

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Année 2010

Thèse n°1758

Thèse pour l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention : Sciences Technologie, Santé

Option : Biologie cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement le 17 décembre 2010

Par

Kevin ROUAULT-PIERRE

Né le 22 février 1980 à Les Lilas

**Rôle des facteurs de transcription HIF (Hypoxia Inducible Factor)
dans le maintien à long terme des cellules souches hématopoïétiques
humaines chez la souris immunodéficiente**

Membres du jury :

Mr le Professeur PRALORAN

Mme le Docteur BONNET

Mr le Professeur TURHAN

Mme le Docteur PFLUMIO

Mme le Docteur STAEDEL

Mr le Docteur MAZURIER

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord les membres de mon jury de thèse :

Monsieur Vincent Praloran qui me fait l'honneur de présider cette thèse,

Madame Dominique Bonnet et Monsieur Ali Turhan qui ont accepté la charge de juger ce travail,

Mesdames Françoise Pflumio et Cathy Staedel qui ont accepté de discuter de ce travail.

Je tiens également à remercier particulièrement le professeur Hubert de Verneuil pour son accueil au sein de son équipe et laboratoire de pointe, pour la confiance qu'il a su m'accorder ainsi que pour ses conseils avisés.

Je remercie Frédéric Mazurier d'avoir dirigé ce travail et d'avoir partagé son expérience, en particulier dans le domaine murin, et je tiens également à le remercier pour la confiance et l'autonomie qu'il m'a accordées durant mes trois années de thèse.

Je tiens également à remercier :

L'équipe de Benoît Arveiler (Isa, Cyril, Elise et Delphine) avec qui ce fut un plaisir de partager les couloirs et la cafétéria durant ces trois années.

L'équipe 2, Jean-Max, Valérie, Bruno, Eric, Béa et Maryse qui étaient là pour répondre à mes questions. Stéphane et Stéphanie pour leur discussion, Claire et Romain pour leur patience et accueil dans leur bureau ; Marina pour nos discussions et ses kits de RT-QPCR.

Christine Varon pour ses conseils en immunofluorescence et le joli sujet Helicobacter/HIF.

Amélie et Arnaud qui ont toujours été disponibles et avec qui ce fut un plaisir de discuter.

Benoît Rousseau pour son temps et ses conseils, et son équipe Véro, Fabienne et Geoffroy pour leur bonne humeur.

Vincent Pitard pour son expertise et son temps.

Je remercie très chaleureusement tous les membres de notre équipe :

Maité, Katia et Ysa qui ont toujours été disponibles pour mes petits maux.

François pour son enthousiasme et son esprit en perpétuelle ébullition.

Emmanuel, Sandrine et Evelyne pour leurs conseils.

Mumu, mon fournisseur officieux en HIF2 que je remercie pour nos discussions et l'acquisition du snap id.

Cath pour les bons moments passés au laboratoire, ta franchise et ton humour.

CoCo pour ton caractère entier et passionné.

Elodie pour toutes nos discussions et ton soutien.

Chloé J pour le plaisir de nos discussions et la pertinence de tes remarques.

Isa M pour nos discussions et coins de hotte partagés.

Nsrein pour toute cette énergie contenue dans une si petite chose.

Marie, Miguel et Yann... Marie pour ta joie de vivre, Miguel et Yann que les IPS soient avec vous.

Johan, Martin et Ghida pour nos échanges.

Véro merci de m'avoir accueilli dans ton bureau, merci pour nos discussions et ton humour tout à fait à mon goût.

Chloé LR qui a fait les frais de nos salves d'humour croisées et qui a tenu bon.

Alice merci pour toutes ces 293 et ton soutien.

Hamid merci pour tous tes conseils, ton temps et tes techniques, au plaisir de retravailler avec quelqu'un d'aussi intéressant que toi.

Delphine merci d'avoir partagé ces quelques années de fin de thèse pour toi et de début pour moi, merci pour ton soutien et tes conseils.

Pauline pour ton franc parlé, ton enthousiasme et ta motivation, tu es une véritable bouffée d'oxygène, ce qui est une aubaine lorsque l'on travaille en hypoxie.

Magalie pour tes conseils, ton enthousiasme et ton dynamisme qui sont pour beaucoup dans l'ambiance du laboratoire, pour les fois où tu m'a remis en place et permis d'y voir plus clair. Mojito Y Salud !!!

Isa toi qui me vis à mes débuts partir 2 mais par un prompt renfort, tu nous vis trois en arrivant au port. Pour ta patience et ta rigueur dont j'espère avoir acquis une partie. Merci pour tes relectures systématiques des posters, projets et pour finir de ma thèse. Pour toutes ces heures passées en culture, nos discussions et tes conseils, un grand MERCI.

Je remercie également Juju pour ses encouragements et conseils durant nos longues conversations téléphoniques.

Je finis par un merci particulier à ma famille :

Dennis et Martine qui ont relu ma thèse. Je remercie notamment Dennis pour toutes ces relectures et corrections des versions anglaises de l'article.

Mes parents qui m'ont toujours soutenu et encouragé à faire ce que j'aime.

A Julie mon épouse et à mon fils Robin dont les encouragements et sourires ont été une véritable source d'enthousiasme et de bonheur durant ces trois années. A mon épouse, pour ses relectures, conseils et dons de mise en page. Merci à vous

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	7
ABREVIATIONS.....	13
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	19
PREAMBULE.....	23
1 ^{ER} CHAPITRE : INTRODUCTION.....	26
I. L'HEMATOPOÏESE.....	26
A. GENERALITES SUR L'HEMATOPOÏESE.....	26
B. ONTOGENESE DU SYSTEME HEMATOPOÏËTIQUE.....	28
1) <i>Ontogenèse du système hématopoïétique murin</i>	28
a) Le sac vitellin.....	28
b) La région aorto-gonado-mésonephrotique.....	29
c) Le foie fœtal.....	30
d) Le placenta.....	30
e) La moelle osseuse.....	30
2) <i>L'ontogenèse humaine</i>	31
II. LES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏËTIQUES (CSH).....	33
A. LES CSH ADULTES.....	33
1) <i>Facteurs clefs de l'autorenouvellement et de la différenciation des CSH</i>	35
a) Régulation intrinsèque de l'autorenouvellement des CSH.....	36
b) Régulation extrinsèque des CSH.....	52
c) Les iPS (induced pluripotent stem cells).....	52
d) Les progéniteurs érythroïdes/myéloïdes/lymphoïdes.....	53
2) <i>Les cytokines et leurs récepteurs</i>	55
a) Les récepteurs.....	56
b) Les cytokines.....	57
3) <i>Le rôle des microARN dans l'hématopoïèse</i>	60

B.	LES TESTS FONCTIONNELS	63
1)	<i>Tests in vivo : le modèle de la souris immunodéficiente</i>	63
2)	<i>Tests in vitro : LTC-IC et CFC</i>	69
3)	<i>Phénotype et isolement des cellules souches hématopoïétiques</i>	70
a)	Les marqueurs membranaires :	71
b)	Les marqueurs métaboliques.....	73
III. LA NICHE HEMATOPOÏETIQUE.....		75
A.	PRESENTATION DES NICHE HEMATOPOIETIQUES.....	77
1)	<i>La niche ostéoblastique (ou endostéale)</i>	77
2)	<i>La niche vasculaire</i>	78
B.	SIGNALISATION DANS LA NICHE HEMATOPOÏETIQUE ET REGULATION EXTRINSEQUE DES CSH	80
1)	<i>La voie de signalisation BMP/TGF-β dans les CSH</i>	80
2)	<i>L'axe Tie2/Ang-1 et Cdh2/integrinβ1/c-MYC dans les CSH</i>	83
3)	<i>Le signal TPO/Mpl dans les CSH</i>	84
4)	<i>La voie de signalisation Sonic Hedgehog dans les CSH</i>	85
5)	<i>La voie de signalisation Wnt dans les CSH</i>	85
6)	<i>La voie de signalisation Notch dans les CSH</i>	86
7)	<i>Recrutement et adhésion des CSH médié par le FGF</i>	87
C.	HOMING ET MOBILISATION	87
D.	HYPOXIE ET STRESS OXYDATIF DANS LA NICHE	91
IV. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION HIF		95
A.	INTRODUCTION ET GÉNÉRALITÉS	95
1)	<i>La structure des facteurs de transcriptions HIF-1α et HIF-2α</i>	97
a)	Structure générale	97
b)	Les domaines de transactivation N-TAD et C-TAD	98
2)	<i>La régulation des facteurs de transcriptions HIF-1α et HIF-2α</i>	99
a)	Système de dégradation dépendant de l'oxygène.....	99
b)	Autres systèmes de dégradations.....	101
c)	Modification post-traductionnelles	105
d)	Autres systèmes de régulation.....	106
3)	<i>Les co-activateurs de HIF-1α et HIF-2α</i>	109
a)	Les co-activateurs de HIF-1 α	110
b)	Les co-activateurs de HIF-2 α	112
4)	<i>Le rôle antagoniste des facteurs HIF dans la signalisation c-Myc</i>	113
B.	PRINCIPALES VOIES DE SIGNALISATION DEPENDANTES DE HIF.....	115
1)	<i>Les facteurs HIF sont les principaux médiateurs de l'angiogenèse</i>	115

2) <i>La prolifération et les facteurs HIF</i>	115
3) <i>Les facteurs HIF régulent le métabolisme cellulaire</i>	116
4) <i>Rôle des facteurs HIF dans le processus de métastase</i>	117
5) <i>Différenciation</i>	119
C. HIF ET LES CELLULES SOUCHES	121
1) <i>HIF et les cellules souches</i>	121
a) HIF régule la différenciation via Notch	121
b) HIF-1 α régule la différenciation via Wnt	123
c) HIF-2 α et les iP _s	123
2) <i>HIF et les cellules souches hématopoïétiques</i>	123
a) HIF-1 α et les CSH	124
b) HIF-2 α et les CSH	126
2^{EME} CHAPITRE : LES RESULTATS	132
I. PROJET DE RECHERCHE	133
A. SITUATION DU PROJET DE RECHERCHE	133
B. RESULTATS	134
1) <i>Etudes in vitro</i>	134
2) <i>Etudes in vivo</i>	136
II. L'ARTICLE	137
3^{EME} CHAPITRE : DISCUSSION ET PERSPECTIVES	182
I. DISCUSSION	182
II. RESULTATS PRELIMINAIRES AUX PERSPECTIVES	183
A. CYCLE CELLULAIRE ET MORT CELLULAIRE	183
B. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION P53	185
III. PERSPECTIVES	187

BIBLIOGRAPHIE.....	189
ANNEXES	215

ABBREVIATIONS

A

AGM Région aorto-gonado-mésonéphrotique

ALDH Aldéhyde déshydrogénase

AP-1 Activator Protein-1

ASK1 Apoptosis signal-regulatory kinase 1

ATM Ataxia telangiectasia mutated

B

BFU-E Burst Forming Unit-Erythroïdes

BM Moelle osseuse

C

CAD C-terminal activation domain

CD Cluster de différenciation

CDK Cyclin dependent kinase

CAFC Cobblestone area-forming cells

CFC Colony-Forming Cell

CFU Colony Forming Unit

CFU-E Colony Forming Unit-Erythroïde

CFU-G Colony Forming Unit-granulocytaires

CFU-GM Colony Forming Unit-granulo/macrophagiques

CFU-M Colony Forming Unit-macrophagiques

CFU-MK Colony Forming Unit-mégacaryocytaires

c-Kit (CD117) Récepteur du SCF

CLP Progéniteur lymphoïde commun

CMH1 Complexe majeur d'histocompatibilité

CMP Progéniteur myéloïde commun

CSF Colony-stimulating factors

CXCL12 = SDF-1 Stromal cell derived factor-1

D

Dpc jours post coïtum

E

E-LTC-IC Extended-Long term culture-initiating cells

EPO Erythropoïétine

ESC ou ES Embryonic stem cells

Evi-1 Ectopic viral integration site-1

F

FIH Factor Inhibiting HIF

FL Foie foetal

FLK1 voir VEGFR2

G

Gfi-1 Growth factor independant 1

GMP Progéniteur granulo-macrophagique

H

HIF Hypoxia inducible factor

HLF Hepatic Leukemia Factor

HSC Cellules souches hématopoïétiques

I

IL-(X) Interleukines

iPS Induced pluripotent stem cells

J

JAK Kinase Janus

K

KDR voir VEGFR2

KI Knockin

KO Knockout

L

LFA-1 Lymphocyte Function-Associated Antigen-1 = CD11a

LMC Leucémie myéloïde chronique

LTC-IC Long term culture-initiating cells

M

MEP Progéniteur érythro-mégacaryocytaire

MO Moelle osseuse

MS-5 Lignée stromale murine

N

NAD N-terminal activation domain

O

OPN Ostéopontine

ODDD Oxygen dependent degradation domain

P

PAS Splanchnopleure para-aortique

PDK1 Phosphoinositide-dependant kinase 1

PLD Phospholipase D

PI3K Phosphatidylinositol 3-Kinase

Prkdc sous unité catalytique de la protéine kinase ADN-dépendante

Pten Phosphatase and tension homologue deleted on chromosome ten

R

RCC Renal cell carcinoma

ROS Reactive oxygen species

RTK Récepteur tyrosine kinase

S

SCF Stem Cell Factor

SCID Sever combined immunodeficiency

SCL/Tal-1 Stem Cell Leukemia

SDF-1 Stromal cell derived factor-1

SH2 Src homology 2

shRNA Short hairpin RNA

siRNA Short interfering RNA

SLAM Signalling lymphocyte activation molecule

SMP Syndrome myéloprolifératif

SNO Spindle-shaped N-Cadherin⁺ CD45⁻ osteoblast

Sp Rate

SP Side Population

SRC Scid Repopulating Cell

STAT Signal Transducers and Activators of Transcription

SV Sac vitellin

T

TEL (Translocation Ets Leukemia)/ETV6 (Ets variant gene 6)

TPO Thrombopoïétine

V

VEGFA Vascular Endothelial Growth Factor A

VEGFR2 Récepteur du Vascular Endothelial Growth Factor A

VLA-4 Very late antigen-4 = CD49d

W

WT Wild type

Y

YS Sac vitellin

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma général de l'hématopoïèse : de la cellule souche aux cellules matures.....	27
Figure 2 : Formation des îlots sanguins: du mésoderme à la circulation sanguine primitive ..	28
Figure 3 : Sites hémogéniques au cours du développement embryonnaire murin.....	29
Figure 4 : Ontogèse du système hématopoïétique dans les modèles murins (A) et humains (B)	31
Figure 5 : Représentation schématique des divisions symétrique/asymétrique	34
Figure 6 : Présentation des 4 phases du cycle cellulaire, des principales cyclines, leurs kinases et leurs inhibiteurs	36
Figure 7 : Evi-1 régule la prolifération et le maintien des HSC de manière dose-dépendante	43
Figure 8 : Régulation du compartiment des CSH par JunB	44
Figure 9 : Organisation des clusters des gènes Hox	48
Figure 10 : Les voies de signalisation MAPK, PI3K/AKT, JAK/STAT	50
Figure 11 : Principaux facteurs de transcription régulant la différenciation hématopoïétique	54
Figure 12 : Principaux récepteurs des cytokines de l'hématopoïèse.....	56
Figure 13 : Principales cytokines régulant la différenciation hématopoïétique	58
Figure 14 : Principaux microARN régulant l'hématopoïèse.....	61
Figure 15 : Genèse des principaux modèles de souris humanisées.....	65
Figure 16 : Marqueurs membranaires des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques.....	70
Figure 17 : Région endostéale et région centrale de l'os	76
Figure 18 : Réseau vasculaire au sein de l'os.....	79
Figure 19 : Les voies de signalisation extrinsèques	82
Figure 20 : Rôle de la niche ostéoblastique dans la régulation de la quiescence des CSH.....	84
Figure 21 : Mobilisation des CSH induite par le G-CSF	89
Figure 22 : Signalisation et Niches	90
Figure 23 : Stress oxydatif et CSH.....	92
Figure 24 : Concentration en oxygène dans les principaux organes du corps humain.....	93
Figure 25 : Structures des facteurs de transcription HIFs	96
Figure 26 : Dégradation dépendante de l'oxygène, des PHD, du complexe d'ubiquitinylation et du protéasome 26S	100
Figure 27 : Activation hypothétique des domaines N-TAD, C-TAD, en fonction du gradient d'oxygène	101
Figure 28 : Ubiquitinylation et dégradation de HIF-1 α dépendantes de l'HSP70 et de CHIP	102
Figure 29 : Mise en parallèle des mécanismes de dégradation de HIF-1 α dépendant et indépendant de l'oxygène.....	103
Figure 30 : Répression de HIF-2 α par IRP1	104
Figure 31 : Régulation de HIF par mTOR	107
Figure 32 : Répression schématique de la transcription de l'EPO sous stimuli hypoxique et TGF- β	111
Figure 33 : Représentation de l'axe HIF/c-Myc.....	114
Figure 34 : Représentation de l'axe HIF-2 α /p53.....	117
Figure 35 : Régulation de l'EMT par les facteurs HIF.....	118
Figure 36 : Processus physiologiques et pathologiques dépendant de HIF-1 α et HIF-2 α	120
Figure 37 : Représentation schématique de la voie de signalisation HIF/Notch	122
Figure 38 : Régulation hypothétique des CSH par HIF-1 α	125
Figure 39 : Régulation hypothétique des CSH par HIF-2 α	129
Figure 40 : Effet de l'inactivation des facteurs HIF sur la prolifération des CSH.....	135

Figure 41 : Effets de l'inactivation des facteurs HIF sur le cycle cellulaire et l'apoptose des CSH	184
Figure 42 : Stabilisation de p53 dans les cellules CD34+ en l'absence de HIF-2 α	185
Figure 43 : Schéma hypothétique de la régulation des CSH par HIF-2 α	187

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Localisations et fonctions des différents sites hématopoïétiques de l'embryon à l'adulte.....	32
Tableau 2 : Présentation des 4 phases du cycle cellulaire, des principales cyclines, leurs kinases et leurs inhibiteurs	38
Tableau 3 : Principaux modèles de souris humanisées	66

PREAMBULE

Mon travail de thèse traite du rôle des facteurs de transcription *Hypoxia Inducible Factor* (HIF) dans le maintien à long terme des cellules souches hématopoïétiques humaines (CSH) chez la souris immunodéficiente.

Une personne qui m'est proche m'a dit un jour que la thèse n'est qu'un début ! Ce manuscrit retrace notre cheminement dans l'étude des facteurs HIF dans les CSH humaines et je l'espère servira d'outil pour les prochaines études impliquant le maintien des cellules souches saines ou leucémiques dans un état indifférencié.

L'hématopoïèse, qui permet de générer la majorité des éléments circulants du sang, est un modèle qui est bien décrit et dont on connaît de nombreux mécanismes de régulation. Ces cellules matures et fonctionnelles sont générées à partir de quelques rares cellules : les cellules souches hématopoïétiques (CSH), qui se localisent dans la moelle osseuse chez l'adulte. Les CSH sont régulées durant l'ontogenèse hématopoïétique par des facteurs intrinsèques et extrinsèques mais aussi par leur localisation spatiotemporelle. Ainsi, ces éléments forment-ils un système intégré où les facteurs de transcriptions, les facteurs sécrétés et les interactions cellules/cellules et cellules/matrice extracellulaire vont déterminer le devenir des CSH. L'ensemble de ces stimuli permet à la fois aux CSH de se maintenir dans un état stationnaire appelé « quiescence » créant un réservoir de CSH mais aussi de s'autorenouveler lorsque leur stock diminue, ou au contraire de se différencier pour maintenir une hématopoïèse fonctionnelle.

En maintenant les CSH dans un environnement privilégié, l'organisme s'assure une hématopoïèse fonctionnelle tout au long de sa vie. Aujourd'hui, nous savons que l'environnement dans lequel évoluent les CSH intègre également les variations d'oxygène. En effet, l'environnement des CSH, qualifié de niche, est une région où la disponibilité en oxygène est très faible (hypoxie).

In vitro, les basses concentrations d'oxygène permettent de maintenir temporairement les cellules souches dans un état indifférencié. *In vivo*, les cellules hématopoïétiques les plus

immatures se localisent dans des niches osseuses éloignées des vaisseaux sanguins et très faiblement distribuées en oxygène.

Si l'impact de l'oxygène a longtemps été sous estimé dans la physiologie des cellules souches, cela fait longtemps que nous savons que l'hypoxie permet l'activation de facteurs clefs dans l'adaptation des cellules tumorales à leur environnement. La réponse à l'hypoxie est médiée par une famille de facteurs de transcription, les facteurs HIF (*hypoxia inducible factor*). Ils sont capables d'adapter le métabolisme des cellules, de modifier l'architecture vasculaire d'un tissu et de réguler le pH et l'environnement Redox. Les deux principaux membres de cette famille sont les facteurs HIF-1 α et HIF-2 α . S'ils sont similaires, leurs fonctions ne sont pas toujours identiques. HIF-1 α était déjà présent chez les métazoaires, alors que HIF-2 α fait son apparition chez les vertébrés et occupe une place importante dans le remodelage osseux.

Le KO de ces deux facteurs, dans des modèles murins, est létal et ne permet pas une étude fonctionnelle de l'hématopoïèse murine. Toutefois un KO conditionnel a permis de montrer que le facteur HIF-1 α est essentiel au maintien des CSH murines, tandis que le rôle de HIF-2 α se limiterait aux progéniteurs hématopoïétiques murins.

Ainsi, la disponibilité en oxygène modifie, par l'intermédiaire des facteurs HIF, le comportement des CSH et de leur stroma. L'expression des facteurs intrinsèques et extrinsèques aux CSH est donc en partie gouvernée par son environnement hypoxique.

Le maintien des CSH étant dépendant de l'environnement hypoxique, nous avons donc décidé d'étudier, dans les CSH humaines, l'impact de l'inactivation des deux principaux acteurs de la réponse à l'hypoxie : les facteurs de transcription HIF-1 α et HIF-2 α et ce au travers de xénotreffes chez la souris immunodéficiente.

Nous aborderons, dans une première partie, l'ontogenèse du système hématopoïétique avec les différents organes sources et sites des CSH. La deuxième partie traite des facteurs intrinsèques capables de réguler l'hématopoïèse de la cellule souche aux cellules matures. Puis, après avoir vu les outils à notre disposition pour identifier les CSH, nous traiterons de la niche hématopoïétique où les facteurs extrinsèques et l'hypoxie régulent les CSH. L'hypoxie ouvrira le chapitre sur HIF qui se clôturera avec le rôle de HIF dans les cellules souches hématopoïétiques.

INTRODUCTION

1^{er} CHAPITRE : INTRODUCTION

I. L'HEMATOPOÏÈSE

A. GENERALITES SUR L'HEMATOPOÏÈSE

Ce qui différencie une cellule souche d'une autre cellule de l'organisme est sa capacité à s'autorenouveler, c'est-à-dire à se diviser tout en conservant ses critères de cellule souche. Cette cellule est donc logiquement présente dans les tissus capables de régénération tels que la peau, l'épithélium intestinal ou le système hématopoïétique.

Le système hématopoïétique est aujourd'hui l'un des modèles d'étude de la cellule souche le plus largement et le mieux décrit de la littérature. Les cellules matures circulantes du sang, comme celles produisant des anticorps ou transportant l'oxygène, dérivent toutes de très rares cellules souches hématopoïétiques (CSH), qui résident dans la moelle osseuse chez les mammifères adultes¹. Depuis la mise en évidence d'une CSH capable non seulement de s'autorenouveler, mais aussi de se différencier pour générer toutes les cellules qui circulent dans le sang, une hiérarchie a pu être établie au sein de l'hématopoïèse faisant émerger 4 compartiments (*figure 1*):

- les CSH, cellules multipotentes, capables d'autorenouvellement et de différenciation dans toutes les lignées hématopoïétiques,
- les progéniteurs, cellules pour la plupart engagées dans une lignée hématopoïétique capables de prolifération et de différenciation sans possibilité de s'autorenouveler,
- les précurseurs, cellules en fin de différenciation aux capacités prolifératives limitées,
- les cellules matures, cellules différenciées et fonctionnelles à la durée de vie limitée.

