M. G., KARSUNKY, H., WAGERS, A., PETERS, W., CHARO, I., WEISSMAN, I. L., CYSTER, J. G. & ENGLEMAN, E. G. 2002. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol*, 3, 1135-41.
- MIKELS, A. J. & NUSSE, R. 2006a. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol*, 4, e115.
- MIKELS, A. J. & NUSSE, R. 2006b. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene*, 25, 7461-8.
- MIKHALKEVICH, N., BECKNELL, B., CALIGIURI, M. A., BATES, M. D., HARVEY, R. & ZHENG, W. P. 2006. Responsiveness of naive CD4 T cells to polarizing cytokine determines the ratio of Th1 and Th2 cell differentiation. *J Immunol*, 176, 1553-60.
- MIKKOLA, H. K. & ORKIN, S. H. 2006. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development*, 133, 3733-44.

- MILLS, C. D., KINCAID, K., ALT, J. M., HEILMAN, M. J. & HILL, A. M. 2000. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*, 164, 6166-73.
- MILLS, E. L., KELLY, B., LOGAN, A., COSTA, A. S. H., VARMA, M., BRYANT, C. E., TOURLOMOUSIS, P., DABRITZ, J. H. M., GOTTLIEB, E., LATORRE, I., CORR, S. C., MCMANUS, G., RYAN, D., JACOBS, H. T., SZIBOR, M., XAVIER, R. J., BRAUN, T., FREZZA, C., MURPHY, M. P. & O'NEILL, L. A. 2016. Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell*, 167, 457-470 e13.
- MILLS, K. M., SZCZERKOWSKI, J. L. A. & HABIB, S. J. 2017. Wnt ligand presentation and reception: from the stem cell niche to tissue engineering. *Open Biol*, 7.
- MIN, B. K., PARK, S., KANG, H. J., KIM, D. W., HAM, H. J., HA, C. M., CHOI, B. J., LEE, J. Y., OH, C. J., YOO, E. K., KIM, H. E., KIM, B. G., JEON, J. H., HYEON, D. Y., HWANG, D., KIM, Y. H., LEE, C. H., LEE, T., KIM, J. W., CHOI, Y. K., PARK, K. G., CHAWLA, A., LEE, J., HARRIS, R. A. & LEE, I. K. 2019. Pyruvate Dehydrogenase Kinase Is a Metabolic Checkpoint for Polarization of Macrophages to the M1 Phenotype. *Front Immunol*, 10, 944.
- MIRANTES, C., PASSEGUE, E. & PIETRAS, E. M. 2014. Pro-inflammatory cytokines: emerging players regulating HSC function in normal and diseased hematopoiesis. *Exp Cell Res*, 329, 248-54.
- MISHARIN, A. V., MORALES-NEBREDA, L., MUTLU, G. M., BUDINGER, G. R. & PERLMAN, H. 2013. Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 49, 503-10.
- MITRASINOVIC, O. M., VINCENT, V. A., SIMSEK, D. & MURPHY, G. M., JR. 2003. Macrophage colony stimulating factor promotes phagocytosis by murine microglia. *Neurosci Lett*, 344, 185-8.
- MITTRA, B., CORTEZ, M., HAYDOCK, A., RAMASAMY, G., MYLER, P. J. & ANDREWS, N. W. 2013. Iron uptake controls the generation of Leishmania infective forms through regulation of ROS levels. *J Exp Med*, 210, 401-16.
- MONTFORT, A., COLACIOS, C., LEVADE, T., ANDRIEU-ABADIE, N., MEYER, N. & SEGUI, B. 2019. The TNF Paradox in Cancer Progression and Immunotherapy. *Front Immunol*, 10, 1818.
- MORRISON, S. J. & SCADDEN, D. T. 2014. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*, 505, 327-34.
- MORRISON, S. J., WANDYDZ, A. M., HEMMATI, H. D., WRIGHT, D. E. & WEISSMAN, I. L. 1997. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development*, 124, 1929-39.
- MORRISON, S. J. & WEISSMAN, I. L. 1994. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*, 1, 661-73.
- MORTENSEN, M., SOILLEUX, E. J., DJORDJEVIC, G., TRIPP, R., LUTTEROPP, M., SADIGHI-AKHA, E., STRANKS, A. J., GLANVILLE, J., KNIGHT, S., JACOBSEN, S. E., KRANC, K. R. & SIMON, A. K. 2011a. The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *J Exp Med*, 208, 455-67.
- MORTENSEN, M., WATSON, A. S. & SIMON, A. K. 2011b. Lack of autophagy in the hematopoietic system leads to loss of hematopoietic stem cell function and dysregulated myeloid proliferation. *Autophagy*, 7, 1069-70.

- MOSMANN, T. R. & COFFMAN, R. L. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 7, 145-73.
- MOSSADEGH-KELLER, N., SARRAZIN, S., KANDALLA, P. K., ESPINOSA, L., STANLEY, E. R., NUTT, S. L., MOORE, J. & SIEWEKE, M. H. 2013. M-CSF instructs myeloid lineage fate in single haematopoietic stem cells. *Nature*, 497, 239-43.
- MOSSER, D. M. & EDWARDS, J. P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 8, 958-69.
- MULDER, R., BANETE, A. & BASTA, S. 2014. Spleen-derived macrophages are readily polarized into classically activated (M1) or alternatively activated (M2) states. *Immunobiology*, 219, 737-45.
- MULLER, E., CHRISTOPOULOS, P. F., HALDER, S., LUNDE, A., BERAKI, K., SPETH, M., OYNEBRATEN, I. & CORTHAY, A. 2017. Toll-Like Receptor Ligands and Interferon-gamma Synergize for Induction of Antitumor M1 Macrophages. *Front Immunol*, 8, 1383.
- MULROY, T., MCMAHON, J. A., BURAKOFF, S. J., MCMAHON, A. P. & SEN, J. 2002. Wnt-1 and Wnt-4 regulate thymic cellularity. *Eur J Immunol*, 32, 967-71.
- MUN, S. H., PARK, P. S. U. & PARK-MIN, K. H. 2020. The M-CSF receptor in osteoclasts and beyond. *Exp Mol Med*, 52, 1239-1254.
- MUNGYER, G., POELS, L. G., JERUSALEM, C. & JERUSALEM, R. 1983. Plasmodium berghei: influence on granulopoiesis and macrophage production in BALB/c mice. *Exp Parasitol*, 56, 266-76.
- MURAILLE, E., LEO, O. & MOSER, M. 2014. TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? *Front Immunol*, 5, 603.
- MURPHY, K. M., OUYANG, W., FARRAR, J. D., YANG, J., RANGANATH, S., ASNAGLI, H., AFKARIAN, M. & MURPHY, T. L. 2000. Signaling and transcription in T helper development. *Annu Rev Immunol*, 18, 451-94.
- MURRAY, P. J. 2007. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol*, 178, 2623-9.
- MURRAY, P. J. 2017. Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol*, 79, 541-566.
- MURRAY, R. Z., KAY, J. G., SANGERMANN, D. G. & STOW, J. L. 2005. A role for the phagosome in cytokine secretion. *Science*, 310, 1492-5.
- MUXEL, S. M., AOKI, J. I., FERNANDES, J. C. R., LARANJEIRA-SILVA, M. F., ZAMPIERI, R. A., ACUNA, S. M., MULLER, K. E., VANDERLINDE, R. H. & FLOETER-WINTER, L. M. 2017. Arginine and Polyamines Fate in Leishmania Infection. *Front Microbiol*, 8, 2682.
- MYERS, K. V., AMEND, S. R. & PIENTA, K. J. 2019. Targeting Tyro3, Axl and MerTK (TAM receptors): implications for macrophages in the tumor microenvironment. *Mol Cancer*, 18, 94.
- NAGAI, Y., GARRETT, K. P., OHTA, S., BAHRUN, U., KOURO, T., AKIRA, S., TAKATSU, K. & KINCADE, P. W. 2006. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity*, 24, 801-12.
- NAHRENDORF, M. & SWIRSKI, F. K. 2013. Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. *Circ Res*, 112, 1624-33.

- NAITO, A. T., SHIOJIMA, I., AKAZAWA, H., HIDAKA, K., MORISAKI, T., KIKUCHI, A. & KOMURO, I. 2006. Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 19812-7.
- NAKA, K. & HIRAO, A. 2017. Regulation of Hematopoiesis and Hematological Disease by TGF-beta Family Signaling Molecules. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9.
- NAKADA, D., SAUNDERS, T. L. & MORRISON, S. J. 2010. Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. *Nature*, 468, 653-8.
- NAMGALADZE, D. & BRUNE, B. 2016. Macrophage fatty acid oxidation and its roles in macrophage polarization and fatty acid-induced inflammation. *Biochim Biophys Acta*, 1861, 1796-1807.
- NASKAR, D., MAITI, G., CHAKRABORTY, A., ROY, A., CHATTOPADHYAY, D. & SEN, M. 2014. Wnt5a-Rac1-NF-kappaB homeostatic circuitry sustains innate immune functions in macrophages. *J Immunol*, 192, 4386-97.
- NAVEIRAS, O., NARDI, V., WENZEL, P. L., HAUSCHKA, P. V., FAHEY, F. & DALEY, G. Q. 2009. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*, 460, 259-63.
- NEMETH, M. J., TOPOL, L., ANDERSON, S. M., YANG, Y. & BODINE, D. M. 2007. Wnt5a inhibits canonical Wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 15436-41.
- NEUMANN, J., SCHAAL, K., FARHAT, K., ENDERMANN, T., ULMER, A. J., EHLERS, S. & REILING, N. 2010. Frizzled1 is a marker of inflammatory macrophages, and its ligand Wnt3a is involved in reprogramming Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages. *FASEB J*, 24, 4599-612.
- NEWMAN, A. C. & HUGHES, C. C. 2012. Macrophages and angiogenesis: a role for Wnt signaling. *Vasc Cell*, 4, 13.
- NG, A. P. & ALEXANDER, W. S. 2017. Haematopoietic stem cells: past, present and future. *Cell Death Discov*, 3, 17002.
- NGUYEN-MCCARTY, M. & KLEIN, P. S. 2017. Autophagy is a signature of a signaling network that maintains hematopoietic stem cells. *PLoS One*, 12, e0177054.
- NGUYEN, H. M., MEJIA, E. M., CHANG, W., WANG, Y., WATSON, E., ON, N., MILLER, D. W. & HATCH, G. M. 2016. Reduction in cardiolipin decreases mitochondrial spare respiratory capacity and increases glucose transport into and across human brain cerebral microvascular endothelial cells. *J Neurochem*, 139, 68-80.
- NIEMANN, A., BALTES, J. & ELSASSER, H. P. 2001. Fluorescence properties and staining behavior of monodansylpentane, a structural homologue of the lysosomotropic agent monodansylcadaverine. *J Histochem Cytochem*, 49, 177-85.
- NIEMANN, A., TAKATSUKI, A. & ELSASSER, H. P. 2000. The lysosomotropic agent monodansylcadaverine also acts as a solvent polarity probe. *J Histochem Cytochem*, 48, 251-8.
- NILSSON, S. K., JOHNSTON, H. M. & COVERDALE, J. A. 2001. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood*, 97, 2293-9.