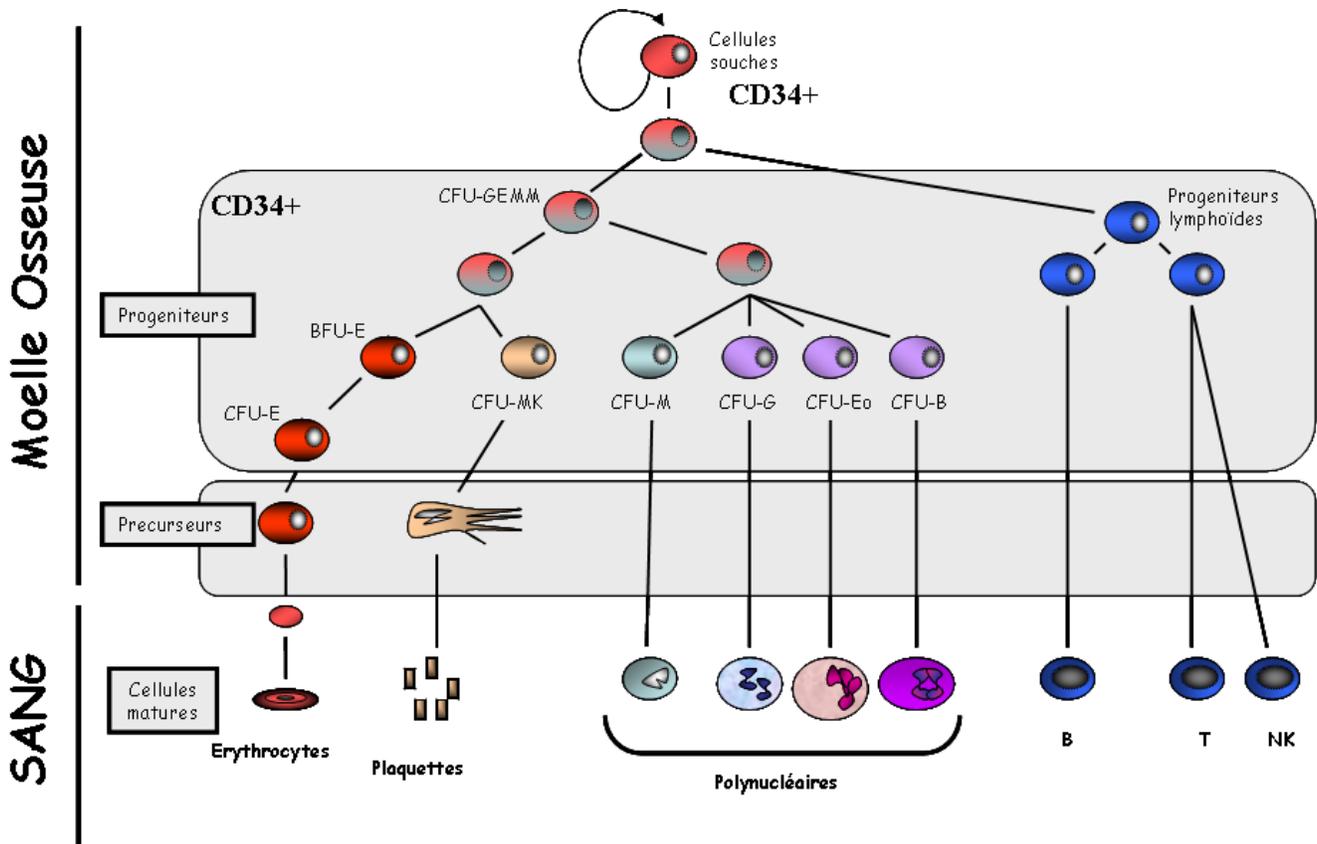


Figure 1 : Schéma général de l'hématopoïèse : de la cellule souche aux cellules matures

Une seule cellule souche hématopoïétique peut engendrer un système hématopoïétique fonctionnel complet sur toute la durée de vie d'un individu². Les cellules matures issues de ces quelques cellules souches prolifèrent très peu et ont une durée de vie limitée (globules rouges 120 jours, plaquettes 7 jours, polynucléaires 24 heures) nécessitant un renouvellement quotidien afin d'assurer l'homéostasie. Ce processus de renouvellement est régulé de manière très fine tout au long de la vie et est composé de plusieurs étapes d'engagement faisant intervenir progéniteurs et précurseurs.

De nombreuses voies sont connues et il est aujourd'hui possible de maintenir, voir d'amplifier mais de manière limitée, les CSH. La conservation des cellules souches dépend de nombreuses cytokines, des interactions cellules/cellules et cellules/matrices et de l'environnement dans lequel elles évoluent (vascularisation, oxygénation, ...) appelé « niche de la cellule souche »³.

B. ONTOGENESE DU SYSTEME HEMATOPOÏÏTIQUE

Les précurseurs des CSH prennent naissance dans le sac vitellin (SV). Ils rejoignent la région aorto-gonado-mésonephrotique (AGM), puis colonisent, via la circulation sanguine, les principaux sites hémogéniques : le placenta, le foie fœtal (FF), pour finalement rejoindre le siège de l'hématopoïèse adulte, la moelle osseuse (MO).

1) Ontogenèse du système hématopoïétique murin

a) Le sac vitellin

Chez la souris, les premières cellules hématopoïétiques apparaissent dans le sac vitellin, d'origine extra-embryonnaire, entre 7 et 7,5 dpc (*day post coitum*), sous forme d'îlots sanguins dans la couche mésodermique (*figure 2*)^{4,5}. Cet agrégat de cellules présente une morphologie endothéliale; les érythrocytes présents dans ces îlots sont larges, nucléés et ressemblent aux précurseurs érythrocytaires de la moelle osseuse.

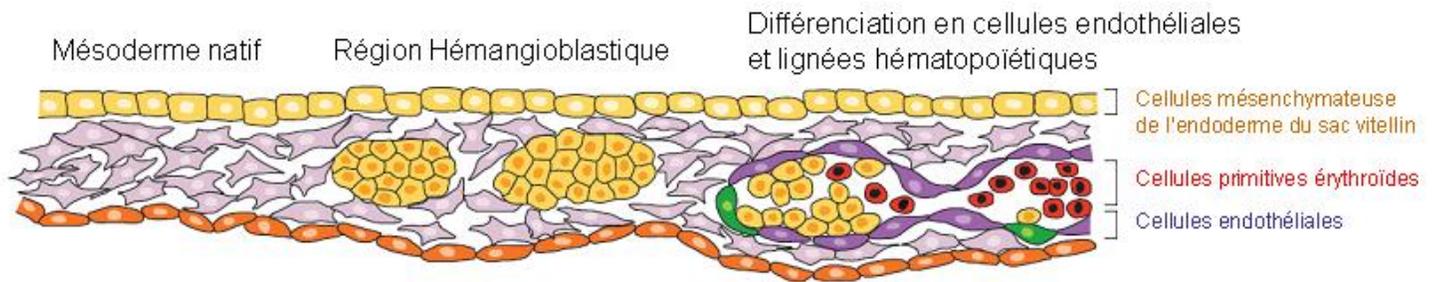


Figure 2 : Formation des îlots sanguins: du mésoderme à la circulation sanguine primitive
(Adapté de la revue : « *Ontogeny of the Hematopoietic System* » Cumano et al., 2007 *Annu Rev Immunol*)

Ces cellules vont migrer au travers de l'embryon et distribuer oxygène et nutriments dans les tissus en développement et ce grâce au réseau sanguin qui s'établit à la même période. Le phénotype et le développement spatio-temporel très proche de ces deux systèmes ont conduit à l'hypothèse d'une cellule commune aux lignées hématopoïétiques et endothéliales. En 2005,

Park. a mis en évidence l'existence d'un précurseur bipotent dérivant du mésoderme et capable d'engendrer cellules hématopoïétiques et cellules endothéliales, appelé «hémangioblaste»⁶.

b) La région aorto-gonado-mésonephrotique

La splanchnopleure para-aortique (PAS) d'origine mésodermique (*figure 3*) se développe à 7 dpc pour se modifier en région aorto-gonado-mésonephrotique à 9 dpc⁵.

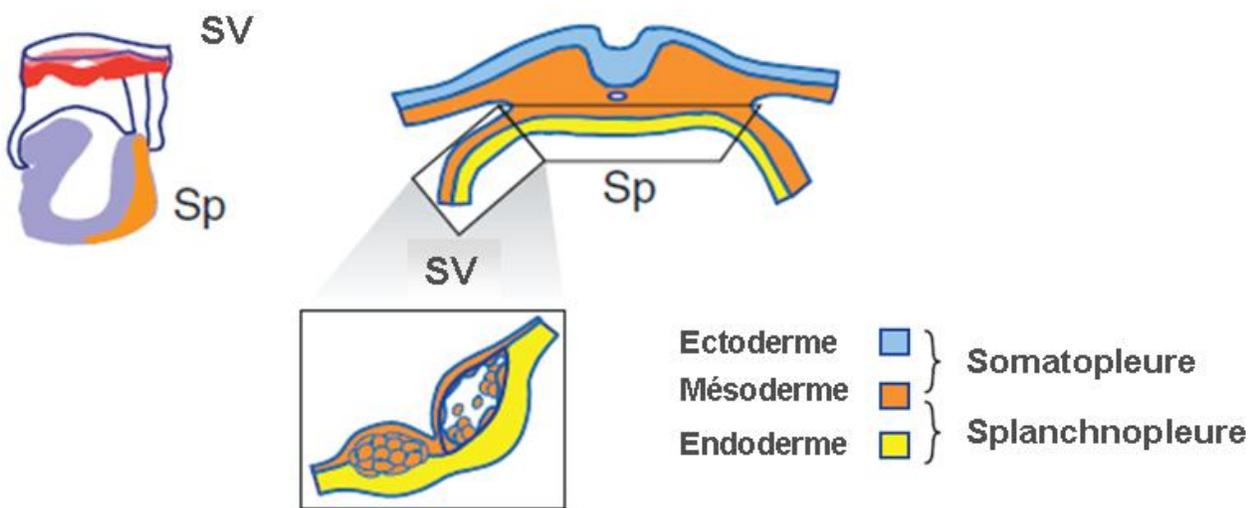


Figure 3 : Sites hémogéniques au cours du développement embryonnaire murin

SV représente l'emplacement du sac vitellin et SP celui de la Splanchnopleure, avant la mise en place du système vasculaire (8dpc). (*extrait de la revue : « Ontogeny of the Hematopoietic System » Cumano et al., 2007 Annu Rev Immunol*)

Contrairement au sac vitellin, ces deux régions (PAS et AGM) sont capables de générer des précurseurs multipotents des lignées lymphoïdes, myéloïdes et érythroïdes, cellules qui seront à l'origine de l'hématopoïèse définitive. A 11 dpc, les CSH générées *de novo* dans la région AGM sont libérées dans la circulation sanguine et colonisent les organes hématopoïétiques.

c) Le foie fœtal

Le foie fœtal va servir de site hémogénique intermédiaire entre les régions hématopoïétiques primitives (SV, AGM) et définitives (MO, rate). Il n'en demeure pas moins le site majeur d'expansion et de différenciation des CSH durant la vie fœtale, sans pour autant être capable de générer ses propres CSH. Celles-ci proviennent à 10 dpc du sac vitellin via les veines vitellines et à 11 dpc de la région AGM et du placenta, via la veine ombilicale. Ces connexions vasculaires permettent au foie fœtal de produire des érythrocytes énucléés ainsi que des cellules myéloïdes et des lymphocytes nécessaires au développement du fœtus. Durant la gestation, le foie fœtal permet de constituer un stock important de CSH qui va décroître de 15 dpc jusqu'à la naissance, au profit des ébauches osseuses (site définitif de l'hématopoïèse). Cette migration coïncide avec la maturation des hépatocytes et la mise en place des fonctions du foie adulte.

d) Le placenta

Une niche hématopoïétique a été identifiée dans le placenta à 11 dpc, constituant un réservoir de cellules capables de reconstituer la moelle osseuse d'une souris après myélo-ablation^{7,8}. Les cellules présentes dans cette niche affichent un phénotype proche de celles du foie fœtal et des CSH en circulation. Il semble que ce tissu d'origine extra-embryonnaire ait la capacité de générer ses propres CSH et qu'elles ne soient donc pas simplement piégées à partir des CSH circulantes.

e) La moelle osseuse

La moelle osseuse et la rate sont les organes hématopoïétiques principaux chez l'adulte. En fin de gestation, ils offrent un environnement propice au maintien et à l'autorenouvellement des CSH et accueillent le stock de CSH du foie fœtal. L'os (la MO), siège de l'hématopoïèse, va permettre aux CSH de produire l'ensemble des lignées hématopoïétiques (lignées érythroïde, myéloïde et lymphoïde) nécessaires durant la vie d'un individu.

2) L'ontogénèse humaine

L'ontogénèse du système hématopoïétique chez l'humain est très proche du modèle de développement embryonnaire murin (*figure 4 et tableau 1*)⁹. A la naissance, seuls les os chez l'Homme accueillent l'hématopoïèse définitive pour, au cours de la croissance, se concentrer dans les os plats.

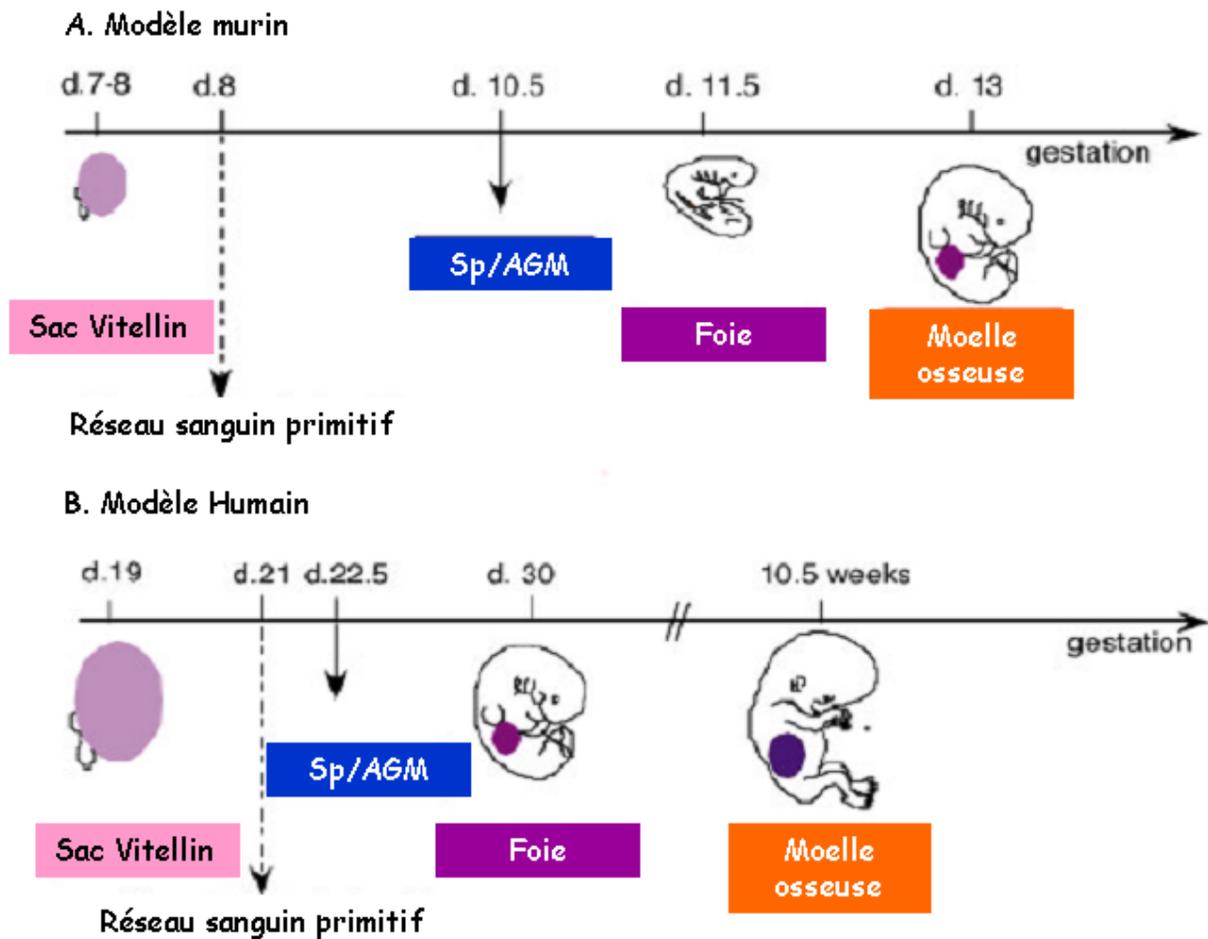


Figure 4 : Ontogénèse du système hématopoïétique dans les modèles murins (A) et humains (B)

Sp/AGM (Splanchnopleure/AGM) (adaptée de la revue : « Hematopoietic Stem Cells » Bonnet 2003 Birth Defects Res C Embryo Today)

Vertébrés	Site initial de production des HSC	Second Site de production des HSC	Site Hématopoïétique intermédiaires	Site Hématopoïétique définitifs
Souris	Sac Vitellin : production et différenciation	Région AGM : production, pas de différenciation, expansion ? Placenta: production ? différenciation ? expansion ?	Foie Foetal : maintien, différenciation et expansion des HSC	Thymus : différenciation des cellules T Rate : différenciation des cellules B BM : maintien et différenciation des HSC
Humain	Sac Vitellin : production et différenciation	Région AGM : production, pas de différenciation, expansion ?	Foie Foetal : maintien, différenciation et expansion des HSC	Thymus : différenciation des cellules T Rate : différenciation des cellules B BM : maintien et différenciation des HSC

Tableau 1: Localisations et fonctions des différents sites hématopoïétiques de l’embryon à l’adulte

(Adapté de la revue : « *Ontogeny of the Hematopoietic System* » Cumano et al., 2007 *Annu Rev Immunol*)

Si l’ontogenèse du système hématopoïétique est aujourd’hui bien décrite, il demeure de nombreuses questions sans réponse : les précurseurs hématopoïétiques sont-ils identiques entre les régions intra- et extra-embryonnaires ? Leurs potentiels d’autorenouvellement sont-ils similaires ? Le foie foetal est-il le seul organe à 11 dpc à pouvoir générer des précurseurs des lignées myéloïdes et lymphoïdes ?⁵

II. LES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES (CSH)

A. LES CSH ADULTES

L'essence même d'une cellule souche est définie par sa capacité à s'autorenouveler et/ou à se différencier. L'autorenouvellement des cellules souches est étroitement lié à leur positionnement dans le cycle cellulaire. Environ 15% des cellules souches sont dites en quiescence, ce qui correspond à un état non cyclé ou de cycle ralenti¹⁰⁻¹². Cette population de cellules (environ 1 division tous les 5 mois) possède une capacité de repopulation de la moelle osseuse supérieure aux 85% de cellules souches en division (environ 1 division par mois) qui perdent leur capacité de repopulation lors de greffes successives. Le réservoir de cellules souches, dites dormantes, ainsi constitué (dans la moelle osseuse chez l'adulte) permet à l'organisme de faire face à des situations de stress telles qu'une déplétion partielle de la moelle osseuse induite par des agents chimio-thérapeutiques¹², où les cellules dormantes pourront basculer dans un mode « actif » capable de restaurer une hématopoïèse fonctionnelle. Conserver des cellules souches dans un état dormant permet également de limiter la production de radicaux libres oxygénés (ROS) capables d'entraîner, lorsqu'ils sont présents en grand nombre dans la cellule, des dommages de l'ADN¹³. De même, limiter le nombre de divisions contribue à restreindre les phénomènes d'instabilité génique. La différenciation des CSH dans les différentes lignées hématopoïétiques est également tributaire de l'engagement des cellules souches dans le cycle cellulaire et fait appel à un modèle de division symétrique/asymétrique (*figure 5*). L'autorenouvellement peut intégrer les deux types de division, une division symétrique qui donnera deux cellules filles possédant les mêmes caractéristiques que la cellule mère, ou bien une division asymétrique qui engendrera une cellule fille capable d'autorenouvellement et une cellule fille engagée dans un processus de différenciation¹⁴. Le modèle de différenciation cellulaire présente également les deux modes de division.

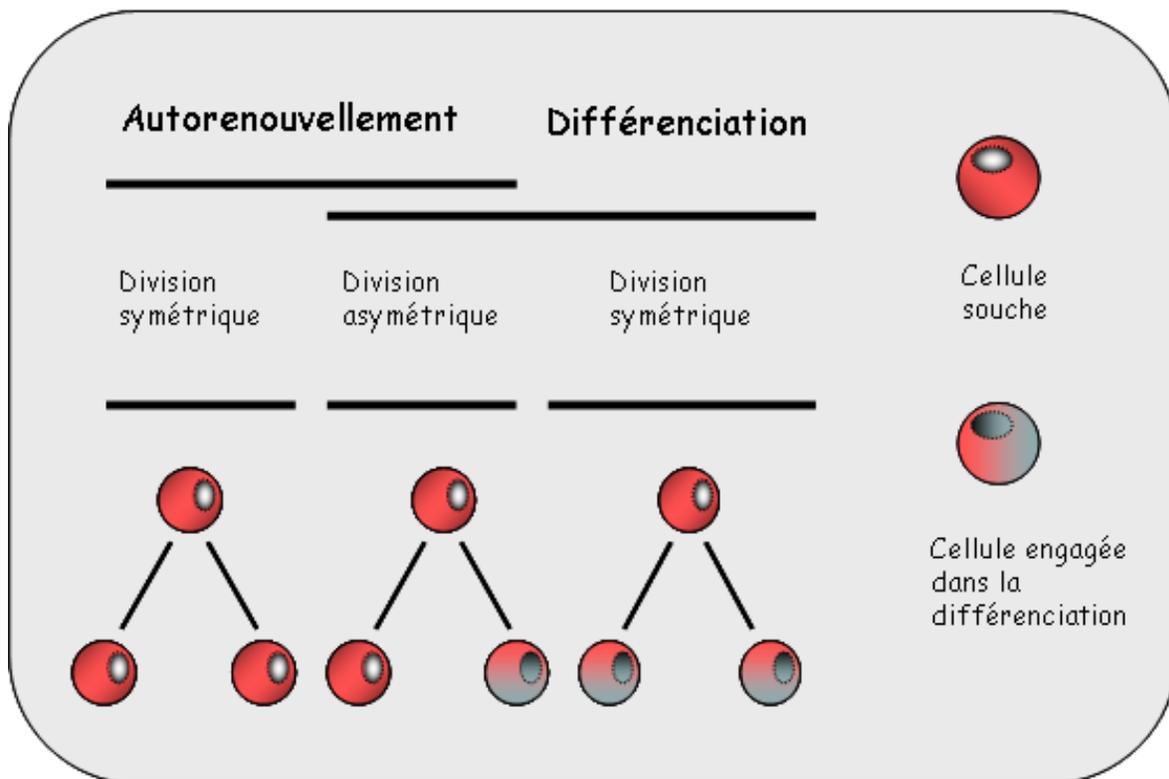


Figure 5 : Représentation schématique des divisions symétrique/asymétrique

L'autorenouvellement et l'augmentation du réservoir de CSH sont réalisés par une division symétrique. Une division asymétrique, permet la conservation d'une cellule souche et la différenciation de l'autre cellule fille. La division symétrique en deux cellules filles différenciées diminue le stock de CSH.

La différenciation en progéniteurs est gouvernée par des signaux faisant intervenir des facteurs extrinsèques et intrinsèques.

L'emploi de modèle murin knockout (KO) et knockin (KI) a permis de révéler les fonctions de nombreux facteurs de transcription impliqués dans l'autorenouvellement, le maintien et la différenciation des CSH.

1) Facteurs clefs de l'autorenouvellement et de la différenciation des CSH

Le contrôle du cycle cellulaire est un enjeu majeur de l'autorenouvellement et de la différenciation des CSH.

Le cycle cellulaire (*figure 6*) chez les mammifères est régulé par l'activation séquentielle de cyclin-dépendent kinases (CDK4/6, CDK2 et CDK1) qui se lient aux cyclines (D, E, A, B) et permettent de franchir les différentes phases du cycle (G0, G1, S : synthèse, G2 et M : mitose). Les transitions entre les phases du cycle cellulaire sont sous le contrôle de points de contrôle ou « *checkpoints* » intrinsèques (G1/S et G2/M) et de signaux extrinsèques tel que le point R (restriction). Le point R est un point de « non retour », à partir duquel les cellules n'auront plus besoin de signaux mitogéniques pour se diviser, ce passage correspond à l'inactivation par hyperphosphorylation de la protéine suppresseur de tumeur Rb (protéine du rétinoblastome suppresseur de tumeur). En plus des *checkpoints* et du point R, les CDK sont contrôlées par des inhibiteurs (CDKI), dont il existe deux grandes familles : les protéines INK4 (p16INK4A, p15INK4B, p18INK4C et p19INK4D) et les protéines Cip/Kip (p21Cip1/Waf1, p27Kip1 et p57Kip2). Ainsi, sous l'influence de signaux mitogéniques la cycline D est traduite puis interagit avec les CDK4/6 qui induisent la phosphorylation de Rb et permettent l'initiation du cycle cellulaire. Des CDKI comme p21Cip1/Waf1 inhibent CDK2 et CDK1, alors que p18INK4C est capable d'inhiber CDK4/6 en entrant en compétition avec la cycline D.

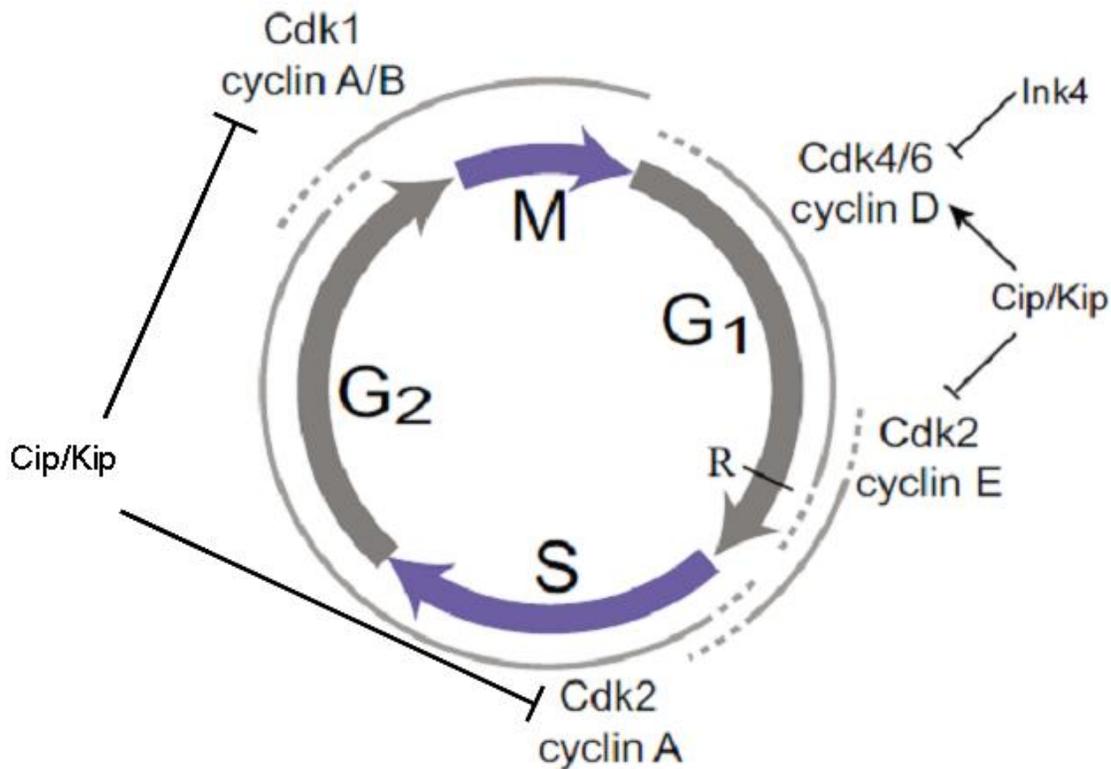


Figure 6 : Présentation des 4 phases du cycle cellulaire, des principales cyclines, leurs kinases et leurs inhibiteurs

La phase G1 prépare la cellule à la duplication de l'ADN. La transition de la phase G1 à la phase S est sous le contrôle du point de restriction (R). La synthèse de l'ADN est réalisée pendant la phase S et la phase G2 prépare la cellule à la mitose. Les cyclines vont s'exprimer de manière séquentielle et leur liaison aux CDK active les protéines nécessaires à la progression du cycle cellulaire. Les CDKI régulent les différentes phases du cycle cellulaire par activation ou répression des complexes CDK/cyclines.

Aussi, il est important d'étudier les protéines et facteurs de transcription (FT) qui régulent ce cycle cellulaire, notamment pour comprendre les mécanismes impliqués dans l'autorenouvellement et la quiescence des CSH. Les souris KO pour les FT ont permis de mieux caractériser leur rôle dans le maintien des CSH.

a) Régulation intrinsèque de l'autorenouvellement des CSH

La surexpression d'un facteur de transcription inhibant le cycle cellulaire empêchera les CSH de se différencier et le renouvellement quotidien des cellules matures circulant dans le sang. A l'inverse, son inhibition aura pour effet d'épuiser le stock de CSH en quiescence par une différenciation cellulaire trop importante.

L'ensemble des facteurs et des voies de signalisation qui régule les CSH et leur environnement est également influencé par ce même environnement et notamment par les faibles concentrations en oxygène (hypoxie). Ces faibles concentrations en oxygène activent les facteurs de transcription HIF (*hypoxia inducible factor*) qui sont les principaux médiateurs du signal hypoxique. Le thème central de cette thèse repose sur le rôle des facteurs HIF dans le maintien des CSH humaines. Aussi, dans le chapitre qui va suivre je vous présenterai les facteurs clefs du maintien des CSH et préalablement leur interaction possible avec l'oxygène et les facteurs HIF (*tableau 2*).

i. Relations entre les facteurs clefs de l'homéostasie des CSH et l'oxygène, dont les principaux effecteurs sont les facteurs HIF

Facteurs clefs de l'autorenouvellement et de la quiescence des CSH	Rôle de l'Oxygène	Liens avec HIF	Références
p21		HIF-1 α active p21 HIF-2 α inhibe p21	Gordan et al. ¹⁵
p18	L'hypoxie augmente l'expression de p18		Yu et al. ¹⁶
p16		p16 piège HIF-1 α	Zhang et al. ¹⁷
RUNX1/AML1		RUNX1 piège HIF-1 α	Peng et al. ¹⁸
Pten		Pten bloque la voie PI3K/AKT qui active HIF	Jiang et al. ¹⁹
FoxO		HIF-1 α active Foxo3a	Lekli et al. ²⁰
SCL/Tal1	L'hypoxie augmente le turnover de Tal1		Tang et al. ²¹
Gènes Hox		Meis1 stabilise HIF-1 α	Simsek et al. ²²
CCN3		HIF-1 α active CCN3	Wolf et al. ²³
Cited2		HIF-2 α active Cited2 Cited2 inhibe HIF-1 α	Freedman et al. ²⁴ Aprelikova et al. ²⁵
JunB	L'hypoxie augmente l'expression de JunB		Schmidt et al. ²⁶
HLF		HLF active HIF-1 α	Otto et al. ²⁷

Facteurs clefs de l'autorenouvellement et de la quiescence des CSH	Rôle de l'Oxygène	Liens avec HIF	Références
Liens potentiels entre les facteurs HIF et les facteurs de l'hématopoïèse			
TEL/ETV6		Appartient à la famille des gènes Ets qui régulent HIF-2 α	Aprelikova et al. ²⁵
GATA2		Compétition pour la régulation de l'EPO	
Evi-1	Evi-1 régule les ROS		Oka et al. ²⁸
Bmi-1		HIF-2 α active Cited2 qui régule Bmi-1	Kranc et al. ²⁹
Mef (ELF4)		Appartient à la famille des gènes Ets qui régulent HIF-2 α	Lacorazza et al. ³⁰
Gfi-1		HIF régule p53 qui régule Gfi-1	Liu et al. ³¹

Tableau 2 : Présentation des 4 phases du cycle cellulaire, des principales cyclines, leurs kinases et leurs inhibiteurs

ii. Les principaux facteurs clefs de l'homéostasie des CSH et leur rôle dans l'autorenouvellement et la quiescence des CSH

Les **principaux facteurs intrinsèques** sont :

- **p21** :

La protéine p21 fut l'une des premières protéines à être identifiée comme un facteur régulant la quiescence des CSH. p21 est un inhibiteur des CDK transactivée par le FT suppresseur de tumeur : p53. Les KO de souris p21^{-/-} montrent un nombre accru de CSH avec une forte capacité proliférative³². L'augmentation de CSH en cycle qui en découle se fait aux dépens du pool de cellules en quiescence conduisant à un appauvrissement des réserves de cellules souches. Des greffes en série vont épuiser le compartiment de CSH et conduire à la mort des animaux par un défaut de reconstruction hématopoïétique.

- **p18 :**

Comme pour les souris p21^{-/-}, les animaux p18^{-/-} présentent une augmentation de la prolifération des CSH, toutefois le KO de p18 n'entraîne pas d'appauvrissement du pool de CSH en quiescence^{33,34} et les greffes en séries sont équivalentes à celles pratiquées sur les animaux sauvages (WT : wild type). Yuan³⁴ suggère que p21 et p18 contrôlent le cycle cellulaire de manières différentes, p18 intervenant de façon précoce dans la phase G1 et p21 de façon tardive, cette différence de positionnement au niveau du cycle pourrait expliquer les différents effets observés sur l'évolution du stock de CSH.

- **p16 :**

La protéine p16 est un facteur important dans la régulation de la sénescence (sortie définitive du cycle cellulaire). Dans le modèle hématopoïétique, son expression augmente avec l'âge des animaux, mais peut également être induite en cas de stress³⁵ (transplantation de moelle osseuse, augmentation des espèces oxygénées) chez les jeunes animaux. Le phénotype des CSH pour les animaux KO va être différent entre animaux jeunes et âgés. Lors de transplantations sériées les jeunes p16^{-/-} vont perdre leur capacité de reconstruction hématopoïétique plus rapidement que les jeunes animaux WT, alors que dans la même expérience sur des animaux âgés, le nombre de CSH et leur prolifération sont accrus. D'après Orford et Scadden³⁶ p16 permettrait de maintenir un équilibre entre les besoins d'un organisme d'avoir une population de CSH à long terme et la transformation de ces mêmes cellules en cellules cancéreuses. En résumé, chez l'animal adulte p16 limite les transformations en bloquant la prolifération et le nombre de CSH et chez l'animal jeune p16 protège le pool de CSH à long terme.

- **Gfi-1 :**

Gfi-1 (*Growth factor independant 1*) est un répresseur en doigt de zinc ou « *zinc-finger* » connu pour son effet oncogénique dans les cellules lymphoïdes qui, de façon inattendue dans les CSH, réprime la prolifération. La prolifération des CSH augmente dans les souris Gfi-1^{-/-} et des tests de transplantation compétitive montrent un défaut dans le rétablissement du système hématopoïétique³⁷. De plus, Hock a constaté une diminution de l'expression de p21 dans les CSH Gfi-1^{-/-}, plaçant Gfi-1 en amont de la régulation dépendante de p21(Hock et al .,³⁷). Il semblerait

donc que Gfi-1 joue un rôle important dans l'autorenouvellement et la greffe à long terme des CSH en régulant l'expression de p21³⁸.

- **Pten :**

Pten (*Phosphatase and tension homolog deleted on chromosome ten*) est un régulateur négatif de la voie de signalisation PI3K/AKT (prolifération, différenciation, migration) et fait partie des gènes dits suppresseurs de tumeur, gènes qui sont très souvent retrouvés mutés dans les cancers. La délétion de Pten dans les CSH induit une prolifération à court terme et une diminution du pool de CSH à long terme. Les greffes de CSH Pten^{-/-} échouent dans le rétablissement de l'hématopoïèse après transplantation³⁹, mais paradoxalement ces greffes peuvent être à l'origine de syndromes myéloprolifératifs (SMP).

- **FoxO :**

La famille des protéines Forkhead box (Fox) regroupe un nombre important de facteurs de transcription dont les fonctions biologiques sont impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire, la résistance au stress oxydatif et l'apoptose. La sous-famille des FoxO (Foxo1, 3a, 4) est une cible de la voie PI3K/AKT, ces protéines sont largement exprimées dans la plupart des tissus humains, dont le tissu hématopoïétique. Les délétions individuelles des Foxo dans les CSH n'induisent pas de phénotype particulier des cellules⁴⁰. Cependant, le triple KO Foxo1/3a/4 induit une augmentation de l'apoptose et du nombre de CSH en cycle, suivi d'un défaut de repopulation à long terme⁴¹. Les CSH des souris Foxo^{-/-} ont un taux élevé de ROS par rapport aux souris WT. Cette élévation peut être corrélée au changement de profil de gènes régulant les ROS tels que la manganèse superoxyde dismutase (MnSOD) et la catalase. Or, une concentration élevée de ROS est ressentie comme un stress (stress oxydatif) capable d'induire l'apoptose et de remettre des cellules en cycle en les faisant quitter leur état quiescent. Kops et ses collaborateurs ont montré que Foxo3a protège les cellules en quiescence du stress oxydatif⁴², l'ajout d'un antioxydant le N-acétyl-L-cystéine (NAC) à des animaux Foxo^{-/-} permet de rétablir un phénotype sauvage⁴¹. Les protéines Foxo, en jouant un rôle essentiel dans la protection contre le stress oxydatif, participent à la quiescence et à la survie des CSH.

- **SCL/Tal1** :

La protéine *Stem Cell Leukemia* (SCL/Tal-1) appartient à la famille des facteurs de transcription *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH) qui s'hétérodimérisent avec des protéines E telles que E2A pour transactiver ses gènes cibles. L'absence de Tal-1 dans les embryons induit un défaut dans la mise en place du système hématopoïétique primitif⁴³ et son inhibition chez l'adulte provoque un défaut dans tous les lignages hématopoïétiques⁴⁴. Cependant, il semblerait que Tal-1 ne soit pas indispensable au maintien des fonctions des CSH dans la moelle osseuse⁴⁵ (greffe à long terme et pouvoir clonogénique). Toutefois, il est nécessaire aux voies de différenciations érythroblastiques et mégacaryocytaires. Des expériences de knockdown (KD) ou de surexpression de Tal-1^{46,47} dans les cellules CD34 humaines montrent que Tal-1 est nécessaire à l'autorenouvellement des CSH adultes et qu'il participe à la régulation de l'hématopoïèse de la cellule souche aux progéniteurs érythro-myéloïdes.

- **GATA2** :

GATA-2 est un facteur de transcription de la famille GATA dont les 6 membres possèdent tous 2 domaines en doigt de zinc qui permettent respectivement la fixation à l'ADN et la stabilisation du complexe ainsi formé. GATA-2 est exprimé dans les CSH et en combinaison avec un marqueur spécifique des CSH murines, Sca, il permet d'isoler et de marquer les CSH dans leur niche osseuse⁴⁸. Les souris GATA-2^{-/-} meurent *in utero*, suite à un défaut de l'hématopoïèse et notamment du maintien des CSH⁴⁹. Cependant, l'effet de GATA-2 sur le maintien des CSH dans l'hématopoïèse chez l'adulte reste mal défini. De nombreuses études ont utilisé une protéine chimérique (GATA-2/ER) pour déterminer les fonctions de GATA-2 au sein des CSH et montré que GATA-2 diminue le nombre de CSH mais aussi le nombre de CSH en cycle et de cellules engagées^{50,51}.

Une étude récente réalisée dans le laboratoire du Dr T.Envers⁵² apporte de nouveaux indices sur le rôle de GATA-2 en montrant que la surexpression de ce FT inhibe les fonctions des CSH et des progéniteurs humains par un effet direct sur le cycle cellulaire : GATA-2 apparaît comme un régulateur positif de la quiescence des CSH.

- **RUNX1/AML1 :**

RUNX1/AML-1 a été mis en évidence dans les leucémies myéloïdes aiguës (LAM). Sa liaison au facteur CBF β (*Core Binding Factor β*) permet sa fixation à l'ADN et l'activation ou la répression de ses gènes cibles. RUNX1 est nécessaire à la genèse du système hématopoïétique chez l'embryon. La souris RUNX1^{-/-} meurt *in utero* à 12,5 dpc par hémorragie au niveau du système nerveux central et par absence totale d'hématopoïèse dans le foie fœtal. De façon surprenante, l'érythropoïèse primitive ne semble pas être affectée^{53,54}. Les résultats sur l'hématopoïèse adulte quant à eux, sont longtemps restés controversés : le KO conditionnel de RUNX1 ne semble pas affecter les fonctions des CSH mais seulement la maturation mégacaryocytaire et la différenciation lymphoïde⁵⁵. La même équipe a ensuite montré que la délétion de RUNX1 dans des CSH adulte provoque une accumulation des cellules en phase G0 et une augmentation des capacités de transplantation⁵⁶. De nouveaux travaux ont montré que certaines isoformes de AML1, telle que AML1a, peuvent agir comme des dominants négatifs de RUNX1 et ont confirmé l'idée que l'absence de RUNX1 augmente la quiescence et l'activité des CSH⁵⁷. Ainsi RUNX1/AML1 est un régulateur négatif de la quiescence des CSH.

- **Evi-1 :**

Evi-1 (*ectopic viral integration site-1*) est un facteur de transcription qui, lorsqu'il est surexprimé, est un marqueur de mauvais pronostic dans les leucémies. Il fait partie de la famille des protéines SET/PR et contient dix domaines en doigt de zinc avec, pour chacun, une spécificité de fixation⁵⁸. La plupart des souris Evi-1^{-/-} meurent entre 13,5 et 16,5 dpc avec des troubles de l'hématopoïèse importants⁵⁹. Pour étudier l'hématopoïèse adulte des souris, un KO conditionnel a été généré. Les souris présentent une diminution du nombre de CSH et les cellules Evi-1^{-/-} sont désavantagées par rapport à celles ayant conservé le phénotype WT⁵⁹. De plus, les cellules Evi-1^{+/-} ont un phénotype intermédiaire et la surexpression conduit à l'augmentation des capacités d'autorenouvellement des CSH (*figure 7*).

Activité des CSH

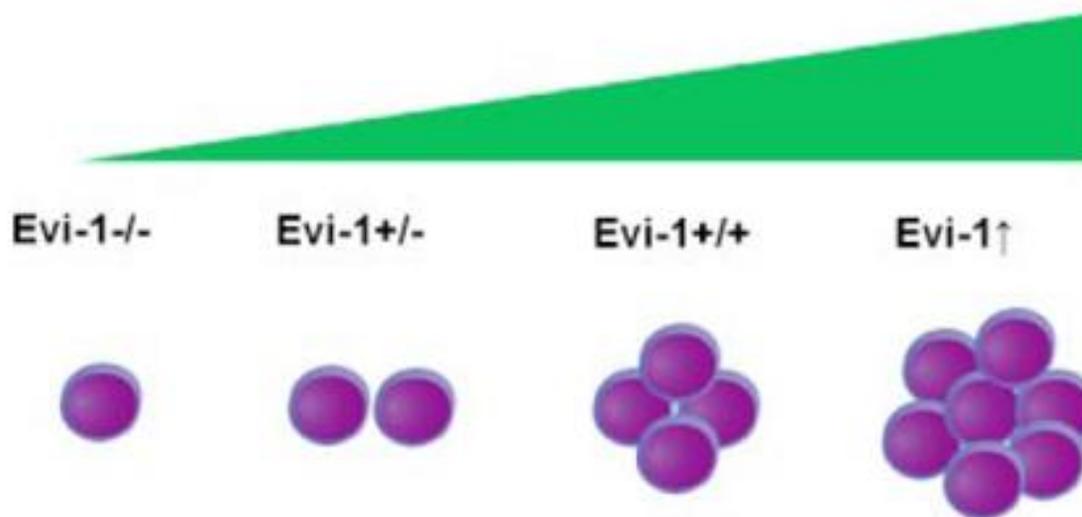


Figure 7 : Evi-1 régule la prolifération et le maintien des HSC de manière dose-dépendante
(Kumano and Kurokawa *J. Cell Physiol.* 222: 282-285,2010. *The role of Runx1/AML1 and Evi-1 in the regulation of hematopoietic stem cells*)

- **JunB** :

JunB est un facteur de transcription de la superfamille des protéines bZIP qui participe à la formation du facteur de transcription AP-1 (*Activator Protein-1*) et régule la myélopoïèse. Il agit sur le cycle cellulaire en activant p16 et en réprimant la cycline D1 et régule l'apoptose en bloquant l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-XL⁶⁰. Son inactivation post-natale chez la souris entraîne le développement de syndrome myéloprolifératif proche du modèle de la leucémie myéloïde chronique (LMC) avec une amplification du nombre de CSH à long terme (LT-CSH) et des progéniteurs granulo-macrophagocytaires. A l'inverse, sa surexpression diminue le nombre de LT-CSH⁶⁰. JunB est un régulateur positif de la quiescence des CSH (*figure 8*).

Hématopoïèse normale

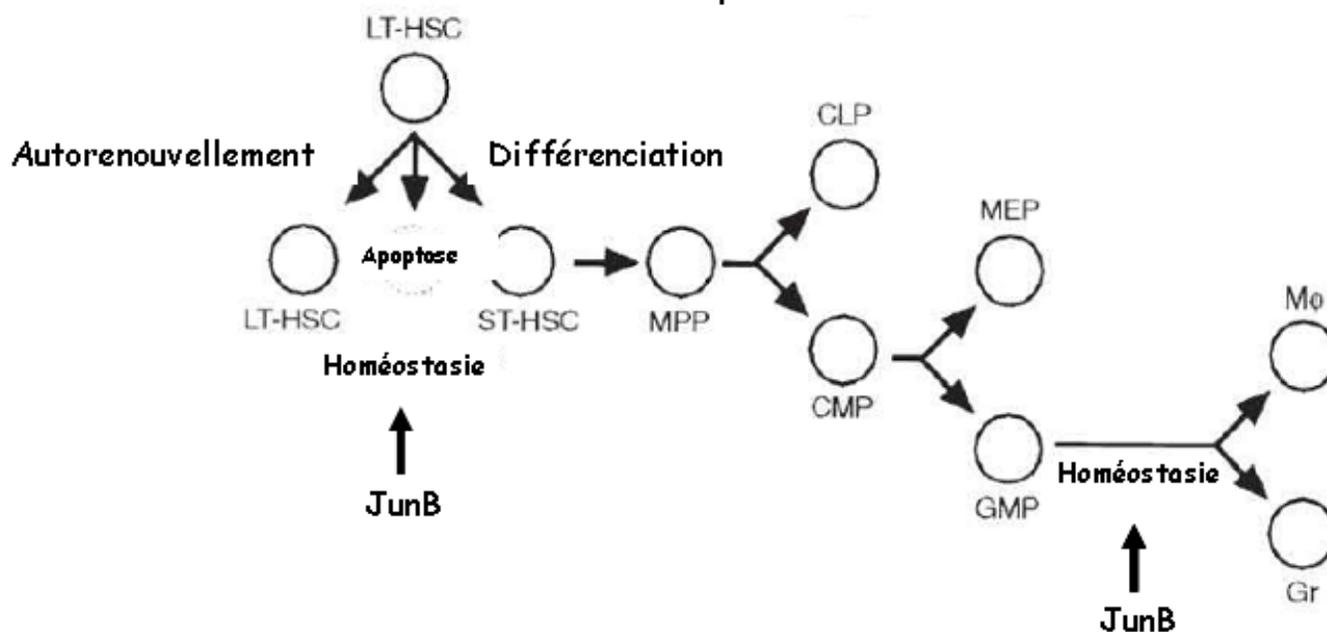


Figure 8 : Régulation du compartiment des CSH par JunB

JunB est nécessaire à l'homéostasie de la myélopoïèse (*adaptée de Passegué et al., Cell Vol. 119, 431-443, October 29, 2004 JunB Deficiency Leads to a Myeloproliferative Disorder Arising from Hematopoietic Stem Cells*)

- Zfx :

Zfx est une protéine « à doigt de zinc » de la famille des Zfy dont les membres sont très conservés chez les vertébrés. Zfx est fortement exprimé dans les différents types de cellules souches et occupe un rôle important dans le maintien des cellules souches embryonnaires (ES) et des CSH. Le KO conditionnel de Zfx induit un défaut dans le maintien des CSH et dans la repopulation à long terme sans affecter le lignage érythro-myéloïde⁶¹. Les CSH déficientes pour le gène Zfx résident toujours dans la niche, mais on observe une augmentation de l'apoptose et des gènes impliqués dans le stress. Zfx contrôle l'autorenouvellement des CSH (et des ES), la différenciation lymphoïde mais pas la différenciation érythroïde.

- TEL/ETV6 :

TEL/ETV6 (*Translocation Ets Leukemia/Ets variant gene 6*) appartient à la famille des facteurs de transcription Ets. Le KO conditionnel de TEL/ETV6 induit la perte des CSH sans

altérer à court terme l'hématopoïèse générée par les progéniteurs⁶². Les mécanismes par lesquels TEL/ETV6 contrôle l'autorenouveaulement des CSH sont toujours inconnus.

- **HLF** :

HLF (*Hepatic Leukemia Factor*) a été identifié à partir d'une analyse bioinformatique qui prédit le rôle de facteur de transcription dans l'hématopoïèse adulte à partir de leur fonction dans l'hématopoïèse primitive⁶³. La surexpression de HLF dans les CSH provoque une augmentation importante de ces dernières ainsi qu'une amélioration de leur capacité de reconstitution hématopoïétique⁶⁴. Il semblerait que la surexpression de HLF protège les CSH de l'apoptose par l'induction du facteur anti-apoptotique Bcl-2 sans modifier le cycle cellulaire.

- **CCN3 (NOV)** :

CCN3/NOV (*Nephroblastoma overexpressed*) appartient à la famille des protéines CCN (Cyr61, CTGF, Nov) qui sont connues pour réguler la prolifération cellulaire, l'adhésion, la migration, la différenciation, l'apoptose et la production de matrice extracellulaire. Toutes les protéines CCN jouent un rôle en tant que protéines extracellulaires, protéines cytoplasmiques et protéines nucléaires, capables de réguler la transcription de gènes cibles en formant des complexes nucléaires⁶⁵. NOV est exprimée très fortement dans le compartiment des cellules primitives : les CSH et les progéniteurs multipotents⁶⁶. L'inhibition de NOV dans les CD34⁺ par un ARN interférent provoque la perte des capacités de greffe et d'autorenouveaulement des CSH. En l'absence de NOV, l'expression de Bmi-1, Gfi-1 et p21, trois gènes impliqués dans l'autorenouveaulement des CSH, est diminuée. De plus, l'inhibition de NOV entraîne une diminution de l'expression de HES1, un gène cible de la voie NOTCH qui joue un rôle important dans la régulation de l'hématopoïèse⁶⁷. La surexpression confirme ces résultats.

- **Cited2** :

Cited2 est un cofacteur de CBP/300 et a récemment été impliqué dans le maintien des CSH⁶⁸. Le KO conditionnel empêche la génération des CFC (*colony forming cells*), des CAFc (*cobblestone area-forming cells*) et la transplantation de CSH Cited2^{-/-} ne restaure pas le système hématopoïétique. L'absence de Cited2 entraîne une augmentation de l'expression de p16^{Ink4a}, et de Trp53. L'augmentation de p53 est un effet indirect de l'inhibition de Cited2, son inactivation

permet l'expression de p19^{Arf} qui va à son tour stabiliser p53. La voie de signalisation p19/p53 ainsi activée conduit à la perte des CSH⁶⁹.

Pour confirmer ces résultats, le laboratoire du Dr. T.Enver⁶⁸ a également généré des animaux délétés pour p16/p19/p53 qui, croisés avec les souris Cited2^{-/-}, ont permis de restaurer un phénotype WT. Cited2 est donc un régulateur essentiel des fonctions des CSH et cela via la régulation des facteurs de transcription p16^{Ink4a}, p19^{Arf} et Trp53.

- **Bmi-1 :**

Bmi-1 est un membre de la famille des gènes *polycomb group* (PcG) qui durant le développement embryonnaire régulent la répression des gènes par des réarrangements de la chromatine. Il fait partie du groupe PRC1 qui compte parmi ses membres Cbx, Mph, Ring et Me18. Bmi-1 est impliqué dans le maintien des CSH. Bien que les embryons de souris Bmi-1^{-/-} ne manifestent aucun défaut de l'hématopoïèse, les animaux adultes souffrent d'une profonde atteinte des capacités d'autorenouvellement des CSH. Les CSH Bmi-1^{-/-} ne sont pas capables de maintenir une hématopoïèse à long terme après greffe dans un animal conditionné et leur nombre décroît^{69,70}. A l'inverse, la surexpression de Bmi-1 dans des cellules CD34⁺ humaines permet l'autorenouvellement et le maintien à long terme des CSH et le nombre de colonies est augmenté en LTC-IC (*Long-term culture-initiating cells*) et CAFC. Par ailleurs, comme pour Cited2, la surexpression de Bmi-1 induit une diminution de l'expression de p16^{Ink4a} et p19^{Arf}. Il est intéressant de rappeler que Cited2 est nécessaire à l'expression de Bmi-1 dans les MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*)²⁹.