- NILSSON, S. K., JOHNSTON, H. M., WHITTY, G. A., WILLIAMS, B., WEBB, R. J., DENHARDT, D. T., BERTONCELLO, I., BENDALL, L. J., SIMMONS, P. J. & HAYLOCK, D. N. 2005. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 106, 1232-9.
- NOBUAKI SATO, N. T., KOJI SUDA, MIDORI NAKAMURA, MARIKO YAMAKI, TADASHI NINOMIYA, YASUHIRO KOBAYASHI, HARUHIKO TAKADA, KENICHIRO SHIBATA, MASAHIRO YAMAMOTO, KIYOSHI TAKEDA, SHIZUO AKIRA, TOSHIHIDE NOGUCHI, AND NOBUYUKI UDAGAWA 2004. MyD88 But Not TRIF Is Essential for Osteoclastogenesis Induced by Lipopolysaccharide, Diacyl Lipopeptide, and IL-1 $\alpha$ . *The Journal of Experimental Medicine*.
- NOMBELA-ARRIETA, C., PIVARNIK, G., WINKEL, B., CANTY, K. J., HARLEY, B., MAHONEY, J. E., PARK, S. Y., LU, J., PROTOPOPOV, A. & SILBERSTEIN, L. E. 2013. Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat Cell Biol*, 15, 533-43.
- NOMURA, M., LIU, J., ROVIRA, II, GONZALEZ-HURTADO, E., LEE, J., WOLFGANG, M. J. & FINKEL, T. 2016. Fatty acid oxidation in macrophage polarization. *Nat Immunol*, 17, 216-7.
- NOPPE, G., DEKKER, P., DE KONING-TREURNIET, C., BLOM, J., VAN HEEMST, D., DIRKS, R. W., TANKE, H. J., WESTENDORP, R. G. & MAIER, A. B. 2009. Rapid flow cytometric method for measuring senescence associated beta-galactosidase activity in human fibroblasts. *Cytometry A*, 75, 910-6.
- NUSSE, R. 2003. Wnts and Hedgehogs: lipid-modified proteins and similarities in signaling mechanisms at the cell surface. *Development*, 130, 5297-305.
- NUSSE, R. & VARMUS, H. 2012. Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. *EMBO J*, 31, 2670-84.
- NUSSE, R. & VARMUS, H. E. 1982. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 31, 99-109.
- O'GRADY, N. P., TROPEA, M., PREAS, H. L., 2ND, REDA, D., VANDIVIER, R. W., BANKS, S. M. & SUFFREDINI, A. F. 1999. Detection of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  during experimental endotoxemia and human sepsis. *J Infect Dis*, 179, 136-41.
- O'NEILL, L. A., KISHTON, R. J. & RATHMELL, J. 2016. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol*, 16, 553-65.
- O'SHEA, J. J. & MURRAY, P. J. 2008. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity*, 28, 477-87.
- ODA, A., TEZUKA, T., UENO, Y., HOSODA, S., AMEMIYA, Y., NOTSU, C., KASAHARA, T., NISHIYAMA, C. & GOITSUKA, R. 2018. Niche-induced extramedullary hematopoiesis in the spleen is regulated by the transcription factor Tlx1. *Sci Rep*, 8, 8308.
- ODEGAARD, J. I. & CHAWLA, A. 2011. Alternative macrophage activation and metabolism. *Annu Rev Pathol*, 6, 275-97.
- ODEGAARD, J. I., RICARDO-GONZALEZ, R. R., GOFORTH, M. H., MOREL, C. R., SUBRAMANIAN, V., MUKUNDAN, L., RED EAGLE, A., VATS, D., BROMBACHER, F., FERRANTE, A. W. & CHAWLA, A. 2007. Macrophage-specific PPAR $\gamma$  controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*, 447, 1116-20.

- OELSCHLAEGEL, D., WEISS SADAN, T., SALPETER, S., KRUG, S., BLUM, G., SCHMITZ, W., SCHULZE, A. & MICHL, P. 2020. Cathepsin Inhibition Modulates Metabolism and Polarization of Tumor-Associated Macrophages. *Cancers (Basel)*, 12.
- OGILVY, S., ELEFANTY, A. G., VISVADER, J., BATH, M. L., HARRIS, A. W. & ADAMS, J. M. 1998. Transcriptional regulation of *vav*, a gene expressed throughout the hematopoietic compartment. *Blood*, 91, 419-30.
- OGURO, H., DING, L. & MORRISON, S. J. 2013. SLAM family markers resolve functionally distinct subpopulations of hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. *Cell Stem Cell*, 13, 102-16.
- OSAWA, M., HANADA, K., HAMADA, H. & NAKAUCHI, H. 1996. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*, 273, 242-5.
- OTERO, K., TURNBULL, I. R., POLIANI, P. L., VERMI, W., CERUTTI, E., AOSHI, T., TASSI, I., TAKAI, T., STANLEY, S. L., MILLER, M., SHAW, A. S. & COLONNA, M. 2009. Macrophage colony-stimulating factor induces the proliferation and survival of macrophages via a pathway involving DAP12 and beta-catenin. *Nat Immunol*, 10, 734-43.
- OTTOLENGHI, C., PELOSI, E., TRAN, J., COLOMBINO, M., DOUGLASS, E., NEDOREZOV, T., CAO, A., FORABOSCO, A. & SCHLESSINGER, D. 2007. Loss of *Wnt4* and *Foxl2* leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Hum Mol Genet*, 16, 2795-804.
- OUIMET, M., FRANKLIN, V., MAK, E., LIAO, X., TABAS, I. & MARCEL, Y. L. 2011. Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. *Cell Metab*, 13, 655-67.
- OZAKI, K. I., AWAZU, M., TAMIYA, M., IWASAKI, Y., HARADA, A., KUGISAKI, S., TANIMURA, S. & KOHNO, M. 2016. Targeting the ERK signaling pathway as a potential treatment for insulin resistance and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 310, E643-E651.
- PAGAN, J. K., WYLIE, F. G., JOSEPH, S., WIDBERG, C., BRYANT, N. J., JAMES, D. E. & STOW, J. L. 2003. The t-SNARE syntaxin 4 is regulated during macrophage activation to function in membrane traffic and cytokine secretion. *Curr Biol*, 13, 156-60.
- PALAPARTI, A., BARATZ, A. & STIFANI, S. 1997. The Groucho/transducin-like enhancer of split transcriptional repressors interact with the genetically defined amino-terminal silencing domain of histone H3. *J Biol Chem*, 272, 26604-10.
- PALFRAMAN, R. T., JUNG, S., CHENG, G., WENINGER, W., LUO, Y., DORF, M., LITTMAN, D. R., ROLLINS, B. J., ZWEERINK, H., ROT, A. & VON ANDRIAN, U. H. 2001. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med*, 194, 1361-73.
- PALIS, J. & YODER, M. C. 2001. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp Hematol*, 29, 927-36.
- PALMA, A., JARRAH, A. S., TIERI, P., CESARENI, G. & CASTIGLIONE, F. 2018. Gene Regulatory Network Modeling of Macrophage Differentiation Corroborates the Continuum Hypothesis of Polarization States. *Front Physiol*, 9, 1659.
- PALMIERI, E. M., GONZALEZ-COTTO, M., BASELER, W. A., DAVIES, L. C., GHESQUIERE, B., MAIO, N., RICE, C. M., ROUAULT, T. A., CASSEL, T., HIGASHI, R. M., LANE, A. N., FAN, T. W., WINK, D. A. & MCVICAR, D. W. 2020. Nitric oxide orchestrates metabolic rewiring in M1 macrophages by targeting aconitase 2 and pyruvate dehydrogenase. *Nat Commun*, 11, 698.