- **Mef (ELF4) :**

Aussi appelé ELF4, cette protéine est un membre de la famille des facteurs de transcription ETS qui régule la quiescence des CSH en favorisant leur entrée dans le cycle cellulaire³⁰. Dans les cellules hématopoïétiques, il transactive les gènes codant pour l'IL-8, la perforine, le GM-CSF et l'IL-3. Les CSH MEF^{-/-} se retrouvent majoritairement en phase G0 et ne prolifèrent pas en présence ou absence de cytokines. Les souris KO sont relativement résistantes aux déplétions de la moelle par chimio et radiothérapies.

- **La famille des gènes HOX :**

Les protéines Hox sont des facteurs de transcription connus pour leur rôle clef dans la régulation du développement (mise en place des axes antéropostérieurs chez l'animal) et de l'hématopoïèse. Chez les mammifères, il existe 39 gènes Hox organisés en quatre clusters (A à D) basés sur leur homologie de séquence et répartis sur quatre chromosomes différents (*figure 9*). L'analyse de la moelle osseuse murine a permis d'identifier les gènes Hox des clusters A, B et C comme préférentiellement exprimés dans les CSH⁷¹. De nombreux modèles de souris KO ou surexprimant les gènes Hox ont permis de confirmer leur rôle dans l'hématopoïèse, bien que les mécanismes contrôlant ces effets soient encore mal connus.

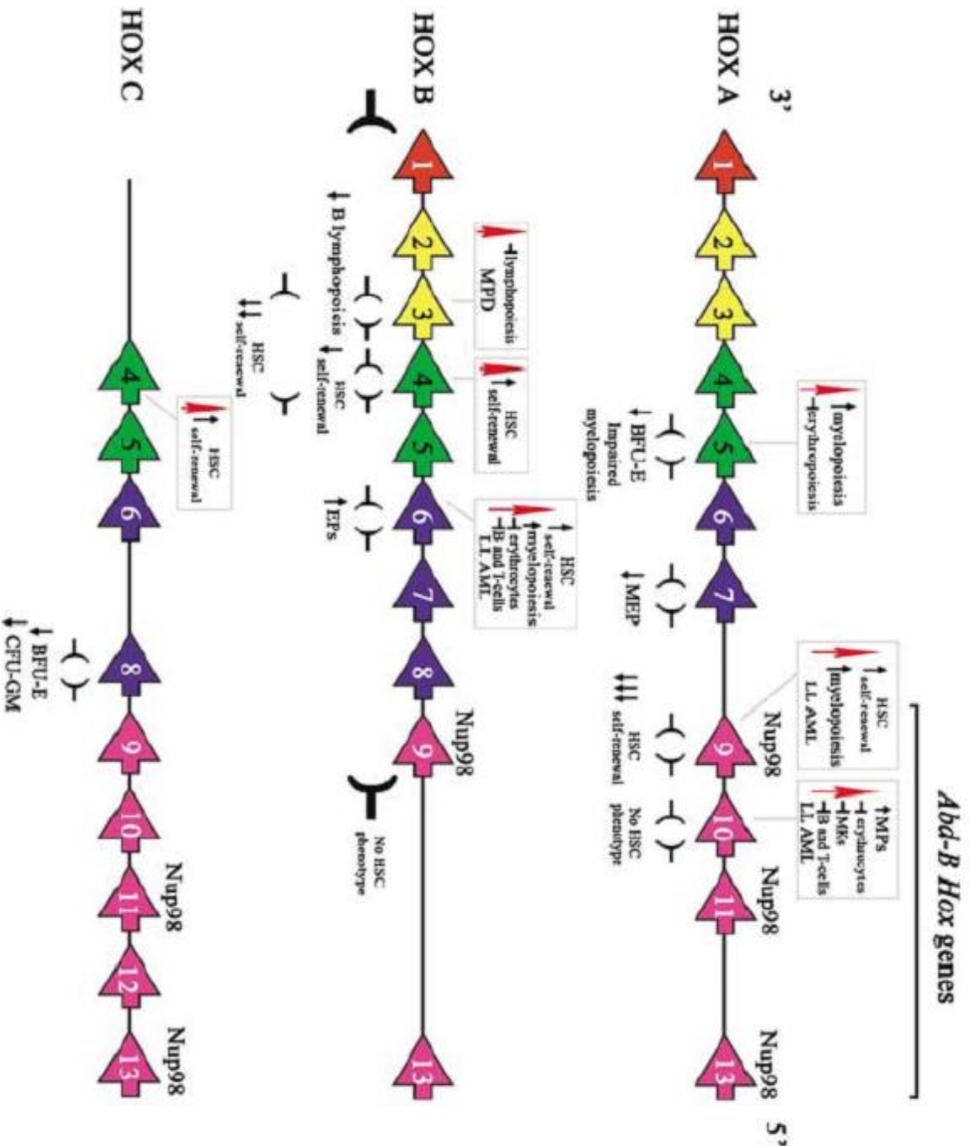


Figure 9 : Organisation des clusters des gènes Hox.

Les trois clusters comptent 8 à 11 gènes localisés sur 3 chromosomes différents. Chaque gène des clusters peut être aligné en fonction de son homologie de séquence. Les vignettes situées au-dessus des gènes résument les effets de la surexpression sur l'hématopoïèse et les parenthèses situées en dessous les effets de l'inactivation. BFLU-E (*Burst forming erythroid unit*), CFU-GM (*granulocyte/macrophage forming colony unit*), EPs (*progéniteurs érythroïdes et mégacaryocytiques*), LL AML (*long latency acute myeloid leukemia*), MEP (*progéniteurs érythroïdes et mégacaryocytiques*), MKs (*mégacaryocytes*), MPs (*progéniteurs myéloïdes*), MPD (*désordres myéloprolifératifs*). (Argiropoulos et al., *Oncogene* (2007) 26, 6766-6776 Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis)

Figure 9 : Organisation des clusters des gènes Hox

HOXA10 :

Hoxa10 est exprimé dans la plupart des cellules hématopoïétiques primitives. C'est un facteur critique dans la régulation du développement érythro-mégacaryocytaire et dans la prolifération des CSH et leur capacité de repopulation⁷². Cependant, une trop forte concentration de Hoxa10 n'a aucun effet sur le compartiment des CSH et bloque la différenciation érythro-mégacaryocytaire. De même, *in vitro* et *in vivo*, la surexpression de Hoxa10 induit un défaut de la lymphopoïèse⁷³. Les travaux de M. Magnusson montrent également que la surexpression de Hoxa10 altère l'expression de gènes tels que Gfi-1 et HLF (expression augmentée)⁷².

HOXA9 :

Comme Hoxa10, Hoxa9 est préférentiellement exprimé dans les cellules hématopoïétiques les plus primitives et son expression diminue avec la différenciation⁷⁴. Les souris KO pour Hoxa9 présentent un défaut général de l'hématopoïèse avec une réduction de la fréquence des CFC, une diminution de la prolifération des CSH avec une augmentation de l'apoptose et la perte des capacités de greffe en transplantation compétitive⁷⁵. Par ailleurs, sa surexpression *in vivo* permet la régénération des CSH et entraîne le développement de leucémies myéloïdes⁷⁶. Une des explications de ce phénotype réside dans le fait que Hoxa9 est sans doute le gène HOX le plus fortement exprimé dans les CSH et qu'il joue un rôle primordial dans l'autorenouvellement des CSH. De plus, Pim1, une kinase oncogénique qui inactive par phosphorylation le facteur pro-apoptotique BAD, est une cible de Hoxa9⁷⁷. L'expression de Pim1 dans des cellules Hoxa9 déficientes restaure partiellement les capacités de prolifération et diminue l'apoptose.

HOXB4 :

Hoxb4 fait partie des gènes Hox exprimés dans les cellules hématopoïétiques primitives⁷⁴. Sa surexpression ou l'addition directe de sa protéine est suffisante pour permettre l'expansion des CSH *in vivo* et *ex vivo* sans mener à un phénotype leucémique⁷⁸⁻⁸². A l'inverse, les souris déficientes pour Hoxb4 possèdent un nombre réduit de CSH et de progéniteurs et perdent partiellement leur capacité de repopulation compétitive⁸³. La différence d'effet entre la surexpression et l'inhibition est comparable à la régulation de Hoxa10, qui requiert une régulation très fine et des concentrations mesurées. La thrombopoïétine (Tpo), une des cytokines

clef de la régulation des CSH, est un élément activateur de la voie Hoxb4 : la liaison à son récepteur Mpl transduit un signal qui passe par la voie p38/MAPK et augmente l'expression de Hoxb4. La souris $Tpo^{-/-}$ montre une concentration de Hoxb4 2 à 5 fois inférieure à celle observée dans les animaux WT⁸⁴. Cette voie explique à la fois comment Hoxb4 pourrait être régulé mais aussi comment la Tpo influence le comportement des CSH. La voie Wnt est également impliquée dans la régulation des CSH en augmentant l'expression de Hoxb4 et Notch1⁸⁵. Les voies de signalisation extrinsèques Wnt, Notch, shh et TGFβ seront abordées dans la description des niches hématopoïétiques (cf. partie III- B du 1^{er} chapitre).

La régulation des facteurs de transcription que nous venons de décrire est étroitement liée à de grandes voies de signalisation (*figure 10*) qui sont activées en amont et/ou en aval de ces facteurs de transcription.

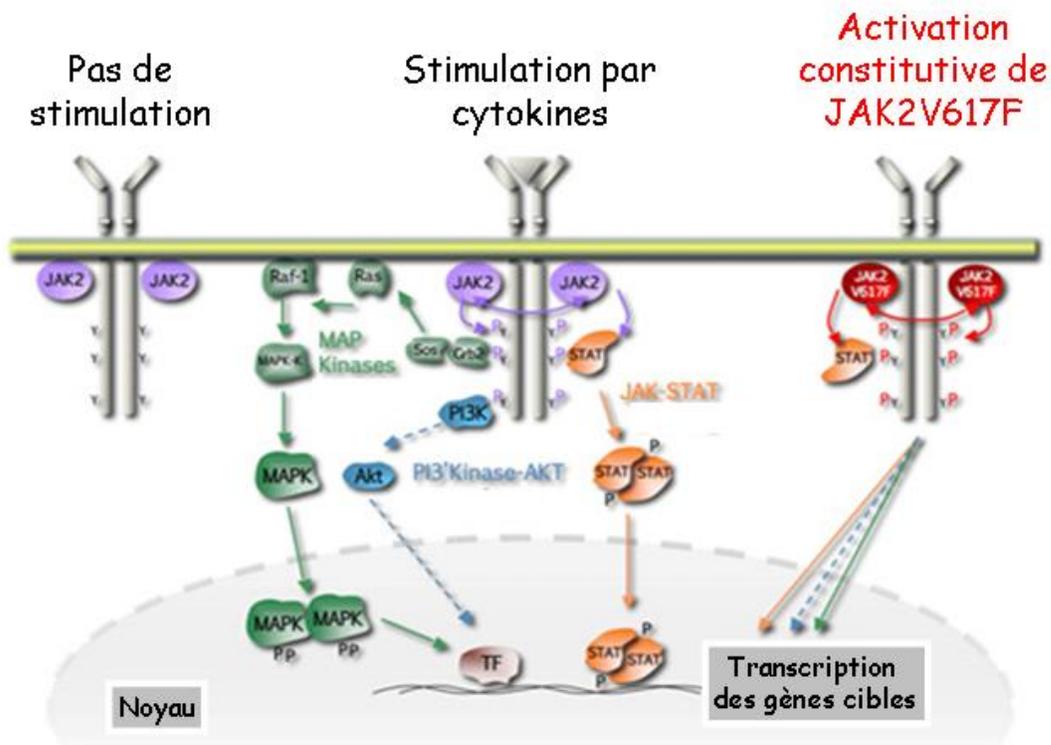


Figure 10 : Les voies de signalisation MAPK, PI3K/AKT, JAK/STAT

Constantinescu(2010)

http://www.deduveinstitute.be/signal_transduction_and_molecular_hematology.php

Deux des **voies de signalisation** récurrentes dans la transduction du signal intracellulaire sont les voies :

JAK/STAT :

L'activation de la voie JAK/STAT par des facteurs de croissance ou par des cytokines est impliquée dans de nombreux processus biologiques (prolifération, hématopoïèse et réponse immunitaire).

La kinase Janus (JAK) est une protéine tyrosine kinase qui compte quatre membres JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Les protéines JAK possèdent un domaine kinase en C-terminal (JH1) précédé d'un pseudodomaine kinase (JH2) dont l'activité catalytique est nulle mais qui joue un rôle critique dans les fonctions de régulation de la protéine. Ces protéines sont également constituées d'un domaine SH2 (*Src homology 2*) et d'un domaine N-terminal nécessaire à la liaison aux récepteurs des cytokines. L'activité kinase des JAK permet de recruter les facteurs STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) qui sont au nombre de 7 (STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b et 6). Les STAT phosphorylés dimérisent et transloquent dans le noyau où ils participent à la régulation de nombreux gènes⁸⁶. La dérégulation de la voie JAK/STAT est la source de nombreuses hémopathies. A l'origine de ces dérèglements on retrouve des translocations impliquant le domaine JH1 (TEL-JAK2⁸⁷, BCR-JAK2⁸⁸) et des mutations dans le domaine JH2 (JAK2^{V617F})⁸⁹ qui aboutissent à des leucémies aiguës et des syndromes myéloprolifératifs.

L'activation constitutive de STAT3 dans les CSH augmente leur capacité d'autorenouvellement dans les phases précoces de reconstruction hématopoïétiques⁹⁰. Quant à STAT5, fortement activé par la liaison de l'EPO et de l'IL-3 et en moindre mesure par la liaison de Flt3-L, lorsqu'il est surexprimé dans les cellules CD34⁺, va augmenter leur capacité de renouvellement, la myélopoïèse et la fréquence de colonies en LTC-IC et CAF⁹¹.

PI3K/AKT :

La liaison d'un ligand à son récepteur tyrosine kinase (RTK), les signaux d'attachement à la matrice extracellulaire, ou encore la signalisation de cytokines permettront le recrutement à la membrane de la PI3K (*Phosphatidylinositol 3-Kinase*). La PI3K phosphoryle le phosphatidylinositol en position 3D, entraînant le recrutement et la phosphorylation de la sérine thréonine kinase AKT

et de la PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*). AKT ainsi activée par phosphorylation transduit une multitude de signaux impliqués dans des processus tels que le métabolisme du glucose, la prolifération et la survie. Pten joue un rôle clef dans cette signalisation en régulant négativement la voie PI3K/AKT.

b) Régulation extrinsèque des CSH

La régulation extrinsèque des CSH rassemble un nombre important de paramètres environnementaux tels que la liaison aux récepteurs présents à la surface des CSH, avec des facteurs de croissance, des cytokines, ou encore l'interaction avec la matrice extracellulaire (ECM), le contact cellule/cellule du même type ou d'origines différentes : CSH/ostéoblastes cellules mésenchymateuses ou endothéliales par exemple. Ce système intégré va créer un environnement ou niche³, favorable à la régulation des fonctions des CSH : quiescence/prolifération et autorenouvellement/différenciation). L'ensemble de ces éléments est traité dans la partie III « Les Niches Hématopoïétiques » du 1^{er} chapitre.

Récemment, la transduction de seulement quatre facteurs de transcription a permis de générer, à partir de cellules somatiques, des cellules à la morphologie et au phénotype de cellules souches. Cette avancée permet de mieux comprendre les mécanismes de régulation des cellules souches, ainsi que d'envisager une nouvelle approche de la thérapie génique.

c) Les iPS (induced pluripotent stem cells)

Les cellules humaines iPS dérivent de cellules somatiques : fibroblastes dermiques⁹², kératinocytes cutanés⁹³, cellules souches neurales⁹⁴, cellules du sang⁹⁵⁻⁹⁷. Cette reprogrammation est possible grâce à l'introduction de quatre facteurs de transcriptions OCT3/4, SOX2, KLF4 et c-Myc. L'équipe de Thomson a montré que cette reprogrammation était également possible par l'utilisation d'un cocktail un peu différent, OCT3/4, SOX2, NANOG et LIN28, un protocole qui présente l'avantage de s'affranchir de c-Myc, un puissant oncogène⁹⁸. L'introduction de ces quatre facteurs de transcription, voire moins pour des cellules plus primitives^{94,95}, suffit à reprogrammer des cellules somatiques en cellules souches pluripotentes possédant toutes les

caractéristiques des cellules souches embryonnaires (ES). Les iPS possèdent une morphologie de cellules ES et en expriment les marqueurs de surface : elles sont capables de former des corps embryoides, elles ont une activité forte de la phosphatase alcaline et forment des tératomes lorsqu'elles sont injectées aux souris. Cette découverte offre de larges perspectives pour la thérapie génique et la médecine régénérative. En 2009, Raya et ses collègues ont obtenu la correction *in vitro* de cellules iPS dérivées de fibroblastes de patients atteints d'anémie de Fanconi⁹⁹. Cette équipe a réussi à générer des progéniteurs érythroïdes et myéloïdes sains à partir des cellules iPS corrigées issues de ces mêmes patients. Actuellement, cette approche thérapeutique comporte plusieurs dangers : d'une part liés à l'utilisation d'un oncogène puissant (c-Myc) et d'autre part liés aux risques d'intégrations provirales à proximité de promoteurs d'oncogènes pouvant ainsi engendrer la formation de tératomes lorsque les cellules ne sont pas correctement engagées ou triées. Le transfert direct de protéines permettrait de contourner les problèmes de tumorigénèse, mais actuellement l'efficacité de reprogrammation de ce type d'approche est encore très limitée¹⁰⁰.

d) Les progéniteurs érythroïdes/myéloïdes/lymphoïdes

L'activation ou la répression des facteurs de transcription est la clef de la régulation du système hématopoïétique. Les équilibres mis en place pour maintenir une cellule indifférenciée ou bien au contraire lui permettre de s'engager dans tel ou tel lignage hématopoïétique, intègrent de nombreux signaux intrinsèques et extrinsèques. Ainsi, le défaut d'un facteur de transcription peut avoir de lourdes répercussions qui conduiront, dans le meilleur des cas, à la mort de la cellule et évitera par exemple la transformation cellulaire et le développement tumoral chez un individu.

Les principaux facteurs de transcription de la différenciation hématopoïétique sont listés ici et présentés dans la *figure 11* (revu dans Orkin and Zon, 2008¹⁰¹) :

- La lignée Erythroïde : GATA-1, FOG-1, Gfi-1b, EKLF
- La lignée Mégacaryocytaire : GATA-1, GATA-2, FOG-1, Gfi-1b, Fli-1, NF-E2
- Les cellules Mastocytaires : PU-1, GATA-1, GATA-2
- Les cellules Eosinophiles : PU-1, C/EBP α , GATA-1, C/EBP ϵ
- Les cellules Neutrophiles : PU-1, C/EBP α , Gfi-1, C/EBP ϵ

- La lignée Monocytaire/macrophagique : PU-1, Maf
- La lignée Lymphoïde B : Ikaros, PU-1, E2A, EBF, Pax-5, Bcl1a, Evi9, XBP-1
- La lignée Lymphoïde T : Ikaros, PU-1, Notch, TCF-1, GATA-3

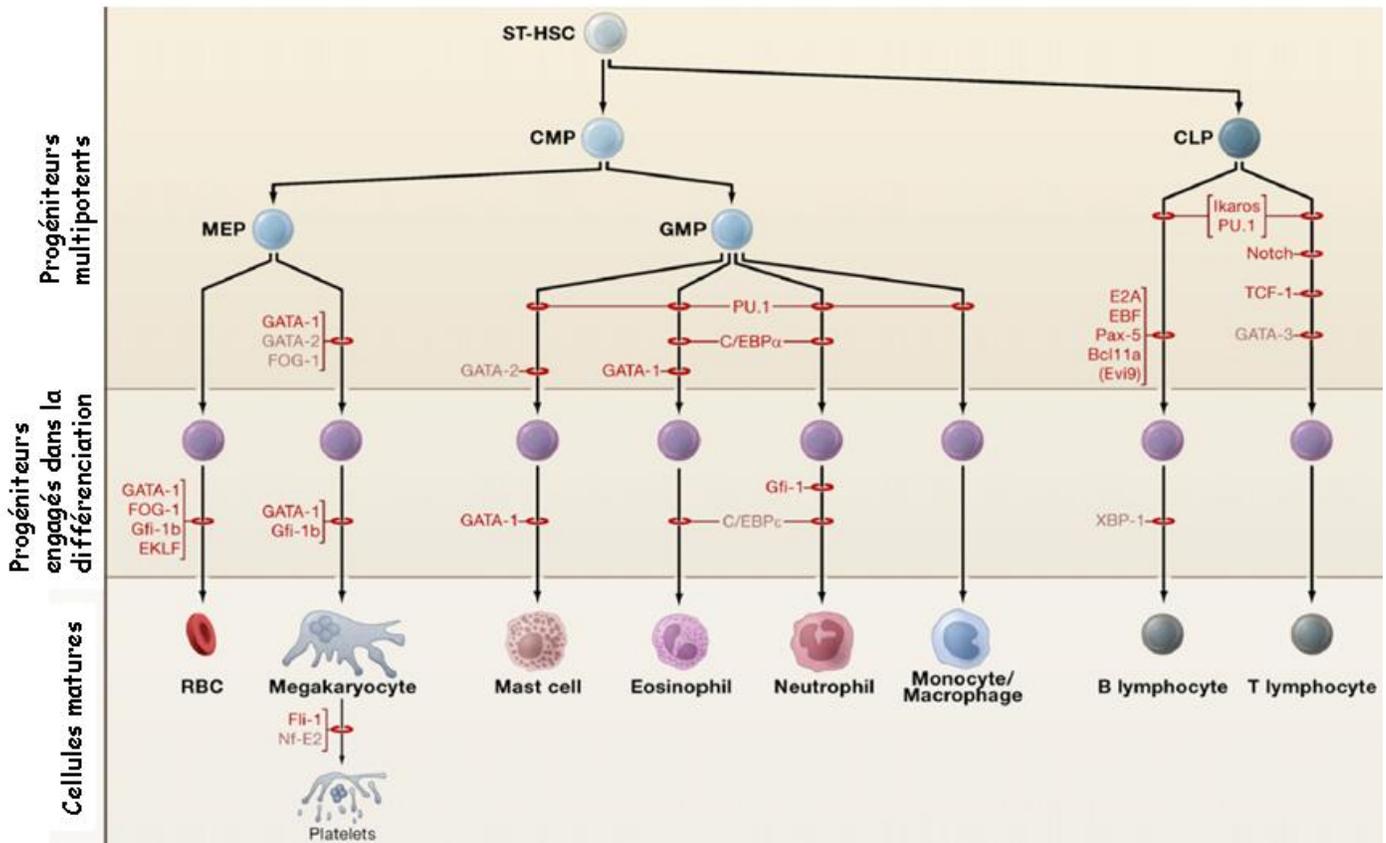


Figure 11 : Principaux facteurs de transcription régulant la différenciation hématopoïétique

ST-HSC short-term HSC ; CMP progéniteur myéloïde commun ; CLP progéniteur lymphoïde commun ; MEP progéniteur érythro/mégacaryocytaire ; GMP progéniteur granulo/macrophagique ; RBC érythrocytes (Orkin and Zon, Cell 2008 Hematopoiesis : An evolving Paradigm for Stem Cell Biology)

Certains de ces facteurs sont à la fois des régulateurs positifs pour leur lignage hématopoïétique et des régulateurs négatifs de la différenciation vers d'autres lignages.

GATA-1 et PU-1 en sont un bon exemple : une expression forte de GATA-1 et faible de PU-1 dans le progéniteur myéloïde commun (CMP) favorisera la lignée

érythro/mégacaryocytaire au détriment de la lignée granulo/macrophagique¹⁰². Il en est de même à chaque étape d'engagement des cellules, la balance entre les différents facteurs de transcription orientera la différenciation, entre EKLf et Fli-1 pour le choix érythrocyte ou mégacaryocyte¹⁰³, entre Gfi-1 et PU-1 pour le choix neutrophile ou monocyte/macrophage¹⁰⁴. D'une autre façon Pax-5, un FT spécifique de la lignée lymphoïde B, est indispensable à l'engagement en cellule B : son absence provoque une différenciation vers les cellules T et NK mais aussi vers les cellules dendritiques, les macrophages, les neutrophiles et les précurseurs érythroïdes (revu dans Nutt and Kee, Immunity 2007)¹⁰⁵.

2) Les cytokines et leurs récepteurs

L'hématopoïèse est le résultat de l'intégration de nombreux signaux initiés par la liaison de cytokines à leur récepteur. Le signal est ensuite propagé dans la cellule par des voies de signalisation telles que les voies JAK/STAT, PI3K/AKT et MAPK (que nous avons décrites plus haut dans la partie II – A – 1- a) du 1^{er} chapitre). Les cytokines de l'hématopoïèse agissent souvent en synergie et regroupent environ une trentaine d'interleukines (IL), des « *colony-stimulating factors* » (CSF), des interférons (IFN α , β et γ), de l'érythropoïétine (EPO) et de la thrombopoïétine (TPO). Ces cytokines lient des récepteurs qui peuvent être regroupés en fonction de caractéristiques communes. Ils possèdent tous (exception faite des récepteurs à activité tyrosine kinase) un domaine extracellulaire d'environ 200 acides aminés (aa), un domaine transmembranaire de 15 aa et un domaine intracellulaire responsable de la transduction du signal. Les domaines intracellulaires sont très similaires d'un récepteur à l'autre, la spécificité du signal résidant dans la liaison du ligand au domaine extracellulaire (*Figure 12*).

a) Les récepteurs

Il existe plusieurs classes de récepteurs :

- les récepteurs de classe I regroupant des homo- et hétérodimères possédant des régions à fortes homologies :

- dans la partie extracellulaire (4 résidus cystéine conservés, un motif W-S-X-S-W et un domaine fibrinectine III),
- dans la partie intracellulaire proche du domaine transmembranaire (des régions Box1/2).

- les récepteurs de classe II, quant à eux, ont perdu le motif W-S-X-S-W¹⁰⁶.

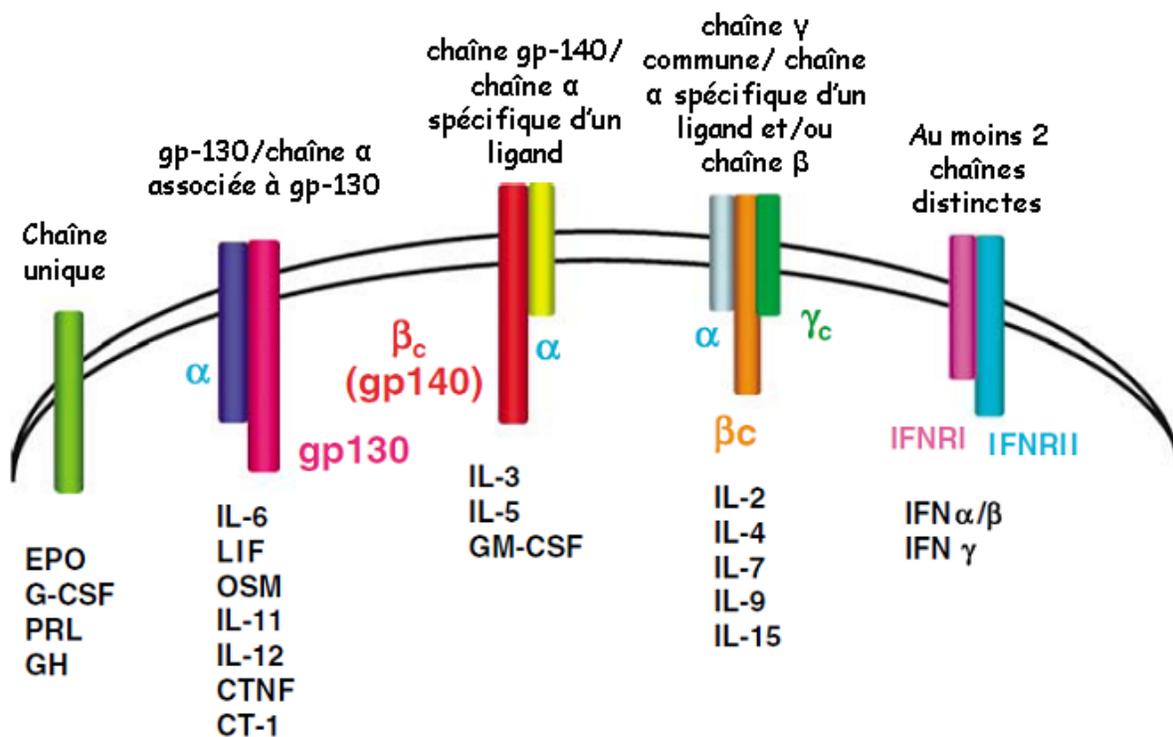


Figure 12 : Principaux récepteurs des cytokines de l'hématopoïèse

Les différentes chaînes des récepteurs leur confèrent leurs spécificités de liaison au ligand et de transduction du signal. (adaptée de Baker et al., *Oncogene 2007 Hematopoietic cytokine receptor signaling*)

Les récepteurs de classe I :

- Les récepteurs homodimériques lient les hormones de croissance G-CSF (G-CSFR), EPO (EPO-R) et TPO (c-MPL). L'EPO et la TPO agissent comme des hormones endocrines alors que le G-CSF a une action paracrine,
- Les récepteurs hétérodimériques partagent comme monomère la gp130 et lient l'IL-6, le LIF (leukemia inhibitory factor), l'IL-11, l'IL-12, la cardiotropine 1 et l'oncostatine M,
- Les récepteurs hétérodimériques partagent comme monomère la gp140 (ou chaîne β) et lient l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF,
- Les récepteurs composés de trois sous-unités différentes (chaînes α , γ et/ou β) lient l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, et l'IL-15, la chaîne β n'étant pas toujours nécessaire à la transduction du signal.

Les récepteurs de classe II :

- Les récepteurs à l'IFN sont des récepteurs hétérodimériques dont les deux chaînes assurent la signalisation, ils lient les IFN α , β et γ , l'IL-10, l'IL-19, l'IL-20, l'IL-22, l'IL-24, l'IL-28a, l'IL-28b et l'IL-29.

Les autres récepteurs :

- Les récepteurs à activité tyrosine kinase lient le SCF (c-KIT), le FLT3-L (FLT3/FLK2) et M-CSF (M-CSFR).

b) Les cytokines

Aucun récepteur ne peut transduire de signaux sans la liaison de cytokines sauf, dans le cas d'activations constitutives à l'origine de nombreux troubles de la prolifération et de la survie cellulaire. Ainsi les cytokines qui permettent l'engagement des CSH et progéniteurs vers des voies de différenciations spécifiques de l'hématopoïèse, peuvent être regroupées en deux catégories, la première régulant positivement l'hématopoïèse (IL-3, IL-6, SCF...), la seconde y exerçant un rôle négatif ($\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF}\beta$...)(*figure 13*).

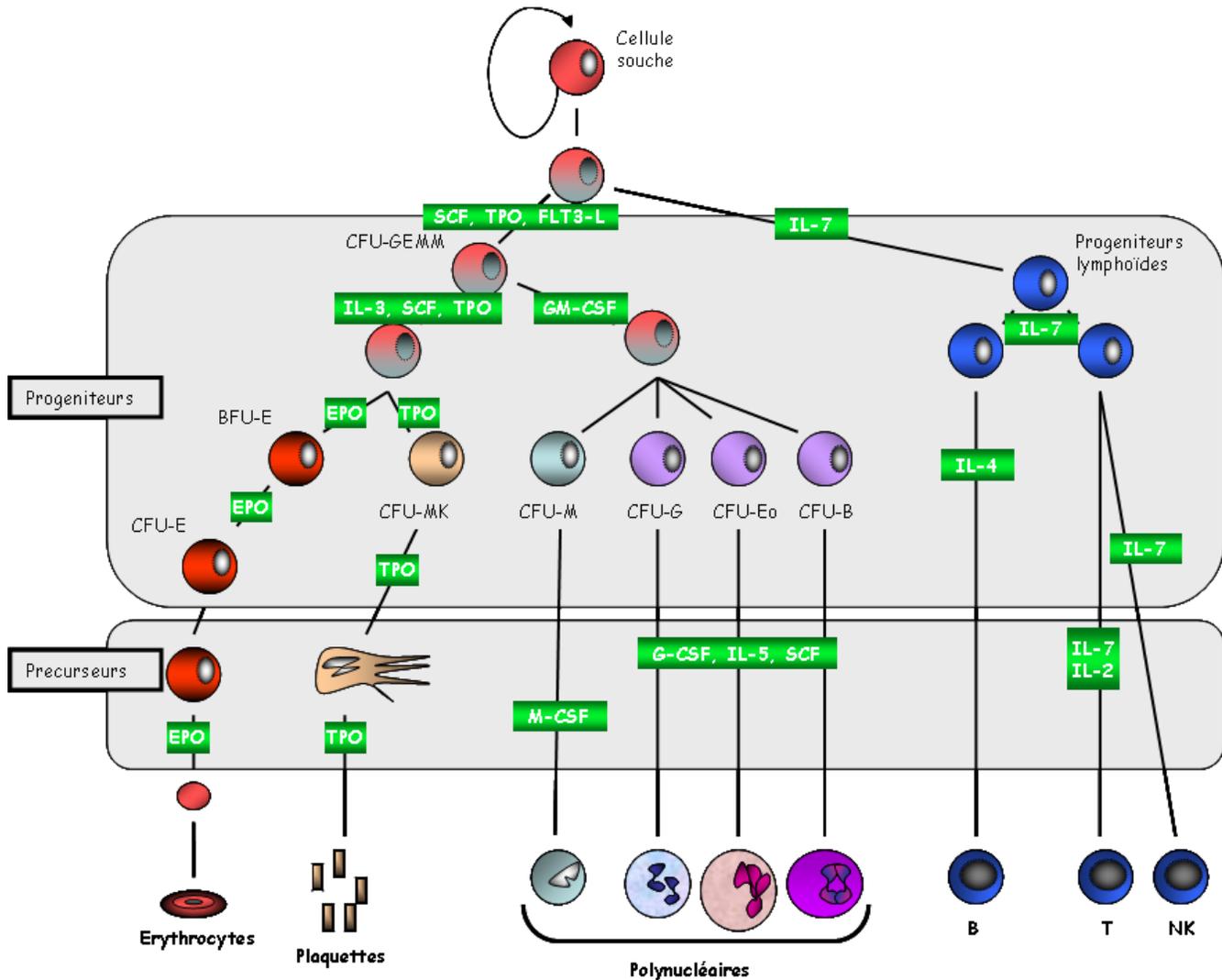


Figure 13 : Principales cytokines régulant la différenciation hématopoïétique

Les cytokines les plus primitives telles que le SCF, la TPO et le FLT3-L permettent d'entretenir le caractère souche des CSH, tandis que des cytokines telles que l'IL-4 ou le M-CSF interviennent plus tard dans la différenciation des progéniteurs en cellules matures.

Les cytokines **régulant positivement les étapes précoces** de l'hématopoïèse sont les suivantes :

- le SCF, nécessaire à la survie et à la prolifération des cellules les plus primitives, est un facteur multipotent capable d'agir en synergie avec des facteurs tels que l'IL-3 le G-CSF et l'EPO,
- le FLT3-L (Fms Like Tyrosine kinase 3-ligand) est absent des cellules hématopoïétiques les plus différenciées et est important dans le maintien des CSH,

- l'IL-3 a une action sur l'ensemble des lignées hématopoïétiques excepté sur la lignée B. Combinée au SCF, l'IL-3 est capable d'induire la formation de colonies de neutrophiles, de monocytes/macrophages, d'éosinophiles et de basophiles,

- l'IL-6 agit en synergie avec le GM-CSF et l'IL-3 et semble avoir un effet qui dépasse le système hématopoïétique et le système immunitaire et pourrait jouer un rôle dans de nombreux organes.

- le GM-CSF, comme son nom l'indique, est associé au potentiel de formation des colonies, notamment en test CFC. Outre son action dans le cadre des progéniteurs, il influence également la différenciation des précurseurs granulo/monocytaires et éosinophiles,

- la TPO agit en synergie avec l'IL-3 et le SCF sur la survie et la prolifération des CSH et des progéniteurs multipotents. Comme pour le GM-CSF, son action ne se limite pas aux cellules les plus immatures puisqu'il est indispensable au bon déroulement de la mégacaryopoïèse.

Les cytokines **régulant positivement les étapes tardives** de l'hématopoïèse sont :

- le M-CSF régule la différenciation terminale des monocytes et macrophages,
- le G-CSF permet la différenciation de la lignée granuleuse, il agit également sur les cellules les plus immatures et induit leur mobilisation,
- l'EPO est nécessaire à la différenciation érythroïde,
- la TPO est le principal facteur de la régulation de la production des plaquettes, il est également impliqué dans la survie et la différenciation des progéniteurs mégacaryopoïétiques,
- l'IL-2 intervient au niveau des cellules T,
- l'IL-4 est un facteur de croissance des lymphocytes B.

Les cytokines **régulant négativement** l'hématopoïèse sont :

- les IFN ralentissent la croissance des progéniteurs granulo/macrophagiques et érythroïdes,
- le TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) régule négativement le maintien des CSH en augmentant l'engagement des progéniteurs¹⁰⁷,

- le TGF- β est impliqué dans le maintien des CSH en quiescence en activant l'expression de p57KIP2¹⁰⁸. Le rôle de TGF- β sera développé avec la partie « facteurs extrinsèques »,

- le facteur MIP1 α (*Macrophage inflammatory Protein 1 α*) maintient les CSH et progéniteurs immatures dans un état quiescent.

3) Le rôle des microARN dans l'hématopoïèse

Les microARN (miR)¹⁰⁹, cités pour la première fois en 2001 chez les végétaux, sont des ARN non-codants de 19 à 24 nucléotides qui assurent la régulation post-transcriptionnelle des gènes en empêchant la traduction ou en déstabilisant les ARNm.

Les miARN sont transcrits par l'ARN polymérase II sous la forme d'un précurseur en épingle à cheveux. Dans le cytoplasme, les miARN en épingle à cheveux sont clivés par Dicer pour se retrouver sous la forme de simples brins intégrés au complexe RISC (*RNA Induced Silencing Complex*). Les miARN servent de motifs de reconnaissance au complexe RISC. La liaison complète ou partielle de ce miARN mature à une séquence complémentaire, située dans la région 3' non traduite (3'UTR) des ARN, entraîne le clivage ou l'inhibition des ARNm ciblés. Les miARN sont exprimés dans tous les compartiments cellulaires et notamment dans le compartiment hématopoïétique où ils participent au maintien des CSH et à l'engagement des progéniteurs (revu dans Vasilatou et al., *European Journal of Haematology* 2010)¹¹⁰ (*figure 14*).

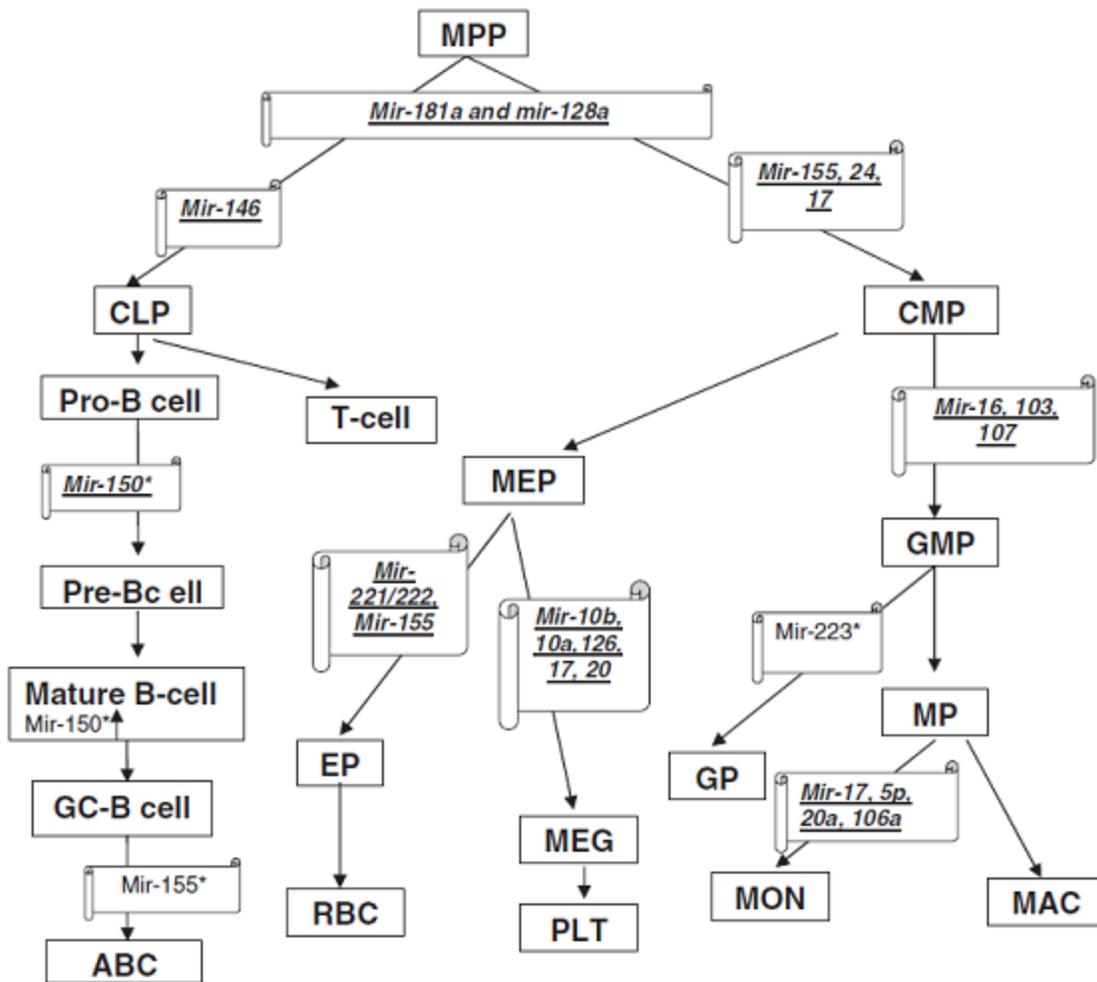


Figure 14 : Principaux microARN régulant l'hématopoïèse

* dans la souris, soulignés inhibent la différenciation ;

MPP progéniteurs multipotents ; CMP progéniteur myéloïde commun ; CLP progéniteur lymphoïde commun, GC-B cell cellules B du centre germinatif, ABC cellules B activées ; MEP progéniteur érythro/mégacaryocytaire, EP précurseurs érythroïdes, MEG précurseurs mégacaryocytaires, RBC érythrocytes, PLT plaquettes ; GMP progéniteur granulo/macrophagique, MP monocyte-macrophage, MON monocyte, MAC macrophage, GP précurseurs granulocytiques; (*Vasilatou et al., European Journal of Haematology 2010 The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis*)

Le rôle des miR dans les CSH :

Les miR jouent chacun des rôles différents dans le processus de différenciation des CSH. L'expression de miR-181a et 128a dans les CSH inhibe la différenciation vers toutes les lignées hématopoïétiques alors que l'expression de miR-146 n'inhibe que la différenciation vers le progéniteur lymphoïde commun. De même, l'expression de miR-155, 24a et 17 bloque la différenciation en progéniteurs myéloïdes¹¹¹. La surexpression de hsa-miR-520h dans les CSH inhibe l'expression d'ABCG2 et augmente la fréquence des colonies en CFC¹¹², ce qui laisse à penser que hsa-miR-520h favoriserait la différenciation des CSH en progéniteurs.

Le rôle des miR dans la lignée érythro/mégacaryocytaire :

La surexpression de miR-221 et miR-222, dans des cellules CD34⁺ de sang de cordon ombilical, bloque la différenciation et la maturation érythroïde en ciblant c-Kit et augmente ainsi le nombre d'érythroblastes¹¹³. De même, la surexpression de miR-155 diminue les capacités de différenciation dans toute la lignée myéloïde¹¹¹.

Dans le modèle du Zebrafish, GATA-1 active *in vivo* la production de miR-451, qui, lorsqu'il est inhibé, empêche la maturation des érythrocytes¹¹⁴. L'expression des miR-10a, 126, 106, 10b, 17 and 20 est diminuée dans la mégacaryopoïèse¹¹⁵. Par ailleurs et de façon intéressante, miR-10a a été rapporté comme régulant des gènes de la famille Hox.

Le rôle des miR dans la lignée granulo/monocytaire :

L'expression des miR-16, -103 et 107 inhibe la différenciation du progéniteur myéloïde commun en progéniteur granulo/macrophagique et l'expression des miR-17-5p, 20a et 106a diminue la différenciation monocytique et augmente le nombre de cellules blastiques¹¹⁶. Les miR-17-5p, 20a et 106a lient la partie 3'UTR de l'ARNm de RUNX1 induisant une diminution de l'expression de la protéine de RUNX1 et d'un de ses gènes cibles : le récepteur du M-CSF (M-CSFR). En retour, RUNX1 est capable de lier les promoteurs de ces clusters de miR et de bloquer leur transcription. Une autre voie de régulation possible passe par l'inhibition de p21 par miR-17-5p¹¹⁷. miR-223 joue un rôle important dans la granulopoïèse, mais le mécanisme exact permettant cette régulation reste encore à déterminer.

Le rôle des miR dans la lignée lymphocytaire :

Un des principaux miR de la régulation lymphoïde est miR-150 (chez la souris), il est préférentiellement exprimé pendant la maturation des cellules B et T et réprimé dans les cellules T naïves (Th1 et Th2). L'expression prématurée de miR-150 pendant la maturation des cellules B bloque la transition de pro-B en pré-B¹¹⁸, sans doute en régulant l'expression du facteur de transcription c-Myb qui est principalement exprimé dans les lymphocytes B matures¹¹⁹. On observe par ailleurs une augmentation de l'apoptose dans la population de pro-B exprimant miR-150.

Le KO de souris miR-155^{-/-} a permis d'identifier ce miR comme un acteur important de la lymphopoïèse, spécialement dans la différenciation des T-helper et l'activation des lymphocytes dans le centre germinatif où il agit sur la production des cytokines¹²⁰. A l'inverse, les souris qui surexpriment le miR-155 ont une prolifération anormale des cellules pré-B et développent des leucémies lymphoblastiques¹²¹.

La mise en évidence récente des miR offre de nombreuses perspectives dans la compréhension des mécanismes de régulation des ARNm et de l'expression de leurs protéines, ainsi que dans la lutte contre le cancer, notamment avec le développement d' « antagomirs » ou de miR à la propriété de « suppresseurs de tumeur ».

B. LES TESTS FONCTIONNELS

L'identification et l'étude du comportement des cellules souches ont nécessité la mise au point de tests *in vitro* et *in vivo*.

1) Tests *in vivo* : le modèle de la souris immunodéficiente

L'étude de l'hématopoïèse *in vivo* est rendue possible par l'utilisation de la souris. Malgré de nombreuses différences (marqueurs de surface, facteurs de croissance, microenvironnement) en comparaison à l'Homme, le modèle murin demeure un outil privilégié grâce à la possibilité de générer des déficits ciblés. D'autre part, l'utilisation d'animaux immunodéficients a rendu possible la transplantation des cellules humaines et l'étude des CSH humaines xéno greffées.

La technique majeure de caractérisation de la cellule souche hématopoïétique est la reconstitution à long terme du système hématopoïétique dans un receveur après un conditionnement myélo-ablatif. Le modèle murin s'est ainsi révélé être incontournable dans l'étude du comportement des cellules souches face à des situations physiologiques (cytokines) ou de stress (irradiation) mais également dans l'étude des processus régulant la transplantation, des capacités de mobilisation et du «*Homing*». L'étude des caractéristiques des CSH humaines par xéno greffe est devenue réalisable notamment grâce au développement de modèles murins immunodéficients capables de soutenir la croissance de cellules non murines (comme la souris NOD/LtSz-scid IL2r^{γ-/-}).

Les différents modèles présentés ci-dessous (*figure 15 et tableau 2*) sont aujourd'hui utilisés dans de nombreux domaines de la biologie : étude du développement et des fonctions du système immunitaire, maladies infectieuses (HIV, malaria, infections par *helicobacter pylori*, trypanosome...), maladies auto-immunes, processus de cancérisation et médecine régénérative

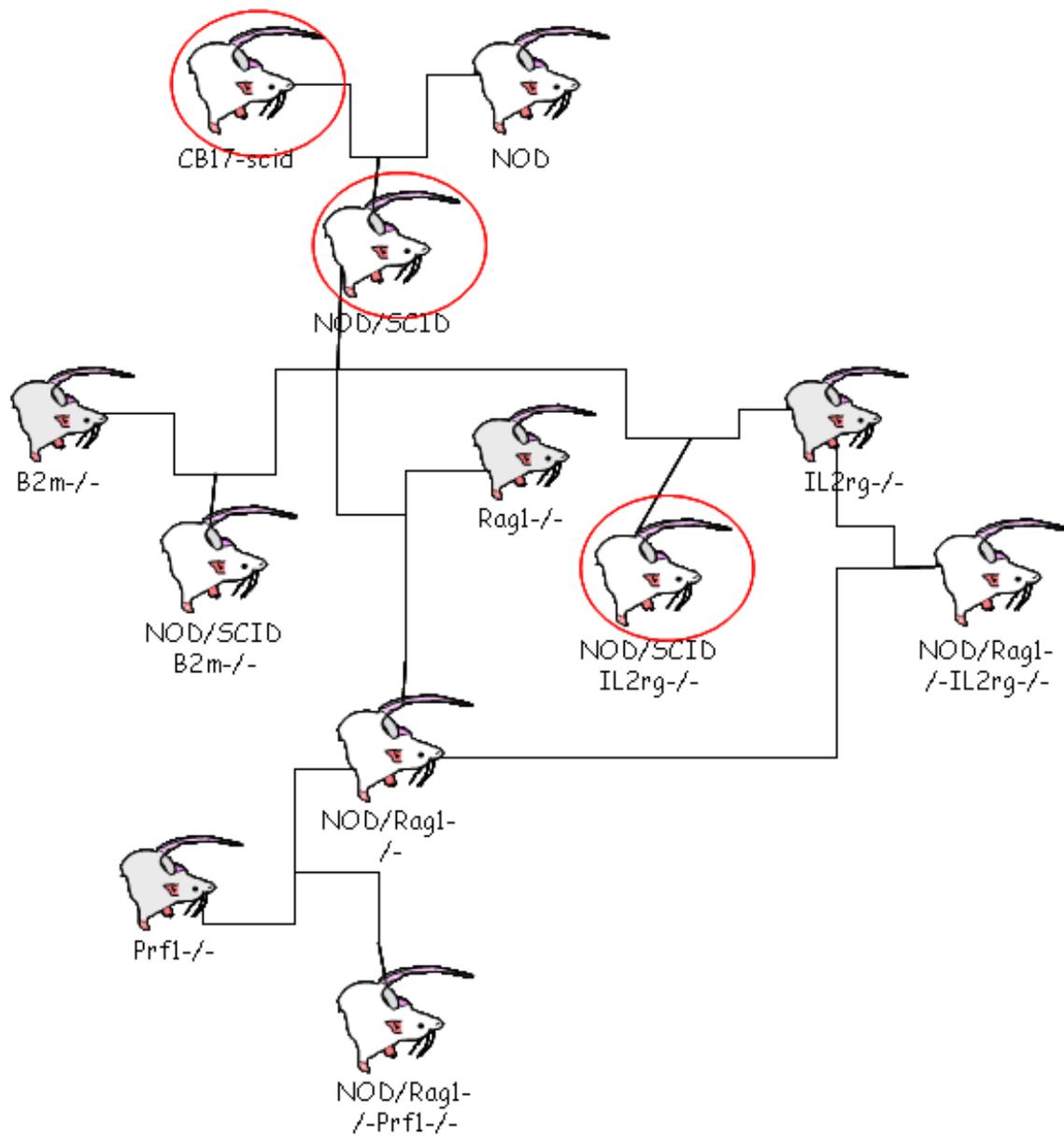


Figure 15 : Genèse des principaux modèles de souris humanisées

(Modifiée d'après Shultz et al., *Nature Reviews Immunology* (2007) 7, 118-130 *Humanized mice in translational biomedical research*)