- PALSSON-MCDERMOTT, E. M., CURTIS, A. M., GOEL, G., LAUTERBACH, M. A., SHEEDY, F. J., GLEESON, L. E., VAN DEN BOSCH, M. W., QUINN, S. R., DOMINGO-FERNANDEZ, R., JOHNSTON, D. G., JIANG, J. K., ISRAELSEN, W. J., KEANE, J., THOMAS, C., CLISH, C., VANDER HEIDEN, M., XAVIER, R. J. & O'NEILL, L. A. 2015. Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1alpha activity and IL-1beta induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages. *Cell Metab*, 21, 65-80.
- PALUDAN, C., SCHMID, D., LANDTHALER, M., VOCKERODT, M., KUBE, D., TUSCHL, T. & MUNZ, C. 2005. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science*, 307, 593-6.
- PAN, M. G., XIONG, Y. & CHEN, F. 2013. NFAT gene family in inflammation and cancer. *Curr Mol Med*, 13, 543-54.
- PANAKOVA, D., SPRONG, H., MAROIS, E., THIELE, C. & EATON, S. 2005. Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature*, 435, 58-65.
- PAPA, S., CHOY, P. M. & BUBICI, C. 2019. The ERK and JNK pathways in the regulation of metabolic reprogramming. *Oncogene*, 38, 2223-2240.
- PARK, B. S. & LEE, J. O. 2013. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med*, 45, e66.
- PARKER, T. W. & NEUFELD, K. L. 2020. APC controls Wnt-induced beta-catenin destruction complex recruitment in human colonocytes. *Sci Rep*, 10, 2957.
- PARMAR, K., MAUCH, P., VERGILIO, J. A., SACKSTEIN, R. & DOWN, J. D. 2007. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 5431-6.
- PASCHOAL, V. A., AMANO, M. T., BELCHIOR, T., MAGDALON, J., CHIMIN, P., ANDRADE, M. L., ORTIZ-SILVA, M., CASTRO, E., YAMASHITA, A. S., ROSA NETO, J. C., CAMARA, N. O. & FESTUCCIA, W. T. 2017. mTORC1 inhibition with rapamycin exacerbates adipose tissue inflammation in obese mice and dissociates macrophage phenotype from function. *Immunobiology*, 222, 261-271.
- PASSEGUE, E., JAMIESON, C. H., AILLES, L. E. & WEISSMAN, I. L. 2003. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 Suppl 1, 11842-9.
- PEARCE, E. L. & PEARCE, E. J. 2013. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity*, 38, 633-43.
- PECHKOVSKY, D. V., PRASSE, A., KOLLERT, F., ENGEL, K. M., DENTLER, J., LUTTMANN, W., FRIEDRICH, K., MULLER-QUERNHEIM, J. & ZISSEL, G. 2010. Alternatively activated alveolar macrophages in pulmonary fibrosis-mediator production and intracellular signal transduction. *Clin Immunol*, 137, 89-101.
- PEREIRA, C., SCHAER, D. J., BACHLI, E. B., KURRER, M. O. & SCHOEDON, G. 2008. Wnt5A/CaMKII signaling contributes to the inflammatory response of macrophages and is a target for the antiinflammatory action of activated protein C and interleukin-10. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28, 504-10.
- PERRY, J. M., HE, X. C., SUGIMURA, R., GRINDLEY, J. C., HAUG, J. S., DING, S. & LI, L. 2011. Cooperation between both Wnt/pgk-catenin and PTEN/PI3K/Akt signaling promotes primitive hematopoietic stem cell self-renewal and expansion. *Genes Dev*, 25, 1928-42.



- PIEN, G. C., SATOSKAR, A. R., TAKEDA, K., AKIRA, S. & BIRON, C. A. 2000. Cutting edge: selective IL-18 requirements for induction of compartmental IFN-gamma responses during viral infection. *J Immunol*, 165, 4787-91.
- PIETRAS, E. M. 2017. Inflammation: a key regulator of hematopoietic stem cell fate in health and disease. *Blood*, 130, 1693-1698.
- PIETRAS, E. M., LAKSHMINARASIMHAN, R., TECHNER, J. M., FONG, S., FLACH, J., BINNEWIES, M. & PASSEGUE, E. 2014. Re-entry into quiescence protects hematopoietic stem cells from the killing effect of chronic exposure to type I interferons. *J Exp Med*, 211, 245-62.
- PIETRAS, E. M., MIRANTES-BARBEITO, C., FONG, S., LOEFFLER, D., KOVTONYUK, L. V., ZHANG, S., LAKSHMINARASIMHAN, R., CHIN, C. P., TECHNER, J. M., WILL, B., NERLOV, C., STEIDL, U., MANZ, M. G., SCHROEDER, T. & PASSEGUE, E. 2016. Chronic interleukin-1 exposure drives haematopoietic stem cells towards precocious myeloid differentiation at the expense of self-renewal. *Nat Cell Biol*, 18, 607-18.
- PINHAL-ENFIELD, G., RAMANATHAN, M., HASKO, G., VOGEL, S. N., SALZMAN, A. L., BOONS, G. J. & LEIBOVICH, S. J. 2003. An angiogenic switch in macrophages involving synergy between Toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A(2A) receptors. *Am J Pathol*, 163, 711-21.
- POLAT, I. H., TARRADO-CASTELLARNAU, M., BHARAT, R., PERARNAU, J., BENITO, A., CORTES, R., SABATIER, P. & CASCANTE, M. 2021. Oxidative Pentose Phosphate Pathway Enzyme 6-Phosphogluconate Dehydrogenase Plays a Key Role in Breast Cancer Metabolism. *Biology (Basel)*, 10.
- POPOVA, A., KZHYSHKOWSKA, J., NURGAZIEVA, D., GOERDT, S. & GRATCHEV, A. 2011. Pro- and anti-inflammatory control of M-CSF-mediated macrophage differentiation. *Immunobiology*, 216, 164-72.
- PORCHERAY, F., VIAUD, S., RIMANIOL, A. C., LEONE, C., SAMAH, B., DEREUDDRE-BOSQUET, N., DORMONT, D. & GRAS, G. 2005. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol*, 142, 481-9.
- PORTER, S. N., CLUSTER, A. S., SIGNER, R. A. J., VOIGTMANN, J., MONLISH, D. A., SCHUETTPELZ, L. G. & MAGEE, J. A. 2016. Pten Cell Autonomously Modulates the Hematopoietic Stem Cell Response to Inflammatory Cytokines. *Stem Cell Reports*, 6, 806-814.
- POVINELLI, B. J. & NEMETH, M. J. 2014. Wnt5a regulates hematopoietic stem cell proliferation and repopulation through the Ryk receptor. *Stem Cells*, 32, 105-15.
- PRADEL, L. P., OOI, C. H., ROMAGNOLI, S., CANNARILE, M. A., SADE, H., RUTTINGER, D. & RIES, C. H. 2016. Macrophage Susceptibility to Emactuzumab (RG7155) Treatment. *Mol Cancer Ther*, 15, 3077-3086.
- QIAN, H., BUZA-VIDAS, N., HYLAND, C. D., JENSEN, C. T., ANTONCHUK, J., MANSSON, R., THOREN, L. A., EKBLUM, M., ALEXANDER, W. S. & JACOBSEN, S. E. 2007. Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 1, 671-84.
- QIAO, L., ZOU, C., SHAO, P., SCHAACK, J., JOHNSON, P. F. & SHAO, J. 2008. Transcriptional regulation of fatty acid translocase/CD36 expression by CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem*, 283, 8788-95.

- QIU, S. Q., WAAIJER, S. J. H., ZWAGER, M. C., DE VRIES, E. G. E., VAN DER VEGT, B. & SCHRODER, C. P. 2018. Tumor-associated macrophages in breast cancer: Innocent bystander or important player? *Cancer Treat Rev*, 70, 178-189.
- RABINOWITZ, M. H. 2013. Inhibition of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase domain oxygen sensors: tricking the body into mounting orchestrated survival and repair responses. *J Med Chem*, 56, 9369-402.
- RAES, G., BRYNS, L., DAHAL, B. K., BRANDT, J., GROOTEN, J., BROMBACHER, F., VANHAM, G., NOEL, W., BOGAERT, P., BOONEFAES, T., KINDT, A., VAN DEN BERGH, R., LEENEN, P. J., DE BAETSELIER, P. & GHASSABEH, G. H. 2005. Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol*, 77, 321-7.
- RAO, D. M., SHACKLEFORD, M. T., BORDEAUX, E. K., SOTTNIK, J. L., FERGUSON, R. L., YAMAMOTO, T. M., WELLBERG, E. A., BITLER, B. G. & SIKORA, M. J. 2019. Wnt family member 4 (WNT4) and WNT3A activate cell-autonomous Wnt signaling independent of porcupine O-acyltransferase or Wnt secretion. *J Biol Chem*, 294, 19950-19966.
- RAPOVY, S. M., ZHAO, J., BRICKER, R. L., SCHMIDT, S. M., SETCHELL, K. D. & QUALLS, J. E. 2015. Differential Requirements for L-Citrulline and L-Arginine during Antimycobacterial Macrophage Activity. *J Immunol*, 195, 3293-300.
- RATAJCZAK-WRONA, W., JABLONSKA, E., GARLEY, M., JABLONSKI, J., RADZIOW, P. & IWANIUK, A. 2013. The role of MAP kinases in the induction of iNOS expression in neutrophils exposed to NDMA: the involvement transcription factors. *Adv Med Sci*, 58, 265-73.
- RATAJCZAK, M. Z. 2008. Phenotypic and functional characterization of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol*, 15, 293-300.
- RAWLINGS, J. S., ROSLER, K. M. & HARRISON, D. A. 2004. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci*, 117, 1281-3.
- REDDY, S. M., HSIAO, K. H., ABERNETHY, V. E., FAN, H., LONGACRE, A., LIEBERTHAL, W., RAUCH, J., KOH, J. S. & LEVINE, J. S. 2002. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages induces novel signaling events leading to cytokine-independent survival and inhibition of proliferation: activation of Akt and inhibition of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J Immunol*, 169, 702-13.
- REMMERIE, A. & SCOTT, C. L. 2018. Macrophages and lipid metabolism. *Cell Immunol*, 330, 27-42.
- REVUELTA, M. & MATHEU, A. 2017. Autophagy in stem cell aging. *Aging Cell*, 16, 912-915.
- RICHTER, J., TRAVER, D. & WILLERT, K. 2017. The role of Wnt signaling in hematopoietic stem cell development. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 52, 414-424.
- RING, L., NETH, P., WEBER, C., STEFFENS, S. & FAUSSNER, A. 2014. beta-Catenin-dependent pathway activation by both promiscuous "canonical" WNT3a-, and specific "noncanonical" WNT4- and WNT5a-FZD receptor combinations with strong differences in LRP5 and LRP6 dependency. *Cell Signal*, 26, 260-7.
- ROBEY, R. B. & HAY, N. 2009. Is Akt the "Warburg kinase"?-Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Semin Cancer Biol*, 19, 25-31.