Mutation	lignée	Nomenclature	Phénotype	Avantages	Inconvénients
Prkdc(scid)	C.B-17-scid	C.Bka Igh(b)-Prkdc(scid)/Icr5mn	Pas de cellules B et T matures, sensibles aux radiations (défaut de réparation de l'ADN)	Pas de cellules B et T matures	Cellules NK fonctionnelles, prise de greffe faible
Prkdc(scid)	NOD/SCID	NOD.CB17-Prkdc(scid)	Pas de cellules B et T matures, sensibles aux radiations, Sys. Immunitaire inné diminué	Pas de cellules B et T matures, niveau faible de NK, Sys. Immunitaire inné diminué, augmentation de la prise de greffe	Sys. Immunitaire résiduel, Cellules NK fonctionnelles, durée de vie limitée (lymphomes)
Prkdc(scid)-B2m(tm1Unc-j)	NOD/SCID B2m-/-	NOD.Cg-Prkdc(scid)B2m(tm1Unc/J)	Pas de cellules B et T matures, sensibles aux radiations, pas de B2m (défaut de MHC1)	niveau très faible de NK, augmentation de la prise de greffe	Durée de vie limitée (lymphomes), Hémochromatoses
Rag1(tm1Mom)	NOD/Rag1-/-	NOD129S7(B6)-Rag1(tm1Mom/J)	Mutation de Rag1 donc pas de cellules B et T matures	Résistantes aux radiations	Sys. Immunitaire résiduel, cellules NK actives (limite la prise de greffe)
Rag1(tm1Mom)-Prf1(tm1Sdz)	NOD/Rag1-/-/Prf1-/-	NOD129S7(B6)-Rag1(tm1Mom)Prf1(tm1Mom/J)	Mutation de Rag1 donc pas de cellules B et T matures, pas de perforine	Résistantes aux radiations, très peu de cytotoxicité des NK, bonne prise de greffe	Quelques NK actifs (diminue la prise de greffe)
Prkdc(scid)-IL2rg(tm1Wjl)	NOD/LtSz-scid IL2rg-/-	NOD.Cg-Prkdc(scid)IL2rg(tm1Wjl/SzJ)	Pas de cellules B et T matures, sensibles aux radiations, défaut de la chaîne γ du récepteur à l'IL-2 (diminue la signalisation des cytokines et donc le Sys. Immunitaire inné)	Durée de vie 90 semaines (longue), pas de NK, haut niveau de greffe, développe un sys. Immunitaire humain, pas de gène IL2rg	Pas de molécules du MHC (pas de sélection des cellules T dans le thymus), défaut de certaines cytokines nécessaire à la survie et au développement des cellules humaines, niveau faible de cellules T

Tableau 3 : Principaux modèles de souris humanisées

(Adapté de Shultz et al., Nature Reviews Immunology (2007) 7, 118-130 Humanized mice in translational biomedical research)

- Les souris immunodéficientes humanisées :

A la fin des années 80, les premières xéno greffes de cellules hématopoïétiques humaines ont été réalisées en utilisant la souris C.B-17-scid¹²³ (*severe combined immunodeficiency*). Ce modèle de souris présente une mutation homozygote dans la sous unité catalytique de la protéine kinase ADN-dépendante (Prkdc), impliquée dans le réarrangement des segments V(D)J des immunoglobulines et des récepteurs T présents à la surface des lymphocytes, et n'a pas de

lymphocytes B et T matures. Les souris SCID sont radiosensibles et n'ont ni réponse humorale, ni réponse cellulaire T, ce qui permet de greffer des cellules humaines¹²⁴. La greffe de cellules humaines ne représente alors qu'un faible pourcentage de la moelle totale du receveur. La différenciation et l'augmentation des cellules humaines sont facilitées par l'administration aux souris de cytokines humaines IL-3, érythropoïétine (EPO), SCF ou GM-CSF¹²⁵. C'est à ce moment que le terme *scid-repopulating cell* (SRC) apparaît pour désigner les cellules souches humaines capables de coloniser la moelle osseuse de l'animal après injection intraveineuse et d'établir une hématopoïèse humaine.

Cependant, la présence chez la souris SCID de cellules myéloïdes, de NK et d'un complément actif n'est pas favorable à l'obtention d'une forte greffe des cellules humaines, ce qui a conduit au développement de la souris NOD/SCID (ou NOD/LtSz-scid), une souris plus immunodéficente, résultat du croisement de la souris SCID et de la souris NOD/LtSz (Non Obese Diabetic)¹²⁶. Cette souris a été utilisée et validée avec des greffons de différentes origines : lymphocytes T humains¹²⁷, CSH isolées à partir de sang de cordon ombilical¹²⁸, de cellules de la moelle osseuse¹²⁹ et de cellules de sang périphérique mobilisé¹³⁰. Mais la présence résiduelle, chez cette souris NOD/SCID, de cellules NK et de macrophages inactifs est un facteur limitant de la prise de greffe. Ces cellules peuvent être éliminées par l'administration d'un anticorps anti-asialo GM1¹³¹ ou d'un anticorps anti-CD122¹³² (chaîne β du récepteur à l'IL-2) ce qui a pour effet d'en améliorer la repopulation.

De nouveaux modèles murins ont été par la suite développés dans le but de rendre ces animaux encore plus immunodéficients et de permettre une étude à très long terme de l'hématopoïèse : la souris NOD/SCID/ $\beta 2m^{-/-}$ où le gène $\beta 2$ de la microglobuline est absent¹³³. La microglobuline est nécessaire à la constitution du complexe majeur d'histocompatibilité 1 (CMH1), cette souris présente donc un potentiel de greffe supérieur à la souris NOD/SCID¹³⁴. Cette souris a permis de mettre en évidence des STRC¹³⁵ (*Short Term Repopulating Cells*), mais ce modèle présente une surcharge en fer et développe des lymphomes qui limitent les études à long terme. Toujours sur le fond génétique NOD, de nouveaux croisements ont permis d'établir des lignées telles que la souris NOD/RAG1^{-/-136}, la souris NOD/RAG1^{-/-}PF1^{-/-137}, la protéine RAG (*recombination-activating gene 1*) servant à la recombinaison V(D)J et la protéine perforine (PFP) étant indispensable à l'activité cytotoxique des cellules NK.

Après les souris C.B-17-SCID et la souris NOD, le troisième grand pas dans le développement de souris humanisées a été la souris mutée sur le locus de la chaîne γ du récepteur à l'interleukine 2¹³⁸⁻¹⁴¹. La chaîne γ du récepteur de l'IL-2 est un composant crucial dans la liaison et la transduction du signal des interleukines : IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21¹⁴². Ainsi, l'absence de cette chaîne γ conduit à un défaut de maturation des lymphocytes B et T et empêche la production de NK. Cette mutation a donné lieu à plusieurs croisements, mais nous ne retiendrons ici que la souris NOD/LtSz-scid IL2 γ c^{null140,141}, souvent désignée sous le terme de NOG. La greffe de CSH dans ces souris est bien meilleure que dans les lignées précédemment décrites. Elles ont ainsi permis de diminuer le nombre de CSH nécessaires à la greffe. Ce modèle permet également la différenciation des CSH en progéniteurs des différents lignages hématopoïétiques avec génération de plaquettes¹⁴¹, de globules rouges¹⁴¹ et de lymphocytes T¹⁴⁰. De plus, les souris IL2 γ ^{-/-} rendent possible l'analyse des *Short Term-* et *Long Term-repopulating stem cells*, mises en évidence dans le modèle de la NOD/SCID^{143,144}. La souris NOD/LtSz-scid IL2 γ ^{-/-}, qui a une durée de vie de 90 semaines contre 37 pour la NOD/SCID, permet un suivi à plus long terme de l'hématopoïèse et des effets du transfert de gène, par exemple.

Différents modes d'injections des CSH ont permis de mieux les caractériser, et notamment d'étudier le rôle du microenvironnement aussi appelé « niche ». Les CSH ont été injectées par injection intraveineuse, intrahépatique ou intrapéritonéale dans des animaux adultes ou nouveaux nés. L'injection intra-fémorale¹⁴⁴ a permis, en s'affranchissant du « *Homing* » et en évitant la séquestration des cellules par les tissus, la caractérisation de nouvelles populations de CSH : les R-SRC (*Rapid-Scid Repopulating Cells*) détectées après seulement 15 jours de greffe et produisant essentiellement des cellules myéloïdes et érythroïdes.

Quel que soit le mode d'injection des cellules, toutes les souris immunodéficientes ont besoin d'être conditionnées pour recevoir les greffons : irradiation à 3,5-4 Gy ou traitement au busulfan par voies intrapéritonéales¹⁴⁵. Par ailleurs, l'administration de cytokines n'est pas nécessaire si la quantité de cellules greffées dépasse le nombre de 500¹⁴⁶. Tout cela montre que même si ces modèles murins ne sont pas toujours totalement adaptés à l'étude du système hématopoïétique—absence de différenciation terminale de certaines lignées hématopoïétiques humaines, sans doute due à l'absence d'expression de molécules du système HLA (*Human*

Leucocyte Antigen)—ces modèles fournissent un environnement propice à l'établissement de « niches hématopoïétiques » en croisant les signaux humains et murins.

2) Tests *in vitro* : LTC-IC et CFC

Les colony-forming cell (CFC) sont utilisées afin de révéler et de quantifier le potentiel des progéniteurs à former, en fonction de leur engagement hématopoïétique, des colonies morphologiquement identifiables (taille, couleur, nombre de clusters) après culture dans un milieu semi-solide. Des cocktails de cytokines (SCF, IL-3, IL-6, Epo, G/GM-CSF et TPO) permettent la formation de colonies issues des progéniteurs érythroïdes (*colony forming unit-erythroïde* CFU-E et *burst forming unit-erythroïde* BFU-E), granulo-macrophagiques (CFU-G, CFU-M et CFU-GM), mégacaryocytaires (CFU-MK), et des colonies générées à partir de progéniteurs plus immatures et bipotents tels que les progéniteurs érythro-mégacaryocytaires. Ce type de test met en évidence le potentiel des progéniteurs déjà engagés (à l'exception de la lignée lymphoïde) mais ne permet pas de révéler le potentiel de cellules plus primitives (cellules souches).

Pour révéler le potentiel de cellules plus immatures, les cellules sont déposées sur un stroma qui mime le microenvironnement médullaire. Celui-ci joue un rôle primordial dans l'autorenouvellement et la différenciation des cellules souches via des interactions physiques (molécules d'adhésion) et l'activation de voies de signalisations (facteurs sécrétés et cytokines). Les LTC-IC (*Long term culture-initiating cells*) consistent donc à cultiver des cellules au moins 5 semaines en milieu liquide sur stroma, souvent des MS-5 ou des OP9 (lignée stromale murine). Ces cellules sont ensuite analysées en tant que CFC. Les cellules primitives restent en quiescence, s'autorenouvellent et/ou se différencient en progéniteurs qui, plantées dans un milieu semi-solide, peuvent former des colonies. Pendant les 5 à 6 semaines de culture, les précurseurs et progéniteurs tardifs sont éliminés.

Il est aussi possible d'identifier des progéniteurs très primitifs en maintenant la culture sur stroma pendant environ 12 semaines. Cette prolongation de la culture révèle une sous population de LTC-IC appelée E-LTC-IC (*Extended-LTC-IC*)¹⁴⁷ capable de rester en quiescence et/ou de s'autorenouveler. Une autre technique de culture à long terme également basée sur la coculture de

cellules stromales et de CD34 de MO appelée « *cobblestone area-forming cells* » (CAFC) permet la quantification de clones hématopoïétiques.

Pour évaluer la fréquence de LTC-IC au sein d'une population enrichie en cellules souches hématopoïétiques, il est nécessaire de réaliser des dilutions limites et d'y appliquer la loi de Poisson.

3) Phénotype et isolement des cellules souches hématopoïétiques

Le marqueur spécifique de la cellule souche n'existe pas : cette dernière est masquée au milieu de populations hétérogènes, n'est pas morphologiquement identifiable (quoique de petite taille) et est difficilement accessible car localisée dans des niches. Aussi la caractérisation phénotypique et la purification d'une population enrichie en cellules souches sont-elles réalisées par la combinaison de marqueurs membranaires (positifs CD34 et/ou négatifs CD38, *figure 16*) et/ou par la mise en évidence de marqueurs métaboliques (ALDH, Side population).

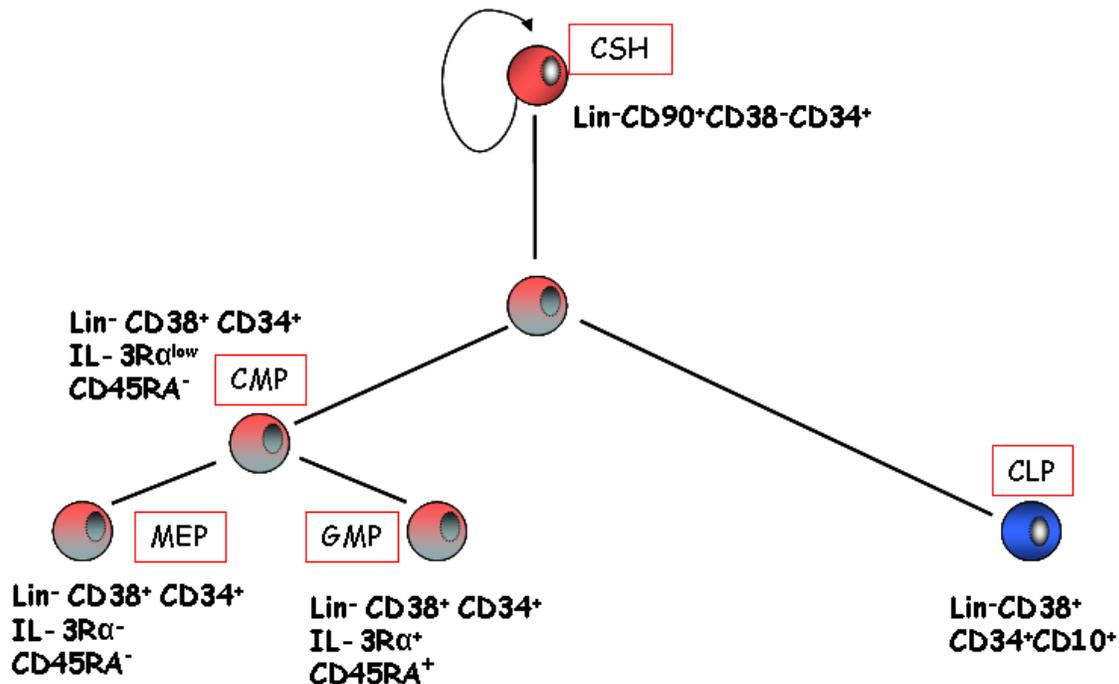


Figure 16 : Marqueurs membranaires des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques

CSH cellules souches hématopoïétiques ; CMP progéniteur myéloïde commun ; MEP progéniteur érythro-mégacaryocytaire ; GMP progéniteur granulo-macrophagique ; CLP progéniteur lymphoïde commun (*figure adaptée de Bryder et al., Am J Pathol 2006 Hematopoietic stem cells: the paradigm tissue specific stem cell*)

On parle d'un enrichissement en cellules souches car la plupart de ces marqueurs sont labiles et spécifiques de l'état spatiotemporel dans lequel se trouve la cellule souche.

Classiquement, les cellules souches hématopoïétiques humaines ont trois origines :

- Moelle osseuse (surtout os plat chez l'adulte)
- Sang périphérique
- Sang de cordon ombilical (méthode non-invasive)

a) Les marqueurs membranaires :

A l'heure actuelle, l'identification de protéines membranaires est le meilleur moyen pour discriminer les CSH des autres populations cellulaires. L'expression, ou au contraire, l'absence d'expression, permet d'isoler les CSH par un marquage et un tri en cytométrie en flux.

Marqueur Lin⁻ :

Le marqueur Lin⁻ (lineage minus) est en fait un cocktail d'anticorps qui va permettre d'éliminer les cellules qui possèdent à leur surface des marqueurs spécifiques des lignées, donc des cellules engagées, et ainsi conserver les cellules les plus immatures. Il est souvent composé d'anticorps dirigés contre les molécules : CD2, CD3, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b, glycophorine A. Il s'agit d'un enrichissement par déplétion des cellules matures.

L'antigène CD34 :

Le cluster de différenciation 34 a été l'un des tous premiers marqueurs membranaires¹⁴⁸ caractérisant une population de CSH humaines, et il est actuellement l'antigène le plus utilisé dans l'étude et la caractérisation des cellules souches humaines. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire fortement glycosylée, de la famille des sialomucines, impliquée dans l'adhésion¹⁴⁹, la migration cellulaire¹⁵⁰ et le « *homing* ». Une population triée sur le marqueur CD34 est capable de générer des CFC, des LTC-IC et des SRC. Son rôle au niveau de la cellule souche reste mal connu, notamment parce qu'il n'identifie pas uniquement des cellules souches mais aussi certains progéniteurs avec une expression qui va décroître en même temps que la spécialisation des cellules augmente. De plus, une population possédant les critères des cellules

souches a été mise en évidence au sein des CD34⁻ humaines^{151,152}. Ces SRC CD34⁻ sont extrêmement rares mais rappellent la labilité des marqueurs membranaires en fonction de l'environnement et du degré d'activité des CSH¹⁵³ (quiescence ou autorenouvellement). De même, l'hypoxie régule l'expression du marqueur CD34 et augmente le ratio forme complète/forme tronquée¹⁵⁴.

L'antigène CD38 :

Le CD38 est un marqueur négatif des CSH. En effet, à l'inverse des cellules CD34⁺, l'antigène CD38 n'est pas exprimé à la surface des CSH et son expression apparaît lors de la différenciation des cellules. Les CSH humaines sont donc CD34⁺CD38⁻. Cependant, en condition *ex vivo*, les cellules CD34⁺CD38⁻ peuvent proliférer et se différencier sans acquérir le marqueur CD38, ces cellules ne sont pourtant pas capables de greffe à long terme¹⁵⁵. Ce travail attire l'attention sur le fait que le phénotype observé en culture liquide ne corrèle pas toujours avec la capacité des cellules à produire des SRC et dépend sans doute de l'environnement et de l'état d'activation des CSH¹⁵⁶.

L'antigène CD133 :

Le CD133 (AC133) peut se substituer au CD34¹⁵⁷. Il est présent à la surface des cellules hématopoïétiques humaines primitives et des progéniteurs neuronaux et est rapidement sous exprimé lors de la différenciation hématopoïétique. Il est impliqué dans la polarisation des cellules CD34⁺ et des leucocytes, et dans la migration des cellules hématopoïétiques immatures vers la moelle osseuse¹⁵⁸. Par ailleurs, il est exprimé sur de nombreux autres types cellulaires et sur certaines cellules tumorales (revu dans Ferrandina et al., Expert Opin Ther Targets 2009)¹⁵⁹.

L'antigène CD90 (Thy1.1) :

Le marqueur CD90^{160,161} combiné au CD34 permet d'isoler des CSH possédant un potentiel de greffe supérieur aux cellules CD34⁺CD90⁻. Il est souvent utilisé en combinaison avec le CD34⁺ et le CD38⁻.

Le VEGFR2 (KDR/FLK1) :

0,1% à 0,5% des cellules de la fraction de CD34⁺ expriment, à leur surface, le récepteur au VEGFA (*vascular endothelial growth factor A*). La combinaison CD34⁺KDR⁺ permet de différencier les cellules souches hématopoïétiques des progéniteurs (CD34⁺KDR⁻). Ce marqueur reste peu utilisé et controversé.

L'antigène CD117 (c-Kit) :

CD117 est un récepteur tyrosine kinase capable de lier deux isoformes du SCF (*stem cell factor*) l'une est soluble et l'autre est accrochée à la membrane cellulaire et/ou au stroma. Ces deux isoformes sont impliquées dans la régulation des CSH¹⁶² tout en activant des voies de signalisation différentes¹⁶³ (survie, autorenouvellement, différenciation, adhésion, homing, migration). Une mutation constitutive de c-kit peut le rendre ligand indépendant et provoquer une prolifération anormale du compartiment des CSH et les mutations *W* (*White Spotus locus*) de c-kit engendrent un dysfonctionnement global du système hématopoïétique¹⁶⁴.

b) Les marqueurs métaboliques

Les CSH sont des cellules de petite taille qui ont un métabolisme glycolytique et une masse mitochondriale réduite²², ce comportement est dû à l'adaptation des CSH à leur environnement hypoxique. Ce choix métabolique leur permet entre autre de limiter l'instabilité génique. Par ailleurs, les CSH ont développé d'autres mécanismes capables de les protéger d'un environnement toxique.

L'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) :

L'ALDH est une enzyme intracellulaire impliquée dans la transformation de l'acétate en acétylCoA. Elle est fortement exprimée dans les CSH et progéniteurs hématopoïétiques, où elle leur confère une certaine résistance aux agents alkylants tels que le cyclophosphamide¹⁶⁵. Avec un marquage fluorescent de l'ALDH (ALDEFLUOR®), il est possible d'accroître le potentiel SRC de cellules triées sur CD34⁺CD38⁻ d'environ 10%¹⁶⁶.

Side Population (SP) :

Les CSH peuvent être enrichies sur leur capacité à relarguer des colorants vitaux via un système de pompe à efflux de la famille des transporteurs ABC (ABCG2, MDR1,...). Ainsi, le colorant vital Hoechst 33342 (fixe l'ADN et l'ARN) et la Rhodamine-123 (fixe les mitochondries) sont utilisés afin d'identifier une population appelée SP (*Side Population*). Le Hoechst 33342 exploite deux caractéristiques des CSH : un marquage faible de l'ADN dû à un état quiescent et une activité forte des pompes à efflux. Ce marquage est classiquement utilisé dans l'identification de CSH murines mais est encore soumis à controverse quant à son utilisation dans le modèle humain.

III. LA NICHE HEMATOPOÏËTIQUE

A la fin des années 70, la coculture¹⁶⁷ sur stroma (cellules adhérentes) permet d'entretenir une hématopoïèse fonctionnelle. Le concept de niche est abordé pour la première fois en 1978 par Schofield dans le modèle du système hématopoïétique³. Il y décrit un espace au sein de l'os, fait d'interactions cellules/cellules et capable de conserver et d'entretenir les capacités prolifératives des CSH tout en empêchant leur maturation. Aujourd'hui, de nombreuses niches et cellules souches associées ont pu être identifiées au sein de différents tissus : dans le muscle les cellules satellites du muscle, les cellules souches neurales, les cellules souches intestinales, les cellules souches du bulbe des follicules pileux et de la région interfolliculaire de l'épiderme, et dans les testicules avec les cellules souches spermatogoniales ou germinales (revu dans Morrison et Spradling, Cell 2008)¹⁶⁸.

La niche osseuse, localisée dans la région sous-trabéculaire au contact de l'endoste, est un abri dans lequel les cellules souches se lovent, s'autorenouvellent et se maintiennent dans un état indifférencié¹⁶⁹. Cette structure anatomique inclut des composés cellulaires et non cellulaires ainsi que l'intégration de signaux locaux et systémiques. Le maintien des CSH en coculture *in vitro* et les tests de homing *in vivo* ont permis de confirmer la réalité physique d'une structure capable d'accueillir les CSH. Dans l'os, deux niches¹⁷⁰ ont pu être caractérisées : la niche ostéoblastique (ou endostéale), proche de l'anoxie, qui maintient les CSH dans un état quiescent en inhibant leur prolifération et la niche vasculaire¹⁷¹, davantage oxygénée, qui permet l'expansion du compartiment CSH/progéniteurs (*figure 17*). Ainsi, l'absence de niches fonctionnelles suite à un défaut d'ostéogenèse ou du remodelage osseux entraînera des perturbations du système hématopoïétique¹⁷². Dans les deux niches présentées ci-dessus, le maintien des CSH requiert l'activation des voies de signalisation BMP/TGF- β , Tie2/Ang-1, TPO/Mpl, shh, Wnt et Notch.