- ROCA, H., VARSOS, Z. S., SUD, S., CRAIG, M. J., YING, C. & PIENTA, K. J. 2009. CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization. *J Biol Chem*, 284, 34342-54.
- RODRIGUEZ, S., CHORA, A., GOUMNEROV, B., MUMAW, C., GOEBEL, W. S., FERNANDEZ, L., BAYDOUN, H., HOGENESCH, H., DOMBKOWSKI, D. M., KARLEWICZ, C. A., RICE, S., RAHME, L. G. & CARLESSO, N. 2009. Dysfunctional expansion of hematopoietic stem cells and block of myeloid differentiation in lethal sepsis. *Blood*, 114, 4064-76.
- ROELINK, H., WAGENAAR, E., LOPES DA SILVA, S. & NUSSE, R. 1990. Wnt-3, a gene activated by proviral insertion in mouse mammary tumors, is homologous to int-1/Wnt-1 and is normally expressed in mouse embryos and adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 4519-23.
- ROSSI, D. J., BRYDER, D., ZAHN, J. M., AHLENIUS, H., SONU, R., WAGERS, A. J. & WEISSMAN, I. L. 2005. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 9194-9.
- ROSZER, T. 2015. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm*, 2015, 816460.
- RUBIO-NAVARRO, A., GUERRERO-HUE, M., MARTIN-FERNANDEZ, B., CORTEGANO, I., OLIVARES-ALVARO, E., DE LAS HERAS, N., ALIA, M., DE ANDRES, B., GASPAS, M. L., EGIDO, J. & MORENO, J. A. 2016. Phenotypic Characterization of Macrophages from Rat Kidney by Flow Cytometry. *J Vis Exp*.
- RUCKERL, D., JENKINS, S. J., LAQTOM, N. N., GALLAGHER, I. J., SUTHERLAND, T. E., DUNCAN, S., BUCK, A. H. & ALLEN, J. E. 2012. Induction of IL-4R $\alpha$ -dependent microRNAs identifies PI3K/Akt signaling as essential for IL-4-driven murine macrophage proliferation in vivo. *Blood*, 120, 2307-16.
- RUFFELL, B., AFFARA, N. I. & COUSSENS, L. M. 2012. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol*, 33, 119-26.
- SABHARWAL, S. S. & SCHUMACKER, P. T. 2014. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat Rev Cancer*, 14, 709-21.
- SACCHETTI, B., FUNARI, A., MICHIZENZI, S., DI CESARE, S., PIERSANTI, S., SAGGIO, I., TAGLIAFICO, E., FERRARI, S., ROBEY, P. G., RIMINUCCI, M. & BIANCO, P. 2007. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*, 131, 324-36.
- SADZAK, I., SCHIFF, M., GATTERMEIER, I., GLINITZER, R., SAUER, I., SAALMULLER, A., YANG, E., SCHALJO, B. & KOVARIK, P. 2008. Recruitment of Stat1 to chromatin is required for interferon-induced serine phosphorylation of Stat1 transactivation domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 8944-9.
- SAITO, T., KUMA, A., SUGIURA, Y., ICHIMURA, Y., OBATA, M., KITAMURA, H., OKUDA, S., LEE, H. C., IKEDA, K., KANEGAE, Y., SAITO, I., AUWERX, J., MOTOHASHI, H., SUEMATSU, M., SOGA, T., YOKOMIZO, T., WAGURI, S., MIZUSHIMA, N. & KOMATSU, M. 2019. Autophagy regulates lipid metabolism through selective turnover of NCoR1. *Nat Commun*, 10, 1567.
- SALIM, T., SERSHEN, C. L. & MAY, E. E. 2016. Investigating the Role of TNF-alpha and IFN-gamma Activation on the Dynamics of iNOS Gene Expression in LPS Stimulated Macrophages. *PLoS One*, 11, e0153289.

- SAMIMI, A., KALANTARI, H., LORESTANI, M. Z., SHIRZAD, R. & SAKI, N. 2018. Oxidative stress in normal hematopoietic stem cells and leukemia. *APMIS*, 126, 284-294.
- SANSOM, D. M. 2000. CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology*, 101, 169-77.
- SANTONI, M., BRACARDA, S., NABISSI, M., MASSARI, F., CONTI, A., BRIA, E., TORTORA, G., SANTONI, G. & CASCINU, S. 2014. CXC and CC chemokines as angiogenic modulators in nonhaematological tumors. *Biomed Res Int*, 2014, 768758.
- SARBASSOV, D. D., ALI, S. M., KIM, D. H., GUERTIN, D. A., LATEK, R. R., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P. & SABATINI, D. M. 2004. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*, 14, 1296-302.
- SARKAR, S., KOROLCHUK, V. I., RENNA, M., IMARISIO, S., FLEMING, A., WILLIAMS, A., GARCIA-ARENCEBIA, M., ROSE, C., LUO, S., UNDERWOOD, B. R., KROEMER, G., O'KANE, C. J. & RUBINSZTEIN, D. C. 2011. Complex inhibitory effects of nitric oxide on autophagy. *Mol Cell*, 43, 19-32.
- SARRAZIN, S., MOSSADEGH-KELLER, N., FUKAO, T., AZIZ, A., MOURCIN, F., VANHILLE, L., KELLY MODIS, L., KASTNER, P., CHAN, S., DUPREZ, E., OTTO, C. & SIEWEKE, M. H. 2009. MafB restricts M-CSF-dependent myeloid commitment divisions of hematopoietic stem cells. *Cell*, 138, 300-13.
- SATOH, T., TAKEUCHI, O., VANDENBON, A., YASUDA, K., TANAKA, Y., KUMAGAI, Y., MIYAKE, T., MATSUSHITA, K., OKAZAKI, T., SAITOH, T., HONMA, K., MATSUYAMA, T., YUI, K., TSUJIMURA, T., STANDLEY, D. M., NAKANISHI, K., NAKAI, K. & AKIRA, S. 2010. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat Immunol*, 11, 936-44.
- SAUVAGEAU, G., ISCOVE, N. N. & HUMPHRIES, R. K. 2004. In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Oncogene*, 23, 7223-32.
- SCHAALE, K., NEUMANN, J., SCHNEIDER, D., EHLERS, S. & REILING, N. 2011. Wnt signaling in macrophages: augmenting and inhibiting mycobacteria-induced inflammatory responses. *Eur J Cell Biol*, 90, 553-9.
- SCHLAME, M. 2008. Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes. *J Lipid Res*, 49, 1607-20.
- SCHMALSTIEG, F. C., JR. & GOLDMAN, A. S. 2008. Ilya Ilich Metchnikoff (1845-1915) and Paul Ehrlich (1854-1915): the centennial of the 1908 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *J Med Biogr*, 16, 96-103.
- SCHMID, D., PYPAERT, M. & MUNZ, C. 2007. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity*, 26, 79-92.
- SCHNEIDER, C., NOBS, S. P., KURRER, M., REHRAUER, H., THIELE, C. & KOPF, M. 2014. Induction of the nuclear receptor PPAR-gamma by the cytokine GM-CSF is critical for the differentiation of fetal monocytes into alveolar macrophages. *Nat Immunol*, 15, 1026-37.
- SCHNITZLER, C. M. & MESQUITA, J. 1998. Bone marrow composition and bone microarchitecture and turnover in blacks and whites. *J Bone Miner Res*, 13, 1300-7.
- SCHOFIELD, R. 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 4, 7-25.

- SCHOHL, A. & FAGOTTO, F. 2003. A role for maternal beta-catenin in early mesoderm induction in *Xenopus*. *EMBO J*, 22, 3303-13.
- SCHRECK, C., ISTVANFFY, R., ZIEGENHAIN, C., SIPPENAUER, T., RUF, F., HENKEL, L., GARTNER, F., VIETH, B., FLORIAN, M. C., MENDE, N., TAUBENBERGER, A., PRENDERGAST, A., WAGNER, A., PAGEL, C., GRZIWOK, S., GOTZE, K. S., GUCK, J., DEAN, D. C., MASSBERG, S., ESSERS, M., WASKOW, C., GEIGER, H., SCHIEMANN, M., PESCHEL, C., ENARD, W. & OOSTENDORP, R. A. 2017. Niche WNT5A regulates the actin cytoskeleton during regeneration of hematopoietic stem cells. *J Exp Med*, 214, 165-181.
- SCHULZ, C., GOMEZ PERDIGUERO, E., CHORRO, L., SZABO-ROGERS, H., CAGNARD, N., KIERDORF, K., PRINZ, M., WU, B., JACOBSEN, S. E., POLLARD, J. W., FRAMPTON, J., LIU, K. J. & GEISSMANN, F. 2012. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*, 336, 86-90.
- SEIF, F., KHOSHMIRSAFA, M., AAZAMI, H., MOHSENZADEGAN, M., SEDIGHI, G. & BAHAR, M. 2017. The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Commun Signal*, 15, 23.
- SEITA, J. & WEISSMAN, I. L. 2010. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2, 640-53.
- SELAKE, M. A., ARMOUR, S. M., MACKENZIE, E. D., BOULAHBEL, H., WATSON, D. G., MANSFIELD, K. D., PAN, Y., SIMON, M. C., THOMPSON, C. B. & GOTTLIEB, E. 2005. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*, 7, 77-85.
- SEMENOV, M., TAMAI, K. & HE, X. 2005. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem*, 280, 26770-5.
- SEMENOV, M. V., TAMAI, K., BROTT, B. K., KUHL, M., SOKOL, S. & HE, X. 2001. Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol*, 11, 951-61.
- SEMERAD, C. L., CHRISTOPHER, M. J., LIU, F., SHORT, B., SIMMONS, P. J., WINKLER, I., LEVESQUE, J. P., CHAPPEL, J., ROSS, F. P. & LINK, D. C. 2005. G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood*, 106, 3020-7.
- SERBINA, N. V., JIA, T., HOHL, T. M. & PAMER, E. G. 2008. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol*, 26, 421-52.
- SHAN, J., JOKELA, T., PELTOKETO, H. & VAINIO, S. 2009. Generation of an allele to inactivate Wnt4 gene function conditionally in the mouse. *Genesis*, 47, 782-8.
- SHAN, T., CHEN, S., CHEN, X., WU, T., YANG, Y., LI, S., MA, J., ZHAO, J., LIN, W., LI, W., CUI, X. & KANG, Y. 2020. M2TAM subsets altered by lactic acid promote Tcell apoptosis through the PDL1/PD1 pathway. *Oncol Rep*, 44, 1885-1894.
- SHAO, L., LI, H., PAZHANISAMY, S. K., MENG, A., WANG, Y. & ZHOU, D. 2011. Reactive oxygen species and hematopoietic stem cell senescence. *Int J Hematol*, 94, 24-32.
- SHAO, N., LU, Z., ZHANG, Y., WANG, M., LI, W., HU, Z., WANG, S. & LIN, Y. 2015. Interleukin-8 upregulates integrin beta3 expression and promotes estrogen receptor-negative breast cancer cell invasion by activating the PI3K/Akt/NF-kappaB pathway. *Cancer Lett*, 364, 165-72.

- SHAO, W. H., KUAN, A. P., WANG, C., ABRAHAM, V., WALDMAN, M. A., VOGELGESANG, A., WITTENBURG, G., CHOUDHURY, A., TSAO, P. Y., MIWA, T., EISENBERG, R. A. & COHEN, P. L. 2010. Disrupted Mer receptor tyrosine kinase expression leads to enhanced MZ B-cell responses. *J Autoimmun*, 35, 368-74.
- SHARMA, R. P. & CHOPRA, V. L. 1976. Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*, 48, 461-5.
- SHI, J., HUA, L., HARMER, D., LI, P. & REN, G. 2018. Cre Driver Mice Targeting Macrophages. *Methods Mol Biol*, 1784, 263-275.
- SHI, L. & TU, B. P. 2015. Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences. *Curr Opin Cell Biol*, 33, 125-31.
- SHIBATA, Y., BERCLAZ, P. Y., CHRONEOS, Z. C., YOSHIDA, M., WHITSETT, J. A. & TRAPNELL, B. C. 2001. GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity*, 15, 557-67.
- SHIMSHEK, D. R., KIM, J., HUBNER, M. R., SPERGEL, D. J., BUCHHOLZ, F., CASANOVA, E., STEWART, A. F., SEEBURG, P. H. & SPRENGEL, R. 2002. Codon-improved Cre recombinase (iCre) expression in the mouse. *Genesis*, 32, 19-26.
- SHIRATORI, R., FURUICHI, K., YAMAGUCHI, M., MIYAZAKI, N., AOKI, H., CHIBANA, H., ITO, K. & AOKI, S. 2019. Glycolytic suppression dramatically changes the intracellular metabolic profile of multiple cancer cell lines in a mitochondrial metabolism-dependent manner. *Sci Rep*, 9, 18699.
- SI, Y., TSOU, C. L., CROFT, K. & CHARO, I. F. 2010. CCR2 mediates hematopoietic stem and progenitor cell trafficking to sites of inflammation in mice. *J Clin Invest*, 120, 1192-203.
- SILBERSTEIN, L., GONCALVES, K. A., KHARCHENKO, P. V., TURCOTTE, R., KFOURY, Y., MERCIER, F., BARYAWNO, N., SEVERE, N., BACHAND, J., SPENCER, J. A., PAPAZIAN, A., LEE, D., CHITTETI, B. R., SROUR, E. F., HOGGATT, J., TATE, T., LO CELSO, C., ONO, N., NUTT, S., HEINO, J., SIPILA, K., SHIODA, T., OSAWA, M., LIN, C. P., HU, G. F. & SCADDEN, D. T. 2016. Proximity-Based Differential Single-Cell Analysis of the Niche to Identify Stem/Progenitor Cell Regulators. *Cell Stem Cell*, 19, 530-543.
- SIMSEK, T., KOCABAS, F., ZHENG, J., DEBERARDINIS, R. J., MAHMOUD, A. I., OLSON, E. N., SCHNEIDER, J. W., ZHANG, C. C. & SADEK, H. A. 2010. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell*, 7, 380-90.
- SINGER, A. J. & CLARK, R. A. 1999. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*, 341, 738-46.
- SINGH, R. & CUERVO, A. M. 2012. Lipophagy: connecting autophagy and lipid metabolism. *Int J Cell Biol*, 2012, 282041.
- SINGH, R. K., BARBOSA-LORENZI, V. C., LUND, F. W., GROSHEVA, I., MAXFIELD, F. R. & HAKA, A. S. 2016. Degradation of aggregated LDL occurs in complex extracellular sub-compartments of the lysosomal synapse. *J Cell Sci*, 129, 1072-82.
- SINGH, S., MEHTA, N., LILAN, J., BUDHTHOKI, M. B., CHAO, F. & YONG, L. 2017. Initiative action of tumor-associated macrophage during tumor metastasis. *Biochim Open*, 4, 8-18.
- SMITH, A. M., GIBBONS, H. M., OLDFIELD, R. L., BERGIN, P. M., MEE, E. W., CURTIS, M. A., FAULL, R. L. & DRAGUNOW, M. 2013. M-CSF increases proliferation and phagocytosis

- while modulating receptor and transcription factor expression in adult human microglia. *J Neuroinflammation*, 10, 85.
- SON, Y., CHEONG, Y. K., KIM, N. H., CHUNG, H. T., KANG, D. G. & PAE, H. O. 2011. Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *J Signal Transduct*, 2011, 792639.
- SON, Y., KIM, S., CHUNG, H. T. & PAE, H. O. 2013. Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases. *Methods Enzymol*, 528, 27-48.
- SPATH, G. F. & BEVERLEY, S. M. 2001. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Exp Parasitol*, 99, 97-103.
- SPELLBERG, B. & EDWARDS, J. E., JR. 2001. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis*, 32, 76-102.
- SPENCER, J. A., FERRARO, F., ROUSSAKIS, E., KLEIN, A., WU, J., RUNNELS, J. M., ZAHER, W., MORTENSEN, L. J., ALT, C., TURCOTTE, R., YUSUF, R., COTE, D., VINOGRADOV, S. A., SCADDEN, D. T. & LIN, C. P. 2014. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature*, 508, 269-73.
- STAAL, F. J., CHHATTA, A. & MIKKERS, H. 2016. Caught in a Wnt storm: Complexities of Wnt signaling in hematopoiesis. *Exp Hematol*, 44, 451-7.
- STAMOS, J. L. & WEIS, W. I. 2013. The beta-catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a007898.
- STANLEY, E., LIESCHKE, G. J., GRAIL, D., METCALF, D., HODGSON, G., GALL, J. A., MAHER, D. W., CEBON, J., SINICKAS, V. & DUNN, A. R. 1994. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 5592-6.
- STANLEY, E. R. & CHITU, V. 2014. CSF-1 receptor signaling in myeloid cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6.
- STANTON, R. C. 2012. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life*, 64, 362-9.
- STARK, G. R. 2007. How cells respond to interferons revisited: from early history to current complexity. *Cytokine Growth Factor Rev*, 18, 419-23.
- STEVEN, J. L. 1892. Metchnikoff on the Comparative Pathology of Inflammation. *Glasgow Med J*, 38, 195-205.
- STIER, S., KO, Y., FORKERT, R., LUTZ, C., NEUHAUS, T., GRUNEWALD, E., CHENG, T., DOMBKOWSKI, D., CALVI, L. M., RITTLING, S. R. & SCADDEN, D. T. 2005. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med*, 201, 1781-91.
- STOW, J. L. & MURRAY, R. Z. 2013. Intracellular trafficking and secretion of inflammatory cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev*, 24, 227-39.
- STRELKO, C. L., LU, W., DUFORT, F. J., SEYFRIED, T. N., CHILES, T. C., RABINOWITZ, J. D. & ROBERTS, M. F. 2011. Itaconic acid is a mammalian metabolite induced during macrophage activation. *J Am Chem Soc*, 133, 16386-9.
- STUEHR, D. J. 2004. Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. *J Nutr*, 134, 2748S-2751S; discussion 2765S-2767S.

- SU, Q., LUO, S., TAN, Q., DENG, J., ZHOU, S., PENG, M., TAO, T. & YANG, X. 2019. The role of pyruvate kinase M2 in anticancer therapeutic treatments. *Oncol Lett*, 18, 5663-5672.
- SU, X., YU, Y., ZHONG, Y., GIANNOPOULOU, E. G., HU, X., LIU, H., CROSS, J. R., RATSCH, G., RICE, C. M. & IVASHKIV, L. B. 2015. Interferon-gamma regulates cellular metabolism and mRNA translation to potentiate macrophage activation. *Nat Immunol*, 16, 838-849.
- SUDA, T., TAKUBO, K. & SEMENZA, G. L. 2011. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell*, 9, 298-310.
- SUGIMURA, R., HE, X. C., VENKATRAMAN, A., ARAI, F., BOX, A., SEMERAD, C., HAUG, J. S., PENG, L., ZHONG, X. B., SUDA, T. & LI, L. 2012. Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche. *Cell*, 150, 351-65.
- SUGIYAMA, T., KOHARA, H., NODA, M. & NAGASAWA, T. 2006. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*, 25, 977-88.
- SUN, L., HE, C., NAIR, L., YEUNG, J. & EGWUAGU, C. E. 2015. Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease. *Cytokine*, 75, 249-55.
- SUN, X. J., WANG, L. M., ZHANG, Y., YENUSH, L., MYERS, M. G., JR., GLASHEEN, E., LANE, W. S., PIERCE, J. H. & WHITE, M. F. 1995. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature*, 377, 173-7.
- SURENDRAN, K., MCCAUL, S. P. & SIMON, T. C. 2002. A role for Wnt-4 in renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 282, F431-41.
- SUZU, S., HIYOSHI, M., YOSHIDOMI, Y., HARADA, H., TAKEYA, M., KIMURA, F., MOTOYOSHI, K. & OKADA, S. 2007. M-CSF-mediated macrophage differentiation but not proliferation is correlated with increased and prolonged ERK activation. *J Cell Physiol*, 212, 519-25.
- SZABO, S. J., KIM, S. T., COSTA, G. L., ZHANG, X., FATHMAN, C. G. & GLIMCHER, L. H. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 100, 655-69.
- TAHA, R., HAMID, Q., CAMERON, L. & OLIVENSTEIN, R. 2003. T helper type 2 cytokine receptors and associated transcription factors GATA-3, c-MAF, and signal transducer and activator of transcription factor-6 in induced sputum of atopic asthmatic patients. *Chest*, 123, 2074-82.
- TAI, Y., WANG, Q., KORNER, H., ZHANG, L. & WEI, W. 2018. Molecular Mechanisms of T Cells Activation by Dendritic Cells in Autoimmune Diseases. *Front Pharmacol*, 9, 642.
- TAKEUCHI, O., HOSHINO, K., KAWAI, T., SANJO, H., TAKADA, H., OGAWA, T., TAKEDA, K. & AKIRA, S. 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 11, 443-51.
- TAKIZAWA, H., FRITSCH, K., KOVTONYUK, L. V., SAITO, Y., YAKKALA, C., JACOBS, K., AHUJA, A. K., LOPES, M., HAUSMANN, A., HARDT, W. D., GOMARIZ, A., NOMBELARRIETA, C. & MANZ, M. G. 2017. Pathogen-Induced TLR4-TRIF Innate Immune Signaling in Hematopoietic Stem Cells Promotes Proliferation but Reduces Competitive Fitness. *Cell Stem Cell*, 21, 225-240 e5.
- TAKIZAWA, H., REGOES, R. R., BODDUPALLI, C. S., BONHOEFFER, S. & MANZ, M. G. 2011. Dynamic variation in cycling of hematopoietic stem cells in steady state and inflammation. *J Exp Med*, 208, 273-84.