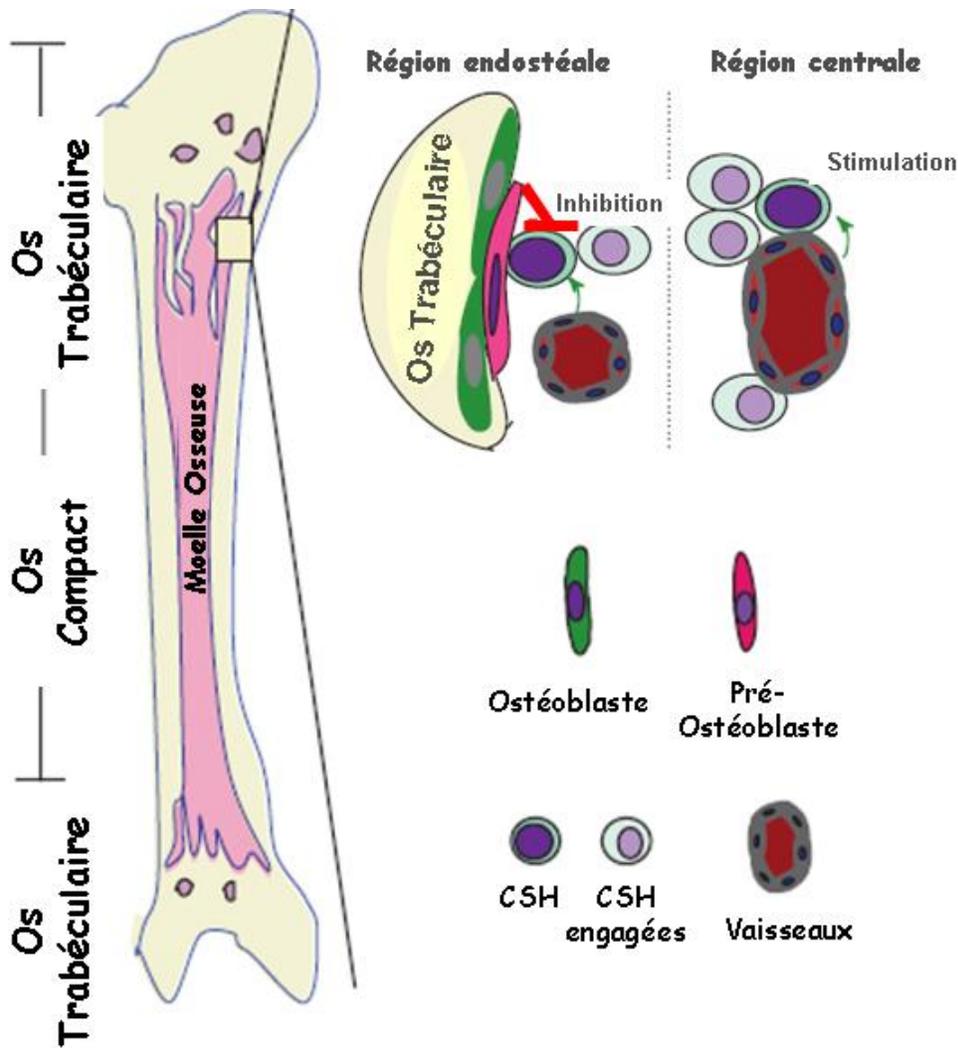


Figure 17 : Région endostéale et région centrale de l'os

La région endostéale est proche de la surface interne de l'os. Les CSH qui résident dans cette région reçoivent des signaux d'inhibition des pré-ostéoblastes, mais les CSH sont également exposées aux signaux émanant du système vasculaire. Dans la zone centrale, les signaux du système vasculaire sont dominants et stimulent les CSH. (modifiée d'après Xie et al., *Nature*. (2009) *Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging*).

A. PRESENTATION DES NICHES HEMATOPOIETIQUES

1) La niche ostéoblastique (ou endostéale)

Les ostéoblastes jouent un rôle central dans la régulation du tissu osseux, mais aussi dans la régulation de l'hématopoïèse, en sécrétant des facteurs tels que le G-CSF, le GM-CSF (revu dans Taichman Blood 2005)¹⁷³, le SDF-1, l'IL-6 ou encore le SCF¹⁷⁴.

Dans la population ostéoblastique, certaines cellules expriment fortement la molécule d'adhésion N-Cadhérine à leur surface et sont appelées SNO (*Spindle-shaped N-cadherin⁺ CD45⁻ Osteoblastic*). Elles sont activées par l'hormone parathyroïdienne (PTH) et jouent un rôle très important dans la régulation et la taille de la niche hématopoïétique¹⁷⁵. Les cellules SNO métabolisent la matrice extracellulaire, développent des interactions N-Cadhérines/ β -caténines et intégrines avec les CSH et sécrètent des facteurs de croissance nécessaires au maintien des CSH comme la TPO et l'Ang-1 (angiopoïétine-1). Ainsi, l'ostéopontine (OPN) sécrétée par les ostéoblastes est reconnue par les intégrines β 1 des CSH et agit comme un régulateur négatif sur leur prolifération, permettant leur localisation à la surface de l'endoste dans un état quiescent¹⁷⁶. Les souris transgéniques, surexprimant le récepteur PPR spécifique de l'hormone parathyroïde (PTH) et de la *PTH-related Protein* (PTHrP), ont un nombre accru d'ostéoblastes en culture, de CSH *in vivo*¹⁷⁴ et sécrètent de grandes quantités de Jagged 1, le ligand de Notch. Cet effet est inhibé par l'administration d'un inhibiteur de la γ -sécrétase, qui empêche le clivage et l'activation de la voie Notch. De même, la délétion conditionnelle des ostéoblastes chez l'adulte, grâce à l'expression de la thymidine kinase sous dépendance du promoteur du collagène alpha1 de type 1, spécifique des ostéoblastes, provoque une diminution du nombre d'ostéoblastes et d'ostéoclastes à la surface de l'endoste ainsi qu'une diminution du nombre de CSH^{177,178}. La communication entre les CSH qui produisent les monocytes dont dérivent les ostéoclastes et les ostéoblastes qui les activent en sécrétant le ligand RANK¹⁷⁹, va permettre de déterminer la taille de la niche par résorption osseuse.

Récemment, des travaux réalisés par Jung et al.,¹⁸⁰ montrent que les CSH, après un stress myélo-toxique, sont capables d'orienter la différenciation de cellules mésenchymateuses vers la lignée ostéoblastique et ainsi de diriger l'aménagement de leur niche via l'activation de la voie BMP (Bone Morphogenic Protein).

Il n'est pas possible, actuellement, d'affirmer que la greffe et l'expansion des CSH et des progéniteurs immatures nécessitent un contact direct avec les ostéoblastes, lesquels ne sont pas systématiquement retrouvés associés aux CSH. Cependant, si le contact n'est pas toujours nécessaire, la proximité des ostéoblastes est requise pour assurer les fonctions des CSH et des progéniteurs. En établissant des gradients de facteurs de croissance et en sécrétant la matrice extracellulaire, les ostéoblastes régulent la niche hématopoïétique où ils sont eux-mêmes régulés par les autres types cellulaires présents (cellules mésenchymateuses, macrophages, cellules endothéliales...).

2) La niche vasculaire

La vascularisation de l'os comprend les artères qui pénètrent l'os compact à intervalles réguliers et bourgeonnent en capillaires qui convergent vers un sinus central. Un immunomarquage CD31 rend possible la visualisation du réseau vasculaire à la surface de l'endoste et dans la zone trabéculaire¹⁸¹ (*figure 18*). La présence d'une seconde niche hématopoïétique dans l'environnement de l'os, au contact des sinus endothéliaux, a récemment été mise en évidence en utilisant la famille des récepteurs SLAM¹⁷¹ ou CD150 (*signaling lymphocyte activation molecule*). L'existence d'un précurseur commun (l'hémangioblaste) aux cellules endothéliales et aux CSH durant l'embryogenèse renforce l'hypothèse d'une relation étroite entre ces deux types cellulaires⁶. Ainsi, la coculture de cellules primaires endothéliales et de CSH favorise l'expansion *ex vivo* de ces dernières et augmente leurs capacités de greffe en transplantation compétitive¹⁸². Cependant, toutes les cellules endothéliales primaires issues d'organes non hématopoïétiques ne favorisent pas la greffe¹⁸³.

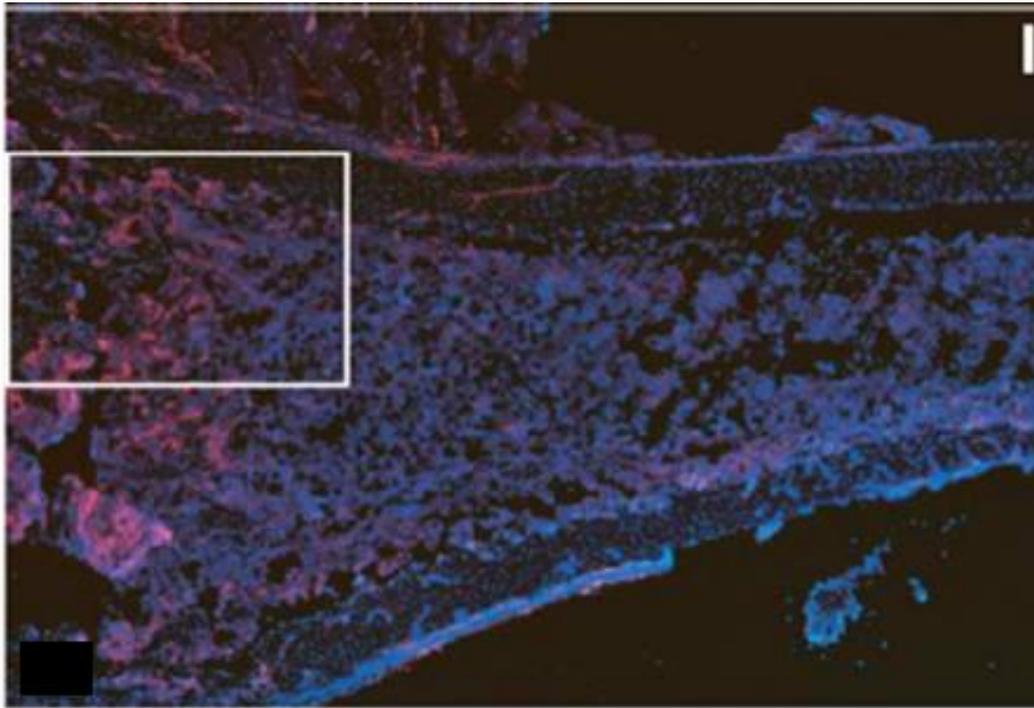


Figure 18 : Réseau vasculaire au sein de l'os

Un anti-CD31 immunofluorescent révèle l'architecture complexe du réseau vasculaire dans la région trabéculaire du tibia et le long de la diaphyse à la surface de l'endoste. En bleu, un marquage DAPI qui marque les noyaux (*figure extraite de Lo Celso et al., Nature. (2009) Nature. 2009 Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche*).

La souris TPO^{-/-} a permis de montrer que la maturation des mégacaryocytes pouvait se faire indépendamment de la thrombopoïétine et ce, par simple contact avec les cellules endothéliales sinusoidales en réponse aux facteurs de croissance FGF-4 et SDF-1. Le FGF-4 permet l'adhésion des mégacaryocytes aux cellules endothéliales sinusoidales favorisant ainsi leur survie et leur maturation, tandis que le SDF-1 augmente la production de plaquettes et leur migration en localisant les mégacaryocytes aux jonctions intercellulaires des cellules endothéliales sinusoidales¹⁸⁴.

L'ensemble de ces résultats présente la niche vasculaire comme une alternative à la niche ostéoblastique, mais avec des fonctions différentes : la niche endostéale assurant le maintien des CSH dans un état quiescent et la niche endothéliale favorisant la maturation et la différenciation des CSH. Cependant, la déconstruction de la niche ostéoblastique, par délétion des ostéoblastes, initie une hématopoïèse extramedullaire¹⁷⁸, signifiant que la niche vasculaire à elle seule n'est pas capable d'assurer une hématopoïèse fonctionnelle.

Il est probable que la niche endostéale serve de réservoir aux CSH, tandis que la niche vasculaire, en fournissant un environnement plus riche en nutriments, facteurs de croissances et oxygène, favoriserait la différenciation et la mobilisation des CSH et des progéniteurs qui, une fois arrivés à maturation, ont un accès direct sur la circulation systémique. Une autre fonction probable de la niche vasculaire, qui sera discutée dans la partie « homing et mobilisation », est son rôle dans la transition entre la circulation sanguine et la niche ostéoblastique et inversement.

B. SIGNALISATION DANS LA NICHE HEMATOPOÏETIQUE ET REGULATION EXTRINSEQUE DES CSH

Les facteurs et les molécules exprimés par les cellules stromales constituent la niche hématopoïétique et créent un microenvironnement nécessaire au maintien et à l'expansion des CSH.

1) La voie de signalisation BMP/TGF- β dans les CSH

Le TGF- β appartient à la famille des TGF- β qui compte deux autres membres, les activines et les protéines BMP : leur signalisation est relayée par les protéines Smads. Le TGF β -1 est un régulateur négatif de la croissance des CSH *in vitro* ; il bloque de façon réversible la division des CSH et provoque des retards dans la différenciation myéloïde¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Inversement, la neutralisation du TGF- β *ex vivo*, pousse les cellules les plus immatures à sortir de leur état quiescent^{188,189}. Les mécanismes impliqués dans ce processus sont connus. Le TGF- β module les récepteurs des cytokines (IL-1R et c-Kit)^{190,191} et augmente l'expression d'inhibiteurs du cycle cellulaire (p21, p27 et p57)^{108,192,193}. La voie de régulation TIF1 γ (*transcriptional intermediary factor 1 γ*), qui a récemment été mise en évidence, explique le double effet de TGF- β sur la différenciation érythroïde et l'inhibition de la croissance des CSH¹⁹⁴. L'activation de la signalisation TGF- β met en compétition TIF1 γ et Smad4 pour la liaison au complexe Smad2/3, la liaison de TIF1 γ favorise la différenciation érythroïde et la liaison de Smad4 inhibe la croissance des CSH. Il existe une régulation dose dépendante du TGF- β : de faibles concentrations de TGF- β limitent les effets négatifs d'une exposition prolongée des CSH aux SDF-1 et permettraient un

meilleur ancrage dans la niche endostéale¹⁹⁵. Cependant, un défaut de signalisation du TGF- β *in vivo* n'affecte pas la prolifération des CSH^{196,197} mais accroît la myélopoïèse¹⁹⁸.

Comme pour le TGF- β , une concentration élevée de BMP (BMP-2, 4, 7) inhibe la prolifération des CSH tout en maintenant la survie à long terme et les capacités de greffe de ces cellules, tandis que de faibles concentrations de BMP-4 accroissent la prolifération et la différenciation des CSH¹⁹⁹. Cet effet peut être en partie expliqué par le rôle des BMP dans la signalisation Sonic hedgehog (shh) qui agit sur les capacités de prolifération des cellules hématopoïétiques primitives²⁰⁰. Cependant, la coculture sur un stroma de cellules sécrétant du BMP-4, qui n'expriment pas shh, maintient à long terme les CSH dans un état indifférencié. La neutralisation du BMP-4 par un anticorps monoclonal réduit significativement les capacités de greffe à long terme des cellules ainsi cultivées²⁰¹. *In vivo* BMP-4 est un régulateur essentiel de la niche ostéoblastique et son absence entraîne une diminution du nombre de CSH (WT), ainsi que de leurs capacités de greffe en série²⁰².

Une autre façon d'étudier les mécanismes par lesquels la famille des TGF- β régule le comportement des CSH est d'inhiber la signalisation en aval des récepteurs du TGF- β . Parmi les Smad qui sont les effecteurs de cette signalisation, Smad-7 agit comme un inhibiteur de cette cascade. Sa surexpression dans des CSH humaines a pour effet d'augmenter le compartiment myéloïde au détriment du compartiment lymphoïde, indiquant un rôle des Smads dans l'orientation hématopoïétique des cellules les plus primitives²⁰³ (*figure 19*).

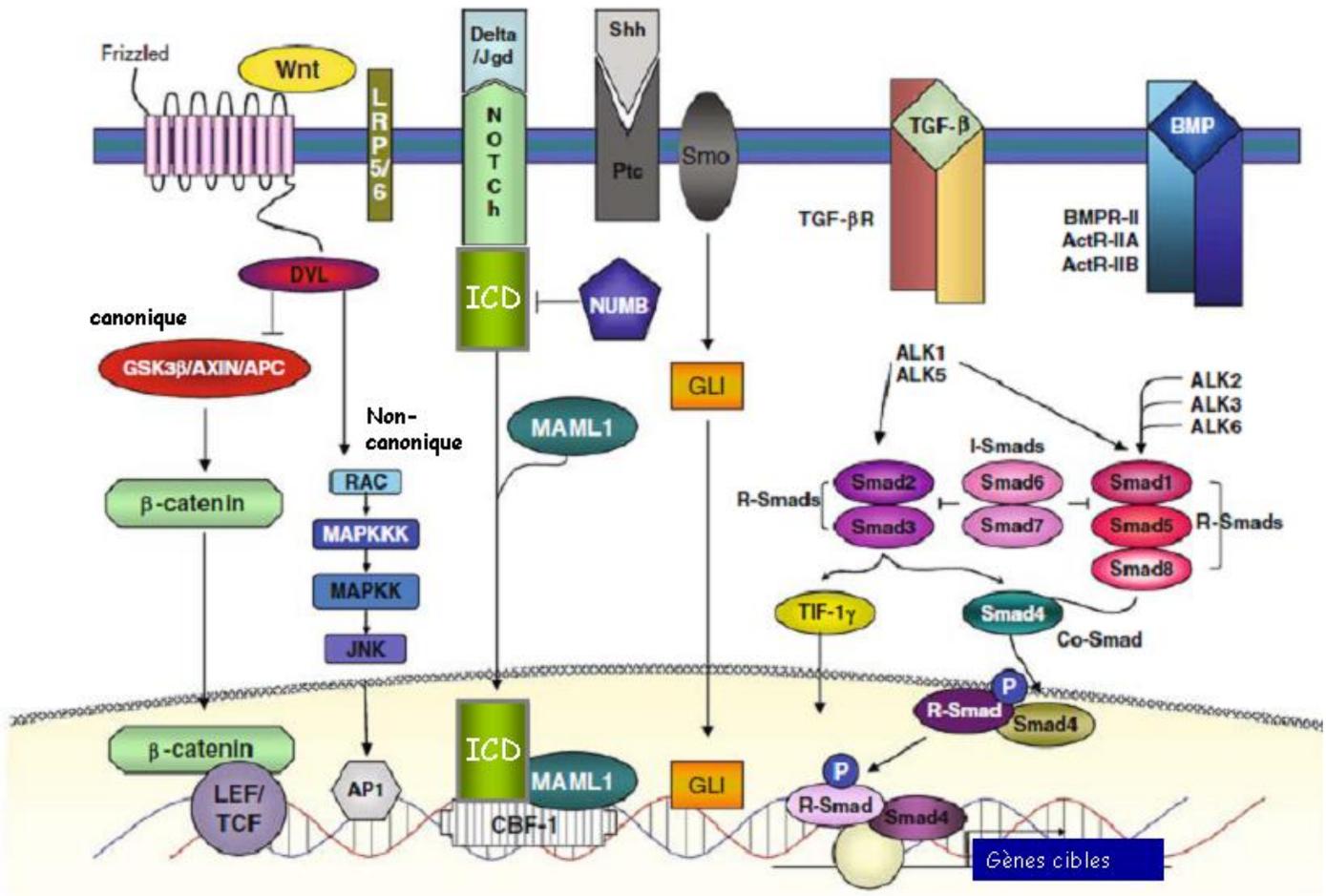


Figure 19 : Les voies de signalisation extrinsèques

La voie de signalisation Wnt est initiée par la liaison à son récepteur Frizzled et son co-récepteur LRP. Dans la voie canonique, DVL libère la β-caténine en inhibant le complexe GSK3β, la β-caténine transloque dans le noyau et se lie avec le complexe de transcription LEF/TCF. Dans la voie non-canonique, DVL active la voie Rac/MAPK. La voie de signalisation Notch est initiée par la liaison d'un de ses ligands (Delta ou Jagged). Le domaine intracytosolique de Notch (ICD) lie alors MAML1 et transloque dans le noyau. La liaison de Shh au récepteur patched déréprime Smo qui régule l'expression de Gli1. La famille des facteurs TGF-β lie ses récepteurs qui possèdent une activité sérine/Thréonine kinase et qui active les Smad. De la même façon, la liaison des BMP à leur récepteur phosphoryle les Smad. (*adaptée de Moore Hematopoietic Stem Cells dans Regulatory Networks in Stem cells, Stem Cell biology and Regenerative Medicine, Editors : V.K. Rajasekhar, M.C. Vemury © Humana Press*)

2) L'axe Tie2/Ang-1 et Cdh2/integrin β 1/c-MYC dans les CSH

Les CSH qui expriment à leur surface le récepteur tyrosine kinase Tie2 adhèrent à la niche ostéoblastique et sont des cellules quiescentes²⁰⁴. L'angiopoïétin-1 (Ang-1) qui lie Tie2 est principalement exprimée par les ostéoblastes à la surface de l'endoste^{204,205}. Ang-2 un autre ligand de Tie2 est un compétiteur de Ang-1 et régule de manière négative la signalisation Ang-1/Tie2²⁰⁶. *In vitro* le signal Ang-1/Tie2 est nécessaire à la liaison des CSH aux ostéoblastes et permet le maintien d'un phénotype immature par l'activation de l'intégrine β 1 qui participe à l'adhésion et la survie des CSH. De plus, l'ajout d'Ang-1 au milieu de culture augmente l'expression de la N-Cadhérine qui est exprimée sur les deux types cellulaires et participe *in vivo* à l'adhésion des CSH dans la niche ostéoblastique^{175,207}. *In vivo* l'axe Ang-1/Tie2-N-Cadh/ β -integrin permet l'ancrage des CSH à la matrice extracellulaire et aux cellules stromales de la niche endostéale ce qui limite ainsi les divisions des CSH en préservant leurs capacités de greffe à long terme. A l'inverse, la surexpression de c-Myc dans les CSH diminue l'expression des molécules d'adhésion N-Cadh et β -integrin et induit une perte des capacité d'autorenouvellement et un épuisement des CSH²⁰⁸ (**figure 20**). D'autre part, l'Ang-1 permet le maintien en culture de SRC humaines CD34 négatives²⁰⁹.

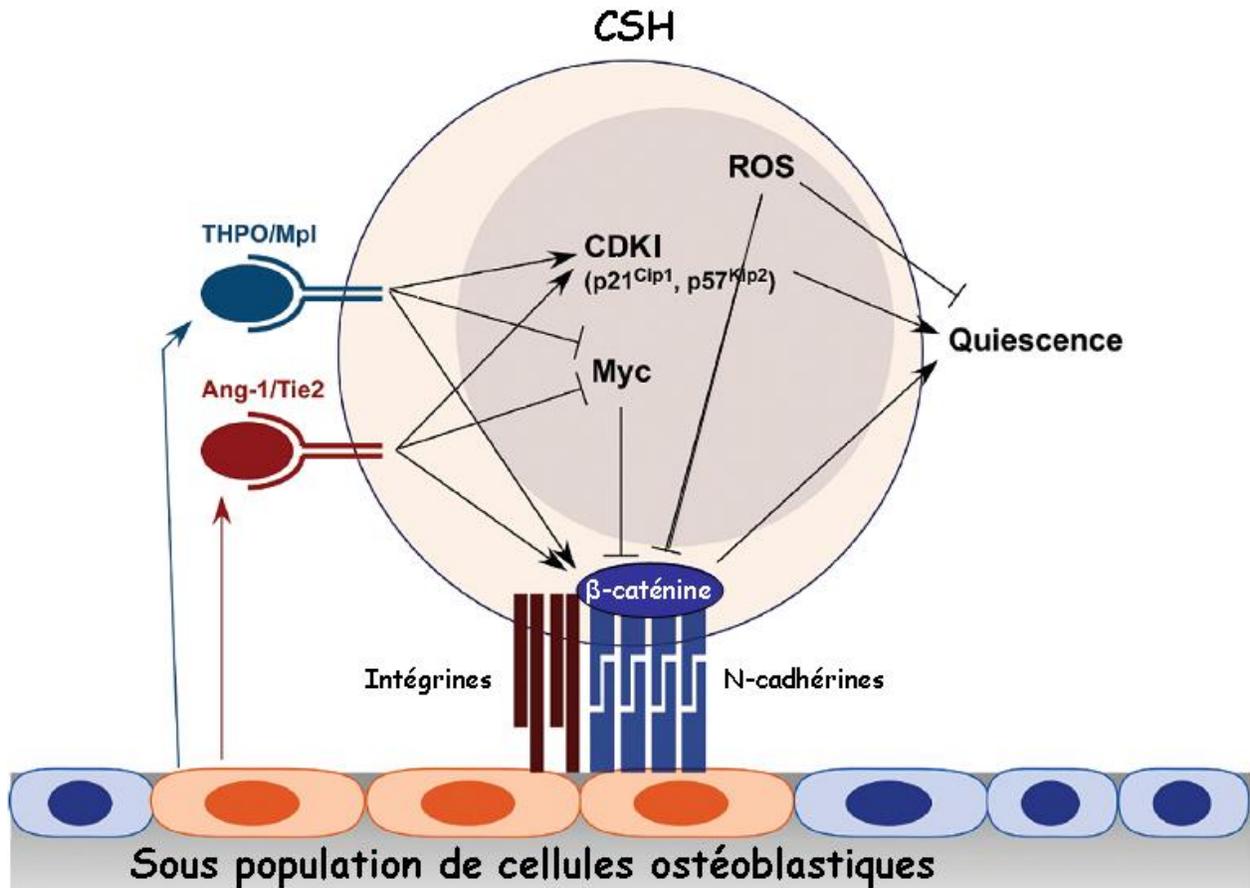


Figure 20 : Rôle de la niche ostéoblastique dans la régulation de la quiescence des CSH

Les signalisations Ang-1/Tie2 et TPO/Mpl partagées entre les CSH et la niche ostéoblastique induisent la quiescence des CSH via l'activation de molécules d'adhésion telles que l'intégrine $\beta 1$ et la N-cadhérine et d'inhibiteurs des CDK tels que P21 et P57. c-MYC régulant négativement l'adhésion et la quiescence des CSH, il sont contrôlés et régulés négativement (*modifiée d'après Arai, F. and Suda, T., Quiescent stem cells in the niche (July 11, 2008), StemBook, ed. The Stem Cell Research Community, StemBook, doi/10.3824/stembook.1.6.1, http://www.stembook.org.*).

3) Le signal TPO/Mpl dans les CSH

La TPO et le Mpl sont exprimés par les mêmes cellules que celles qui expriment Ang-1/Tie2, la TPO étant exprimée par les ostéoblastes qui se trouvent à la surface de l'endoste et Mpl son récepteur étant exprimé à la membrane des CSH²¹⁰. Dans la moelle osseuse, les LT-CSH qui expriment Mpl sont quiescentes et associées dans la niche aux ostéoblastes qui produisent la TPO. Le signal transduit dans les CSH par le couple TPO/MPL augmente l'expression de l'intégrine $\beta 1$ et de l'inhibiteur de CDK p57KIP2. De plus, l'utilisation d'un anticorps anti-Mpl,

l'AMM2, provoque une diminution du nombre de CSH. L'espace ainsi libéré dans la niche permet la greffe de MO sans pré-conditionnement des animaux. L'administration d'AMM2 entraîne également une diminution de l'expression de p57 et Tie2 et une augmentation de l'expression de c-Myc. A l'inverse, l'administration *in vivo* de TPO augmente transitoirement la quiescence des CSH et induit légèrement leur prolifération. L'ensemble de ces résultats place le signal TPO/Mpl comme un élément crucial dans la régulation de la niche ostéoblastique (*figure 20*).