- TAKUBO, K., GODA, N., YAMADA, W., IRIUCHISHIMA, H., IKEDA, E., KUBOTA, Y., SHIMA, H., JOHNSON, R. S., HIRAO, A., SUEMATSU, M. & SUDA, T. 2010. Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 7, 391-402.
- TAMAI, K., SEMENOV, M., KATO, Y., SPOKONY, R., LIU, C., KATSUYAMA, Y., HESS, F., SAINT-JEANNET, J. P. & HE, X. 2000. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*, 407, 530-5.
- TAN, H. Y., WANG, N., LI, S., HONG, M., WANG, X. & FENG, Y. 2016. The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2795090.
- TAN S Y, M., JD AND DEE M K 1968. Elie Metchnikoff (1845-1916), advocate of phagocytosis. *JAMA*, 203, 139-41.
- TAN, S. H., SENARATH-YAPA, K., CHUNG, M. T., LONGAKER, M. T., WU, J. Y. & NUSSE, R. 2014. Wnts produced by Osterix-expressing osteolineage cells regulate their proliferation and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, E5262-71.
- TAN, S. Y. & DEE, M. K. 2009. Elie Metchnikoff (1845-1916): discoverer of phagocytosis. *Singapore Med J*, 50, 456-7.
- TANNAHILL GM, C. A., ADAMIK J, PALSSON-MCDERMOTT EM, MCGETTRICK AF, GOEL G, FREZZA C, BERNARD NJ, KELLY B, FOLEY NH, ZHENG L, GARDET A, TONG Z, JANY SS, CORR SC, HANEKLAUS M, CAFFREY BE, PIERCE K, WALMSLEY S, BEASLEY FC, CUMMINS E, NIZET V, WHYTE M, TAYLOR CT, LIN H, MASTERS SL, GOTTLIEB E, KELLY VP, CLISH C, AURON PE, XAVIER RJ, O'NEILL LA 2013. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . *Nature*, 496, 238-42.
- TANNAHILL, G. M., CURTIS, A. M., ADAMIK, J., PALSSON-MCDERMOTT, E. M., MCGETTRICK, A. F., GOEL, G., FREZZA, C., BERNARD, N. J., KELLY, B., FOLEY, N. H., ZHENG, L., GARDET, A., TONG, Z., JANY, S. S., CORR, S. C., HANEKLAUS, M., CAFFREY, B. E., PIERCE, K., WALMSLEY, S., BEASLEY, F. C., CUMMINS, E., NIZET, V., WHYTE, M., TAYLOR, C. T., LIN, H., MASTERS, S. L., GOTTLIEB, E., KELLY, V. P., CLISH, C., AURON, P. E., XAVIER, R. J. & O'NEILL, L. A. 2013. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. *Nature*, 496, 238-42.
- TAUBER, A. I. 2003. Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 897-901.
- THORSTEINSDOTTIR, U., MAMO, A., KROON, E., JEROME, L., BIJL, J., LAWRENCE, H. J., HUMPHRIES, K. & SAUVAGEAU, G. 2002. Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood*, 99, 121-9.
- TILL, J. E. & MC, C. E. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, 14, 213-22.
- TISONCIK, J. R., KORTH, M. J., SIMMONS, C. P., FARRAR, J., MARTIN, T. R. & KATZE, M. G. 2012. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol Mol Biol Rev*, 76, 16-32.
- TONTONOZ, P., NAGY, L., ALVAREZ, J. G., THOMAZY, V. A. & EVANS, R. M. 1998. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*, 93, 241-52.
- TRAVES, P. G., DE ATAURI, P., MARIN, S., PIMENTEL-SANTILLANA, M., RODRIGUEZ-PRADOS, J. C., MARIN DE MAS, I., SELIVANOV, V. A., MARTIN-SANZ, P., BOSCA, L. & CASCANTE, M. 2012. Relevance of the MEK/ERK signaling pathway in the metabolism of activated macrophages: a metabolomic approach. *J Immunol*, 188, 1402-10.

- URAO, N. & USHIO-FUKAI, M. 2013. Redox regulation of stem/progenitor cells and bone marrow niche. *Free Radic Biol Med*, 54, 26-39.
- USHACH, I. & ZLOTNIK, A. 2016. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J Leukoc Biol*, 100, 481-9.
- VAINIO, S. J. & UUSITALO, M. S. 2000. A road to kidney tubules via the Wnt pathway. *Pediatr Nephrol*, 15, 151-6.
- VAN DEN BOSSCHE, J., BAARDMAN, J. & DE WINTHER, M. P. 2015. Metabolic Characterization of Polarized M1 and M2 Bone Marrow-derived Macrophages Using Real-time Extracellular Flux Analysis. *J Vis Exp*.
- VAN DEN BOSSCHE, J., O'NEILL, L. A. & MENON, D. 2017. Macrophage Immunometabolism: Where Are We (Going)? *Trends Immunol*, 38, 395-406.
- VAN FURTH, R. & COHN, Z. A. 1968. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med*, 128, 415-35.
- VAN GINDERACHTER, J. A., MOVAHEDI, K., HASSANZADEH GHASSABEH, G., MEERSCHAUT, S., BESCHIN, A., RAES, G. & DE BAETSELIER, P. 2006. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology*, 211, 487-501.
- VANDER HEIDEN, M. G., CANTLEY, L. C. & THOMPSON, C. B. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324, 1029-33.
- VANDERVORST, K., HATAKEYAMA, J., BERG, A., LEE, H. & CARRAWAY, K. L., 3RD 2018. Cellular and molecular mechanisms underlying planar cell polarity pathway contributions to cancer malignancy. *Semin Cell Dev Biol*, 81, 78-87.
- VATS, D., MUKUNDAN, L., ODEGAARD, J. I., ZHANG, L., SMITH, K. L., MOREL, C. R., WAGNER, R. A., GREAVES, D. R., MURRAY, P. J. & CHAWLA, A. 2006. Oxidative metabolism and PGC-1beta attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metab*, 4, 13-24.
- VEREMEYKO, T., YUNG, A. W. Y., ANTHONY, D. C., STREKALOVA, T. & PONOMAREV, E. D. 2018. Early Growth Response Gene-2 Is Essential for M1 and M2 Macrophage Activation and Plasticity by Modulation of the Transcription Factor CEBPbeta. *Front Immunol*, 9, 2515.
- VERGES, M., LUTON, F., GRUBER, C., TIEMANN, F., REINDERS, L. G., HUANG, L., BURLINGAME, A. L., HAFT, C. R. & MOSTOV, K. E. 2004. The mammalian retromer regulates transcytosis of the polymeric immunoglobulin receptor. *Nat Cell Biol*, 6, 763-9.
- VERMA, A., DEB, D. K., SASSANO, A., UDDIN, S., VARGA, J., WICKREMA, A. & PLATANIAS, L. C. 2002. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase mediates the suppressive effects of type I interferons and transforming growth factor-beta on normal hematopoiesis. *J Biol Chem*, 277, 7726-35.
- VIOLA, A., MUNARI, F., SANCHEZ-RODRIGUEZ, R., SCOLARO, T. & CASTEGNA, A. 2019. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Front Immunol*, 10, 1462.
- VIOLA, H. M. & HOOL, L. C. 2010. Qo site of mitochondrial complex III is the source of increased superoxide after transient exposure to hydrogen peroxide. *J Mol Cell Cardiol*, 49, 875-85.

- WAGNER, P. N., SHI, Q., SALISBURY-RUF, C. T., ZOU, J., SAVONA, M. R., FEDORIW, Y. & ZINKEL, S. S. 2019. Increased Ripk1-mediated bone marrow necroptosis leads to myelodysplasia and bone marrow failure in mice. *Blood*, 133, 107-120.
- WALLACE, J., LUTGEN, V., AVASARALA, S., ST CROIX, B., WINN, R. A. & AL-HARTHI, L. 2018. Wnt7a induces a unique phenotype of monocyte-derived macrophages with lower phagocytic capacity and differential expression of pro- and anti-inflammatory cytokines. *Immunology*, 153, 203-213.
- WALLINGFORD, J. B. & HABAS, R. 2005. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development*, 132, 4421-36.
- WAMELINK, M. M., STRUYS, E. A. & JAKOBS, C. 2008. The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: a review. *J Inherit Metab Dis*, 31, 703-17.
- WANG, C., YU, X., CAO, Q., WANG, Y., ZHENG, G., TAN, T. K., ZHAO, H., ZHAO, Y., WANG, Y. & HARRIS, D. 2013. Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC Immunol*, 14, 6.
- WANG, C., ZHU, H., SUN, Z., XIANG, Z., GE, Y., NI, C., LUO, Z., QIAN, W. & HAN, X. 2014a. Inhibition of Wnt/beta-catenin signaling promotes epithelial differentiation of mesenchymal stem cells and repairs bleomycin-induced lung injury. *Am J Physiol Cell Physiol*, 307, C234-44.
- WANG, F., ZHANG, S., VUCKOVIC, I., JEON, R., LERMAN, A., FOLMES, C. D., DZEJA, P. P. & HERRMANN, J. 2018. Glycolytic Stimulation Is Not a Requirement for M2 Macrophage Differentiation. *Cell Metab*, 28, 463-475 e4.
- WANG, H., GILNER, J. B., BAUTCH, V. L., WANG, D. Z., WAINWRIGHT, B. J., KIRBY, S. L. & PATTERSON, C. 2007. Wnt2 coordinates the commitment of mesoderm to hematopoietic, endothelial, and cardiac lineages in embryoid bodies. *J Biol Chem*, 282, 782-91.
- WANG, J., SINHA, T. & WYNSHAW-BORIS, A. 2012. Wnt signaling in mammalian development: lessons from mouse genetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4.
- WANG, J., WHITEMAN, M. W., LIAN, H., WANG, G., SINGH, A., HUANG, D. & DENMARK, T. 2009. A non-canonical MEK/ERK signaling pathway regulates autophagy via regulating Beclin 1. *J Biol Chem*, 284, 21412-24.
- WANG, L., WANG, Y., LI, Z., YU, B. & LI, Y. 2014b. Unilateral versus bilateral pedicle screw fixation of minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion (MIS-TLIF): a meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Surg*, 14, 87.
- WANG, L. X., ZHANG, S. X., WU, H. J., RONG, X. L. & GUO, J. 2019. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *J Leukoc Biol*, 106, 345-358.
- WANG, Q., NI, H., LAN, L., WEI, X., XIANG, R. & WANG, Y. 2010. Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages. *Cell Res*, 20, 701-12.
- WANG, T., LIU, H., LIAN, G., ZHANG, S. Y., WANG, X. & JIANG, C. 2017. HIF1alpha-Induced Glycolysis Metabolism Is Essential to the Activation of Inflammatory Macrophages. *Mediators Inflamm*, 2017, 9029327.
- WANG, W., YU, S., ZIMMERMAN, G., WANG, Y., MYERS, J., YU, V. W., HUANG, D., HUANG, X., SHIM, J., HUANG, Y., XIN, W., QIAO, P., YAN, M., XIN, W., SCADDEN, D. T., STANLEY, P., LOWE, J. B., HUANG, A. Y., SIEBEL, C. W. & ZHOU, L. 2015. Notch

- Receptor-Ligand Engagement Maintains Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Niche Retention. *Stem Cells*, 33, 2280-93.
- WANG, Z., XU, L., HU, Y., HUANG, Y., ZHANG, Y., ZHENG, X., WANG, S., WANG, Y., YU, Y., ZHANG, M., YUAN, K. & MIN, W. 2016. miRNA let-7b modulates macrophage polarization and enhances tumor-associated macrophages to promote angiogenesis and mobility in prostate cancer. *Sci Rep*, 6, 25602.
- WEBER, G. F., CHOUSTERMAN, B. G., HE, S., FENN, A. M., NAIRZ, M., ANZAI, A., BRENNER, T., UHLE, F., IWAMOTO, Y., ROBBINS, C. S., NOIRET, L., MAIER, S. L., ZONNCHEN, T., RAHBARI, N. N., SCHOLCH, S., KLOTZSCHE-VON AMELN, A., CHAVAKIS, T., WEITZ, J., HOFER, S., WEIGAND, M. A., NAHRENDORF, M., WEISSLEDER, R. & SWIRSKI, F. K. 2015. Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis. *Science*, 347, 1260-5.
- WEBER, J. M. & CALVI, L. M. 2010. Notch signaling and the bone marrow hematopoietic stem cell niche. *Bone*, 46, 281-5.
- WEI-CHEN YENA, Y.-H. W., CHIH-CHING WUB, HSIN-RU LINB, ARNOLD STERNF, & SHIH-HSIANG CHENG, J.-C. S., DANIEL TSUN-YEE CHIUB 2019. Impaired inflammasome activation and bacterial clearance in G6PD deficiency due to defective NOX/p38 MAPK/AP-1 redox signaling. *Redox Biology*.
- WEINSTOCK, A., RAHMAN, K., YAACOV, O., NISHI, H., MENON, P., NIKAIN, C. A., GARABEDIAN, M. L., PENA, S., AKBAR, N., SANBURY, B. E., HEFFRON, S. P., LIU, J., MARECKI, G., FERNANDEZ, D., BROWN, E. J., RUGGLES, K. V., RAMSEY, S. A., GIANNARELLI, C., SPITE, M., CHOUDHURY, R. P., LOKE, P. & FISHER, E. A. 2021. Wnt signaling enhances macrophage responses to IL-4 and promotes resolution of atherosclerosis. *Elife*, 10.
- WEST, A. P., BRODSKY, I. E., RAHNER, C., WOO, D. K., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., WALSH, M. C., CHOI, Y., SHADEL, G. S. & GHOSH, S. 2011. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature*, 472, 476-80.
- WILLIAMS, R. A., SMITH, T. K., CULL, B., MOTTRAM, J. C. & COOMBS, G. H. 2012. ATG5 is essential for ATG8-dependent autophagy and mitochondrial homeostasis in *Leishmania major*. *PLoS Pathog*, 8, e1002695.
- WILSON, A., LAURENTI, E., OSER, G., VAN DER WATH, R. C., BLANCO-BOSE, W., JAWORSKI, M., OFFNER, S., DUNANT, C. F., ESHKIND, L., BOCKAMP, E., LIO, P., MACDONALD, H. R. & TRUMPP, A. 2008. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*, 135, 1118-29.
- WINKLER, I. G., SIMS, N. A., PETTIT, A. R., BARBIER, V., NOWLAN, B., HELWANI, F., POULTON, I. J., VAN ROOIJEN, N., ALEXANDER, K. A., RAGGATT, L. J. & LEVESQUE, J. P. 2010. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood*, 116, 4815-28.
- WOLF, A. A., YANEZ, A., BARMAN, P. K. & GOODRIDGE, H. S. 2019. The Ontogeny of Monocyte Subsets. *Front Immunol*, 10, 1642.
- WOO, M. S., YANG, J., BELTRAN, C. & CHO, S. 2016. Cell Surface CD36 Protein in Monocyte/Macrophage Contributes to Phagocytosis during the Resolution Phase of Ischemic Stroke in Mice. *J Biol Chem*, 291, 23654-23661.

- WU, W., HAN, Y., FAN, X., LI, Q. & SUN, L. 2019. Protective mechanism of Wnt4 gene on Parkinson's disease (PD) transgenic Drosophila. *Int J Neurosci*, 129, 703-714.
- XIONG, H., ZHU, C., LI, F., HEGAZI, R., HE, K., BABYATSKY, M., BAUER, A. J. & PLEVY, S. E. 2004. Inhibition of interleukin-12 p40 transcription and NF-kappaB activation by nitric oxide in murine macrophages and dendritic cells. *J Biol Chem*, 279, 10776-83.
- XU, Q., WANG, Y., DABDOUB, A., SMALLWOOD, P. M., WILLIAMS, J., WOODS, C., KELLEY, M. W., JIANG, L., TASMAN, W., ZHANG, K. & NATHANS, J. 2004. Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell*, 116, 883-95.
- XU, Y., JAGANNATH, C., LIU, X. D., SHARAFKHANEH, A., KOLODZIEJSKA, K. E. & EISSLER, N. T. 2007. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity*, 27, 135-44.
- XU, Y., YANG, E. M., BRUGAROLAS, J., JACKS, T. & BALTIMORE, D. 1998. Involvement of p53 and p21 in cellular defects and tumorigenesis in Atm<sup>-/-</sup> mice. *Mol Cell Biol*, 18, 4385-90.
- XUE, J., CHEN, T. T., ZHENG, J. W., BALAMURUGAN, S., CAI, J. X., LIU, Y. H., YANG, W. D., LIU, J. S. & LI, H. Y. 2018a. The role of diatom glucose-6-phosphate dehydrogenase on lipogenic NADPH supply in green microalgae through plastidial oxidative pentose phosphate pathway. *Appl Microbiol Biotechnol*, 102, 10803-10815.
- XUE, Q., YAN, Y., ZHANG, R. & XIONG, H. 2018b. Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases. *Int J Mol Sci*, 19.
- YADAV, A., KUMAR, B., DATTA, J., TEKNOS, T. N. & KUMAR, P. 2011. IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAI1 signaling pathway. *Mol Cancer Res*, 9, 1658-67.
- YAMAGUCHI, M., ZACHARIA, J., LAIDLAW, T. M. & BALESTRIERI, B. 2016. PLA2G5 regulates transglutaminase activity of human IL-4-activated M2 macrophages through PGE2 generation. *J Leukoc Biol*, 100, 131-41.
- YAMAMOTO, A., NAGANO, T., TAKEHARA, S., HIBI, M. & AIZAWA, S. 2005. Shisa promotes head formation through the inhibition of receptor protein maturation for the caudalizing factors, Wnt and FGF. *Cell*, 120, 223-35.
- YAN, J. & HORNG, T. 2020. Lipid Metabolism in Regulation of Macrophage Functions. *Trends Cell Biol*, 30, 979-989.
- YANG, J., ZHANG, L., YU, C., YANG, X. F. & WANG, H. 2014. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res*, 2, 1.
- YANG, K., LIANG, Y., SUN, Z., LIU, L., LIAO, J., XU, H., ZHU, M., FU, Y. X. & PENG, H. 2018. T cell-derived lymphotoxin limits Th1 response during HSV-1 infection. *Sci Rep*, 8, 17727.
- YANG, K., WANG, X., ZHANG, H., WANG, Z., NAN, G., LI, Y., ZHANG, F., MOHAMMED, M. K., HAYDON, R. C., LUU, H. H., BI, Y. & HE, T. C. 2016. The evolving roles of canonical WNT signaling in stem cells and tumorigenesis: implications in targeted cancer therapies. *Lab Invest*, 96, 116-36.
- YANG, L., BRYDER, D., ADOLFSSON, J., NYGREN, J., MANSSON, R., SIGVARDSSON, M. & JACOBSEN, S. E. 2005. Identification of Lin<sup>(-)</sup>Sca1<sup>(+)</sup>kit<sup>(+)</sup>CD34<sup>(+)</sup>Flt3<sup>(-)</sup> short-term

- hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood*, 105, 2717-23.
- YANG, W., ZHENG, Y., XIA, Y., JI, H., CHEN, X., GUO, F., LYSSIOTIS, C. A., ALDAPE, K., CANTLEY, L. C. & LU, Z. 2012. ERK1/2-dependent phosphorylation and nuclear translocation of PKM2 promotes the Warburg effect. *Nat Cell Biol*, 14, 1295-304.
- YAO, Y., XU, X. H. & JIN, L. 2019. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Front Immunol*, 10, 792.
- YE FENG, J. R., YUAN GUI, WEI WEI, BINGYAN SHU, QINGMIAO LU, XIAN XUE, XIAOLI SUN, & WEICHUN HE, J. Y., AND CHUNSUN DAI 2018. Wnt/b-Catenin–Promoted Macrophage Alternative Activation Contributes to Kidney Fibrosis. *J Am Soc Nephrol*.
- YE FENG, Y. L., XINGWEN ZHU , MINGJIE WANG, YUAN GUI, QINGMIAO LU, MENGRO GU, XIAN XUE, XIAOLI SUN, WEICHUN HE, JUNWEI YANG, RANDY L. JOHNSON, AND X CHUNSUN DAI 2018. The signaling protein Wnt5a promotes TGFB1-mediated macrophage polarization and kidney fibrosis by inducing the transcriptional regulators Yap/Taz. *J.Biol.Chem*, 293, 19290–19302.
- YE, J. & MEDZHITOV, R. 2019. Control strategies in systemic metabolism. *Nat Metab*, 1, 947-957.
- YONA, S., KIM, K. W., WOLF, Y., MILDNER, A., VAROL, D., BREKER, M., STRAUSS-AYALI, D., VIUKOV, S., GUILLIAMS, M., MISHARIN, A., HUME, D. A., PERLMAN, H., MALISSEN, B., ZELZER, E. & JUNG, S. 2013. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, 38, 79-91.
- YORIMITSU, T. & KLIONSKY, D. J. 2005. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2, 1542-52.
- YOSHIHARA, H., ARAI, F., HOSOKAWA, K., HAGIWARA, T., TAKUBO, K., NAKAMURA, Y., GOMEI, Y., IWASAKI, H., MATSUOKA, S., MIYAMOTO, K., MIYAZAKI, H., TAKAHASHI, T. & SUDA, T. 2007. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell*, 1, 685-97.
- YU, B., CHANG, J., LIU, Y., LI, J., KEVORK, K., AL-HEZAIMI, K., GRAVES, D. T., PARK, N. H. & WANG, C. Y. 2014. Wnt4 signaling prevents skeletal aging and inflammation by inhibiting nuclear factor-kappaB. *Nat Med*, 20, 1009-17.
- YU, J. S. & CUI, W. 2016. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development*, 143, 3050-60.
- YUAN, Y., CHEN, Y., PENG, T., LI, L., ZHU, W., LIU, F., LIU, S., AN, X., LUO, R., CHENG, J., LIU, J. & LU, Y. 2019. Mitochondrial ROS-induced lysosomal dysfunction impairs autophagic flux and contributes to M1 macrophage polarization in a diabetic condition. *Clin Sci (Lond)*, 133, 1759-1777.
- YUE, Z., JIN, S., YANG, C., LEVINE, A. J. & HEINTZ, N. 2003. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 15077-82.
- YUNYUN SU, C. F., SHINJI ISHIKAWA, ALESSANDRA STELLA, MASAYUKI KOJIMA, KAZUHISA SHITOH, & EMANUEL M. SCHREIBER, B. W. D., AND BO LIU1 2008. APC is essential for targeting phosphorylated beta-catenin to the SCFbeta-TrCP ubiquitin ligase. *Molecular cell*.

- ZACHARI, M. & GANLEY, I. G. 2017. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays Biochem*, 61, 585-596.
- ZALTSMAN, Y., SHACHNAI, L., YIVGI-OHANA, N., SCHWARZ, M., MARYANOVICH, M., HOUTKOOOPER, R. H., VAZ, F. M., DE LEONARDIS, F., FIERMONTE, G., PALMIERI, F., GILLISSEN, B., DANIEL, P. T., JIMENEZ, E., WALSH, S., KOEHLER, C. M., ROY, S. S., WALTER, L., HAJNOCZKY, G. & GROSS, A. 2010. MTCH2/MIMP is a major facilitator of tBID recruitment to mitochondria. *Nat Cell Biol*, 12, 553-562.
- ZARBOCK, A. & LEY, K. 2009. Neutrophil adhesion and activation under flow. *Microcirculation*, 16, 31-42.
- ZECHNER, R., ZIMMERMANN, R., EICHMANN, T. O., KOHLWEIN, S. D., HAEMMERLE, G., LASS, A. & MADEO, F. 2012. FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab*, 15, 279-91.
- ZHANG, B., BAILEY, W. M., BRAUN, K. J. & GENSEL, J. C. 2015a. Age decreases macrophage IL-10 expression: Implications for functional recovery and tissue repair in spinal cord injury. *Exp Neurol*, 273, 83-91.
- ZHANG, B., SHI, L., LU, S., SUN, X., LIU, Y., LI, H., WANG, X., ZHAO, C., ZHANG, H. & WANG, Y. 2015b. Autocrine IL-8 promotes F-actin polymerization and mediate mesenchymal transition via ELMO1-NF-kappaB-Snail signaling in glioma. *Cancer Biol Ther*, 16, 898-911.
- ZHANG, C. C. & SADEK, H. A. 2014. Hypoxia and metabolic properties of hematopoietic stem cells. *Antioxid Redox Signal*, 20, 1891-901.
- ZHANG, M. Z., WANG, X., WANG, Y., NIU, A., WANG, S., ZOU, C. & HARRIS, R. C. 2017. IL-4/IL-13-mediated polarization of renal macrophages/dendritic cells to an M2a phenotype is essential for recovery from acute kidney injury. *Kidney Int*, 91, 375-386.
- ZHANG, P., ZHANG, C., LI, J., HAN, J., LIU, X. & YANG, H. 2019a. The physical microenvironment of hematopoietic stem cells and its emerging roles in engineering applications. *Stem Cell Res Ther*, 10, 327.
- ZHANG, T., GUO, C. J., LI, Y., DOUGLAS, S. D., QI, X. X., SONG, L. & HO, W. Z. 2003. Interleukin-1beta induces macrophage inflammatory protein-1beta expression in human hepatocytes. *Cell Immunol*, 226, 45-53.
- ZHANG, Y., GAO, S., XIA, J. & LIU, F. 2018. Hematopoietic Hierarchy - An Updated Roadmap. *Trends Cell Biol*, 28, 976-986.
- ZHANG, Z., DENG, X., LIU, Y., LIU, Y., SUN, L. & CHEN, F. 2019b. Correction to: PKM2, function and expression and regulation. *Cell Biosci*, 9, 59.
- ZHANG, Z., DENG, X., LIU, Y., LIU, Y., SUN, L. & CHEN, F. 2019c. PKM2, function and expression and regulation. *Cell Biosci*, 9, 52.
- ZHAO, J. L., MA, C., O'CONNELL, R. M., MEHTA, A., DILORETO, R., HEATH, J. R. & BALTIMORE, D. 2014a. Conversion of danger signals into cytokine signals by hematopoietic stem and progenitor cells for regulation of stress-induced hematopoiesis. *Cell Stem Cell*, 14, 445-59.
- ZHAO, M., PERRY, J. M., MARSHALL, H., VENKATRAMAN, A., QIAN, P., HE, X. C., AHAMED, J. & LI, L. 2014b. Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 20, 1321-6.

- ZHENG, J. 2012. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). *Oncol Lett*, 4, 1151-1157.
- ZHOU, B. O., YU, H., YUE, R., ZHAO, Z., RIOS, J. J., NAVEIRAS, O. & MORRISON, S. J. 2017. Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF. *Nat Cell Biol*, 19, 891-903.
- ZHOU, J., TANG, Z., GAO, S., LI, C., FENG, Y. & ZHOU, X. 2020. Tumor-Associated Macrophages: Recent Insights and Therapies. *Front Oncol*, 10, 188.
- ZHU, H., KWAK, H. J., LIU, P., BAJRAMI, B., XU, Y., PARK, S. Y., NOMBELA-ARRIETA, C., MONDAL, S., KAMBARA, H., YU, H., CHAI, L., SILBERSTEIN, L. E., CHENG, T. & LUO, H. R. 2017. Reactive Oxygen Species-Producing Myeloid Cells Act as a Bone Marrow Niche for Sterile Inflammation-Induced Reactive Granulopoiesis. *J Immunol*, 198, 2854-2864.
- ZHU, L., ZHAO, Q., YANG, T., DING, W. & ZHAO, Y. 2015. Cellular metabolism and macrophage functional polarization. *Int Rev Immunol*, 34, 82-100.
- ZHU, M. & FU, Y. X. 2011. The role of core TNF/LIGHT family members in lymph node homeostasis and remodeling. *Immunol Rev*, 244, 75-84.
- ZHU, Z., ZHANG, H., CHEN, B., LIU, X., ZHANG, S., ZONG, Z. & GAO, M. 2020. PD-L1-Mediated Immunosuppression in Glioblastoma Is Associated With the Infiltration and M2-Polarization of Tumor-Associated Macrophages. *Front Immunol*, 11, 588552.
- ZIMMERMAN, Z. F., KULIKAUSKAS, R. M., BOMSZTYK, K., MOON, R. T. & CHIEN, A. J. 2013. Activation of Wnt/beta-catenin signaling increases apoptosis in melanoma cells treated with trail. *PLoS One*, 8, e69593.
- ZIZZO, G., HILLIARD, B. A., MONESTIER, M. & COHEN, P. L. 2012. Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *J Immunol*, 189, 3508-20.
- ZLOTNIK, A. & YOSHIE, O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12, 121-7.
- ZOU, L., BARNETT, B., SAFAH, H., LARUSSA, V. F., EVDEMON-HOGAN, M., MOTTRAM, P., WEI, S., DAVID, O., CURIEL, T. J. & ZOU, W. 2004. Bone marrow is a reservoir for CD4+CD25+ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals. *Cancer Res*, 64, 8451-5.