4) La voie de signalisation Sonic Hedgehog dans les CSH

Lorsque Shh lie son récepteur *Patched* (Ptch), il libère le récepteur de son partenaire *Smoothed* (Smo) qui à son tour initie la translocation et l'activation de la famille de facteurs de transcription Gli. Shh, Ptch, et Smo sont tous les trois exprimés dans les CSH et cellules stromales, ils induisent la prolifération des cellules hématopoïétiques primitives²⁰⁰ via les BMP et contrôlent la différenciation lymphoïde²¹¹. L'activation constitutive de la voie Shh dans les CSH, entraîne la répression de CDKI et donc l'expansion des CSH, mais cette expansion conduit à un épuisement du compartiment de CSH²¹² (*figure 19*).

5) La voie de signalisation Wnt dans les CSH

Les ligands Wnt font partie de la famille de glycoprotéines sécrétées associées à la surface des cellules ou bien à la matrice extracellulaire, capables d'activer de nombreuses voies de signalisation par liaison à la famille des récepteurs Frizzled (Fz) et son co-récepteur LRP5,6 (*LDL-receptor related protein 5,6*). Dans la voie canonique, la liaison de Wnt à son récepteur induit la stabilisation et la translocation dans le noyau de la β -caténine où elle lie le cofacteur TCF/LEF et transactive ses gènes cibles. Tandis qu'en l'absence de Wnt, la β -caténine est déstabilisée par le complexe Axin/GSK3 (*Glycogen synthase kinase 3 β*). L'expression ectopique de l'axin ou bien d'un ligand de Fz, qui sont des inhibiteurs de la signalisation Wnt, provoque un arrêt de la croissance des CSH *in vitro* et diminue les capacités de reconstruction hématopoïétique *in vivo*⁸⁵. En outre, l'activation de la voie Wnt entraîne une augmentation de l'expression de Hoxb4 et de Notch1, deux facteurs impliqués dans l'autorenouvellement des

CSH. Cependant, l'inactivation induite de la β -caténine, n'est pas délétère pour les fonctions d'autorenouvellement et de différenciation des CSH²¹³.

De façon intéressante dans la moelle osseuse, les cellules stromales accumulent davantage d'effecteurs de la voie Wnt que les CSH. Lors de l'activation de la voie Wnt par administration de Wnt3a ou irradiation, la forme active de la β -caténine s'accumule préférentiellement au niveau de l'endoste de la région trabéculaire²¹⁴. De plus, l'activation spatiotemporelle de la voie Wnt coïncide avec l'activation de la voie Notch qui est nécessaire à la signalisation de Wnt dans les CSH²¹⁵. L'activation de la voie Wnt fonctionne comme un régulateur physiologique de la niche hématopoïétique avec des rôles différents selon le type cellulaire²¹⁶. Dans les cellules stromales, l'activation de la voie Wnt permet le maintien et l'autorenouvellement des CSH, tandis que l'accumulation dans les CSH de la β -caténine provoque leur épuisement²¹⁴. Le rôle de Wnt est donc indirect, en maintenant une niche fonctionnelle, la signalisation de Wnt assure le maintien d'une hématopoïèse fonctionnelle²¹⁷ (*figure 19*).

6) La voie de signalisation Notch dans les CSH

Outre leur rôle majeur dans la lymphopoïèse, les ligands de Notch, Delta et Jagged, sont impliqués dans l'autorenouvellement, le maintien et l'expansion des CSH²¹⁸. Les ligands de Notch sont transmembranaires et la signalisation s'effectue entre cellules adjacentes. La liaison d'un ligand à Notch provoque la coupure protéolytique et la translocation dans le noyau du domaine intracellulaire de Notch (NICD). Dans le noyau, la liaison de cofacteurs permet la transactivation de gènes cibles tels que HES-1 fortement exprimé dans les CSH CD34⁺CD38⁻²¹⁵. La culture de cellules de sang de cordon avec un cocktail de cytokines (SCF, TPO, FLT-3L, IL-3 et IL-6) et le ligand de Notch Delta1 permet de multiplier par six le nombre de cellules capables de greffer à long terme²¹⁹.

Notch joue un rôle très important dans les ostéoblastes qui garantissent l'intégrité de la niche hématopoïétique^{174,215}. Ainsi, l'activation des ostéoblastes par PTH augmente la production de Jagged-1 et accroît le nombre de CSH (*figure 19*).

7) Recrutement et adhésion des CSH médié par le FGF

Comme pour le SDF-1, le FGF-4 (*fibroblast growth factor-4*) est impliqué dans le recrutement et l'adhésion à la niche vasculaire des cellules hématopoïétiques primitives. De plus, les CSH expriment tous les récepteurs du FGF et l'ajout *in vitro* de FGF dans le milieu de culture accroît le nombre de CSH et conserve leur capacité de greffe à long terme^{220,221}.

Il a été proposé qu'un gradient de FGF s'établit entre la niche vasculaire (concentration forte) et la niche ostéoblastique (concentration faible) pour guider les cellules vers la circulation sanguine où elles termineront leur différenciation et maturation²²².

C. HOMING ET MOBILISATION

La niche vasculaire, étant à l'interface entre le compartiment osseux et le compartiment sanguin, est le site privilégié des activités de homing et de mobilisation. L'administration d'agents chimio-thérapeutiques ou du facteur de croissance G-CSF va entraîner la mobilisation des CSH. Par ailleurs, le sang périphérique mobilisé est une source clinique importante de CSH nécessaires aux protocoles de transplantation²²³. Le rôle du G-CSF est en partie expliqué par l'activation des neutrophiles qui relarguent des protéases (élastase, cathepsin G) qui clivent VCAM-1²²⁴ et SDF-1²²⁵, libérant ainsi les CSH de leurs attaches.

Le *homing* est une étape cruciale dans la transplantation de moelle osseuse, il s'agit d'un processus rapide (quelques heures¹³⁴) au cours duquel les CSH circulantes traversent la barrière endothéliale pour passer du compartiment sanguin au compartiment osseux et gagner la niche osseuse. Ce phénomène est un processus actif rendu possible par l'expression de molécules d'adhésion et de facteurs de croissances²²⁶. Un des principaux facteurs impliqué dans le homing et la mobilisation des CSH est CXCL-12 (SDF-1 : *stromal cell derived factor-1*). Il est exprimé par les ostéoblastes et les cellules endothéliales et exerce sur les cellules exprimant son récepteur CXCR4 un rôle chimio-attractant tout en induisant la production de facteurs pro-angiogéniques²²⁷ et de la metalloprotéinase-9 (MMP9) qui libère la forme soluble du SCF (*figure 21*).

L'expression de SDF-1²²⁸ et de CXCR4^{229,230} est régulée par les facteurs de transcription HIF-1 α et HIF-2 α (Hypoxia inducible factor). Durant le développement, CXCR4 est essentielle au passage des CSH du foie fœtal vers la moelle osseuse. Cependant, les CSH CXCR4^{-/-} sont

toujours capables de greffer des animaux irradiés (revu dans Cottler-Fox et al., Hematology 2003)²³¹.

L'injection dans la circulation systémique d'un adénovecteur surexprimant SDF-1 conduit à une augmentation de ce facteur dans le plasma sanguin, inversant le gradient de concentration qui attirait les CSH du sang vers la moelle osseuse et provoquant une mobilisation des CSH et progéniteurs vers le compartiment sanguin²³². Par ailleurs, la surexpression du récepteur CXCR4 dans des cellules CD34⁺ humaines accroît le potentiel de prolifération, de migration et de repopulation de ces cellules²³³. A l'inverse, la neutralisation de CXCR4 (soit par de fortes doses de SDF-1, soit par un anticorps anti-CXCR4) plonge les CSH dans un état quiescent (revu dans Lapidot and Kollet, leukemia 2002)²³⁴.

Après un stress induisant la perte de cellules hématopoïétiques, les CSH qui expriment CXCR4 à leur surface migrent en suivant un gradient de SDF-1 ; pour ce faire, elles développent des interactions avec les cellules endothéliales et le stroma de type intégrines et sélectines. Les molécules d'adhésion, présentes à la surface des CSH, VLA-4 (*very late antigen-4* ou CD49d), LFA-1 (*Lymphocyte Function-Associated Antigen-1* ou CD11a) et CD44 (HCAM) qui lie l'acide hyaluronique sont impliquées dans la reconnaissance et l'adhésion des cellules qui « roulent » à la surface des cellules endothéliales. Tandis que les molécules d'adhésion E et P-sélectines (CD62E et CD62P), l'intégrine alpha4, et VCAM-1 (*vascular adhesion molecule-1* ou CD106) sont constitutivement exprimées par les cellules endothéliales de la moelle osseuse (revu dans Kopp et al., Physiology 2005)²²². Après l'étape de reconnaissance, principalement initiée par CD62E, CD62P et VCAM-1, l'adhésion définitive est mise en place par VLA-4 et LFA-1. Enfin, l'acide hyaluronique permet de présenter le SDF-1 à son récepteur CXCR4 et d'induire la migration transendothéliale (*figure 21*).

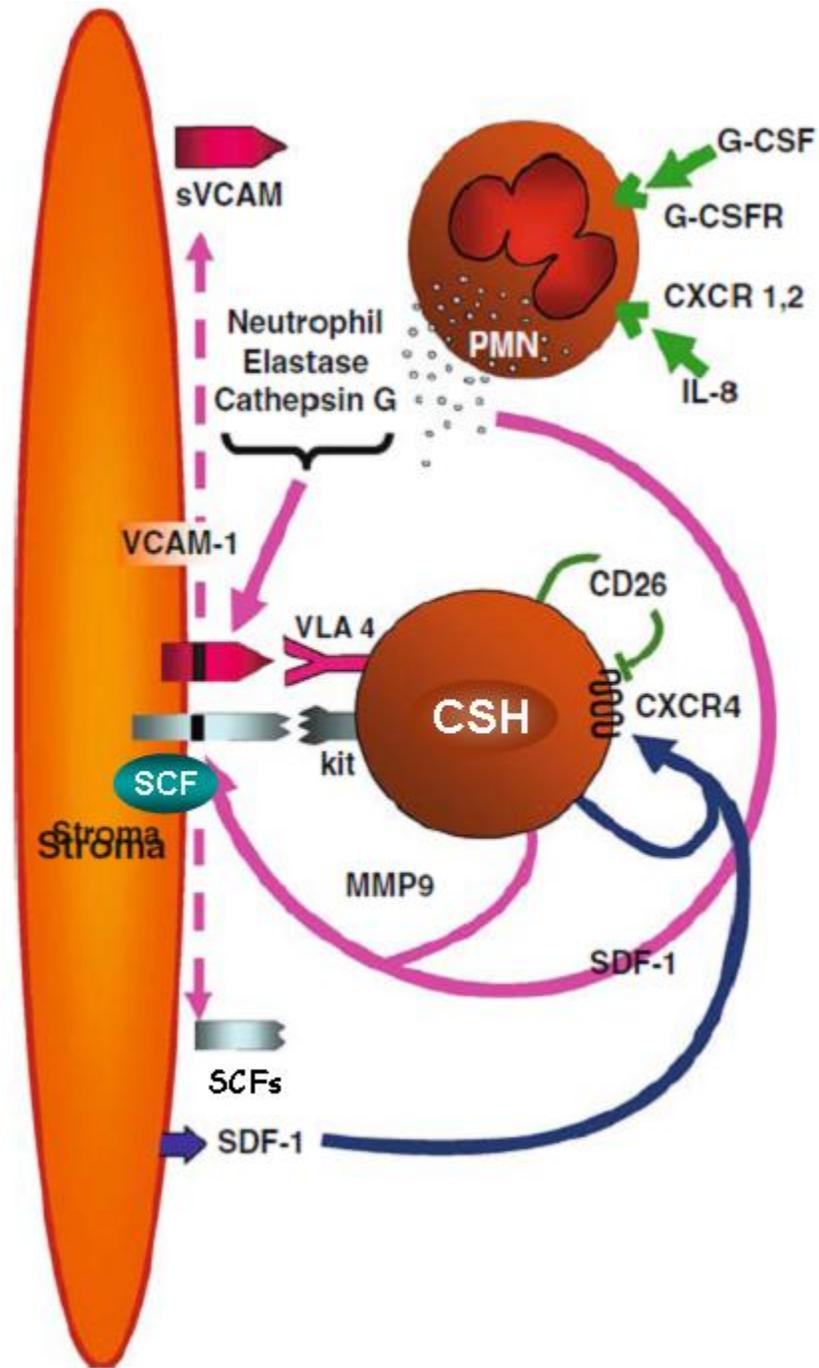


Figure 21 : Mobilisation des CSH induite par le G-CSF

(figure extraite de Moore Hematopoietic Stem Cells dans *Regulatory Networks in Stem cells, Stem Cell biology and Regenerative Medicine*, Editors : V.K. Rajasekhar, M.C. Vemury © Humana Press)

Au sein des niches ostéoblastique et vasculaire, il existe une population de cellules qui exprime de fortes concentrations de SDF-1 : il s'agit des cellules CAR (CXCL-12 *Abundant Reticular*)²³⁵. Ces cellules sont localisées au contact des CSH CXCR4⁺, dans la niche vasculaire et dans la niche ostéoblastique, elles pourraient jouer le rôle de guide et établir un lien entre les deux niches (*figure 22*).

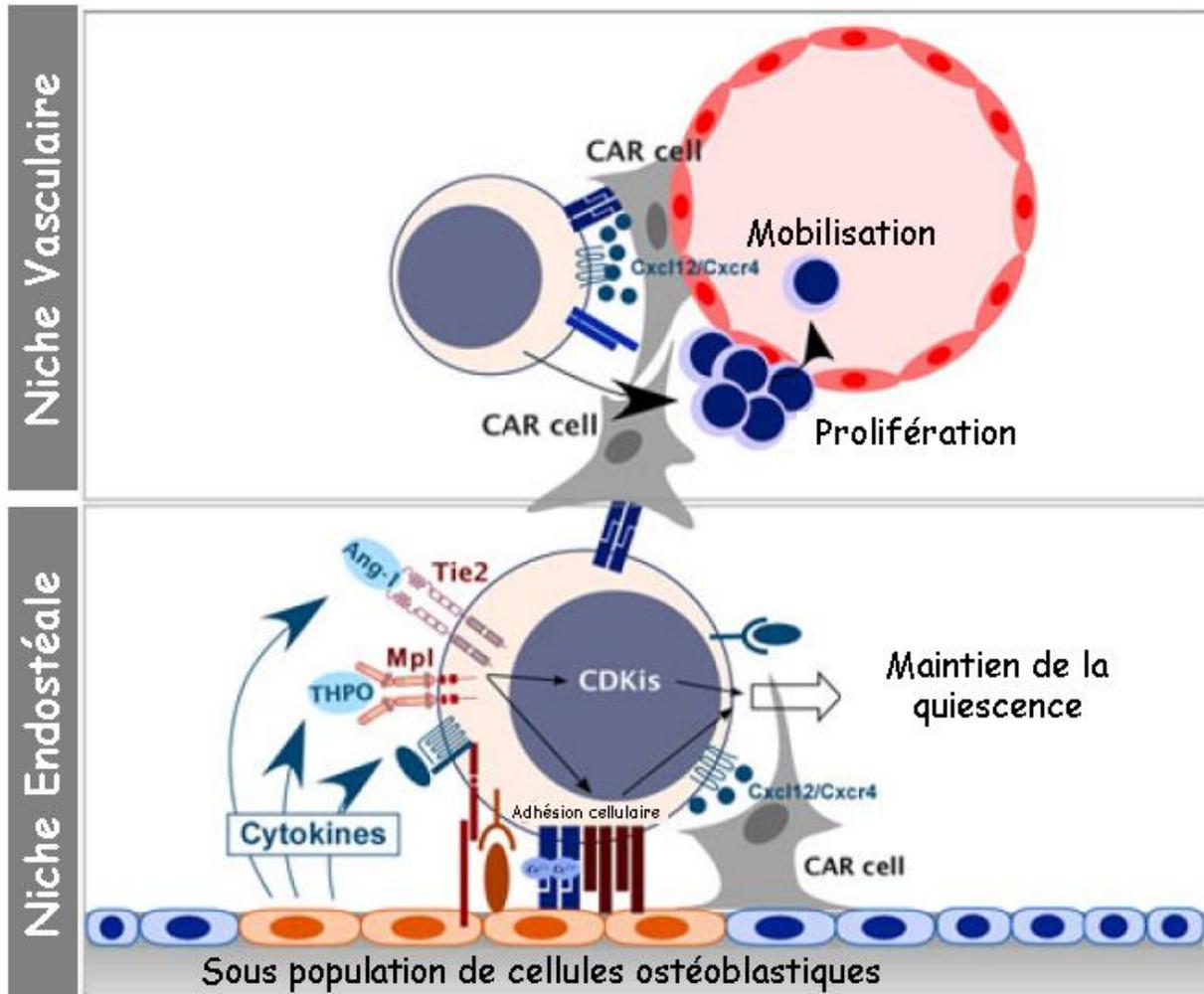


Figure 22 : Signalisation et Niches

Chez l'adulte, les CSH de la MO se localisent dans 2 niches : la niche endostéale et la niche vasculaire. La première assure le maintien des CSH, la deuxième niche est impliquée dans la mobilisation des CSH, entre ses 2 niches il existe une population de cellules appelées les « CAR cell » (*modifiée d'après de Arai et al., Ann N Y Acad Sci. 2009 Niche regulation of hematopoietic stem cells in the endosteum*).

D. HYPOXIE ET STRESS OXYDATIF DANS LA NICHE

Un des éléments clef de la régulation de la niche hématopoïétique est sa nature hypoxique avec des concentrations d'oxygène variant entre 0,1 et 5%. Parmar a montré en 2007 que les CSH dans l'os se trouvaient confinées dans des zones proches de l'anoxie, à l'extrême limite des gradients d'oxygène²³⁶. L'utilisation de la sonde pimonidazole, qui s'active dans les zones hypoxiques, a permis de révéler que la surface de l'endoste est hypoxique et que les cellules de cette région expriment constitutivement HIF-1 α ²³⁷. Des travaux récents de l'équipe de T.Suda confirment la colocalisation, dans la zone définie comme la niche endostéale, de cellules marquées au pimonidazole et au BrdU, les *label-retaining cells* (LRC) mais pas dans la niche vasculaire²³⁸. L'excès de ROS affecte les fonctions des CSH en engendrant un stress oxydant capable d'entraîner des dommages de l'ADN. ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), un régulateur du cycle cellulaire, régule l'activité de quiescence des LT-CSH sans modifier leur capacité de prolifération et de différenciation¹³. Chez la souris *Atm*^{-/-}, le déficit en ATM induit un défaut de l'homéostasie hématopoïétique dû à la perte progressive des fonctions des CSH qui entrent en sénescences. Ce phénomène coïncide avec une élévation de la concentration des ROS, responsable de l'activation de p16 et de la protéine rétinoblastoma (Rb). Les souris *Atm*^{-/-} fournissent donc un bon modèle pour étudier la signalisation des ROS dans l'hématopoïèse. De façon intéressante, les animaux les plus jeunes ne sont pas affectés. De plus, l'augmentation du niveau de ROS dans les CSH active la voie p38 MAPK²³⁹ qui à son tour accroît l'expression de p16 et p19 via MKK3/6 et MAP3K5, qui active ASK1 (*apoptosis signal-regulatory kinase 1*). L'inactivation de MAP3K5 dans les CSH *Atm*^{-/-} restaure la capacité de greffe à long terme dans des tests de transplantation en série. Une telle signalisation redox-dépendante est spécifique des CSH et n'est pas retrouvée dans les progéniteurs plus matures. Le traitement des souris *Atm*^{-/-} par un agent antioxydant tel que le N-Acetyl Cystein (NAC) ou avec un inhibiteur de la voie MAPK permet aux CSH *Atm*^{-/-} de restaurer leur capacité de repopulation et de quiescence. NAC est un précurseur du glutathion (GSH) qui métabolise les ROS, et qui a également pour effet de stabiliser les protéines HIF^{240,241}.

Nous avons vu précédemment (au II-A-1-a) du 1^{er} chapitre) que le triple KO des gènes *Foxo1/3a/4* induit une augmentation de l'apoptose et du nombre de CSH en cycle, suivi d'un défaut de greffe à long terme. Les CSH des souris *Foxo*^{-/-} ont un taux élevé de ROS en

comparaison avec les souris WT, élévation qui peut-être corrélée au changement de profil de gènes régulant les ROS tels que MnSOD (Manganèse Superoxyde Dismutase) et la catalase⁴². Comme pour les souris ATM^{-/-} l'administration aux souris Foxo^{-/-} de NAC ou d'un inhibiteur de la voie p38MAPK permet de restaurer un phénotype WT^{40,41}.

Ces résultats suggèrent que l'augmentation intracellulaire des ROS dans les CSH, causée par le défaut de facteurs tels que Atm ou foxo3a ou tout simplement le vieillissement des animaux, active la voie p38MAPK à l'origine de l'épuisement du pool de CSH quiescentes (*figure 23*)²⁴².

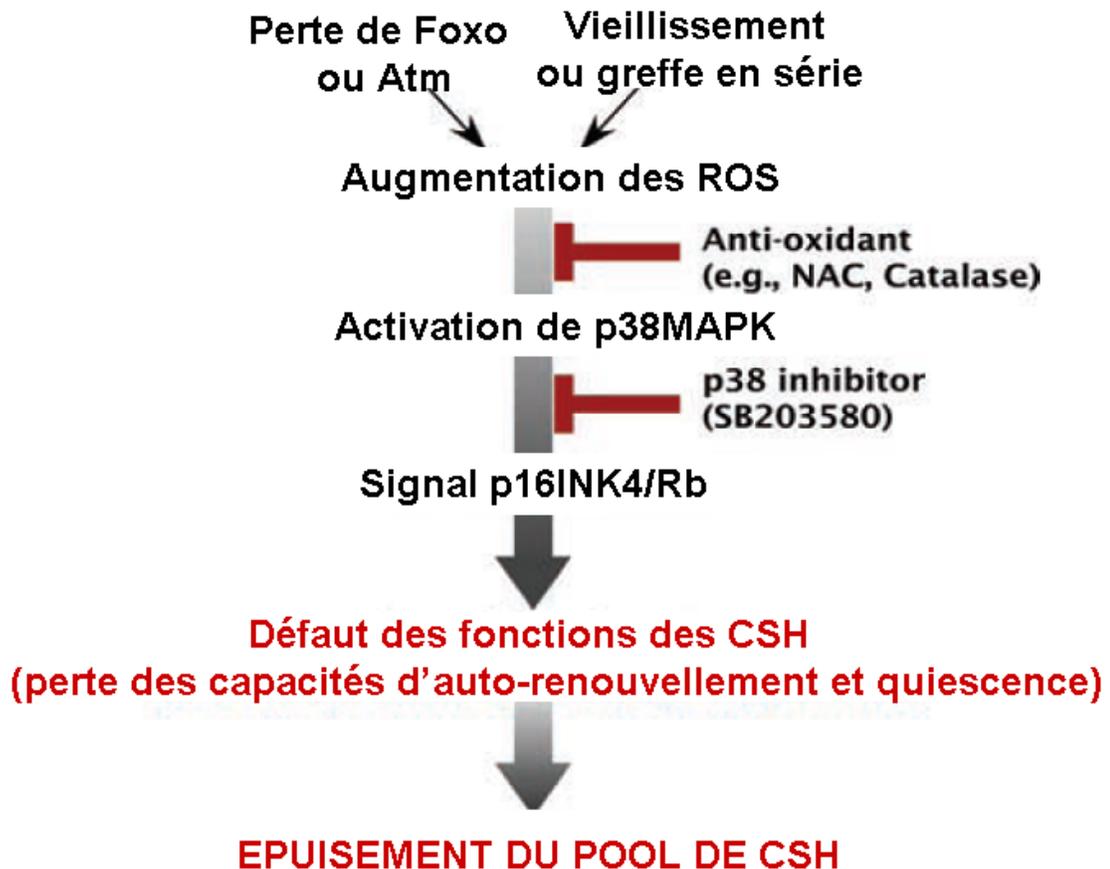


Figure 23 : Stress oxydatif et CSH

La perte de Foxo, d'ATM, le vieillissement ou la transplantation en série, entraînent une augmentation du niveau intracellulaire de ROS dans les CSH. Ces ROS activent la voie p38 et le signal p16 qui sont à l'origine des pertes de fonctions d'autorenouvellement et de quiescence. (*figure adaptée de Arai et Suda, Ann N Y Acad Sci. 2007 Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche*).

Depuis les travaux de Cipolleschi²⁴³ en 1993 sur la culture *in vitro* de cellules de la moelle osseuse, l'oxygène n'est plus seulement perçue comme une molécule essentielle à la survie, elle est devenue un régulateur et un messager de la signalisation cellulaire.

Le taux d'oxygène dans l'air est d'environ 21% (normoxie), cependant la concentration en oxygène dans le corps est très différente et varie d'un organe à l'autre : voir à l'intérieur d'un même tissu. Dans les poumons²⁴⁴, la concentration d'O₂ est de 14%, dans les artères elle se maintient mais diminue dans les artérioles (7%) et les veinules (4%)²⁴⁵⁻²⁴⁷. En théorie, moins un organe sera irrigué et plus faible sera le % d'oxygène distribué — la moelle osseuse (0,1 à 4%)^{248,249}, le cerveau (0,5 à 7%)²⁵⁰, le thymus et la rate (1 à 3%)²⁵¹ —, à l'inverse plus un organe est vascularisé meilleure est sa perfusion en oxygène — le rein (4 à 6%)^{252,253}, l'oeil (5 à 7%)^{254,255}, le coeur (5 à 10%)²⁵⁶ et le foie (4 à 13%)²⁵⁷ — (*figure 24*)

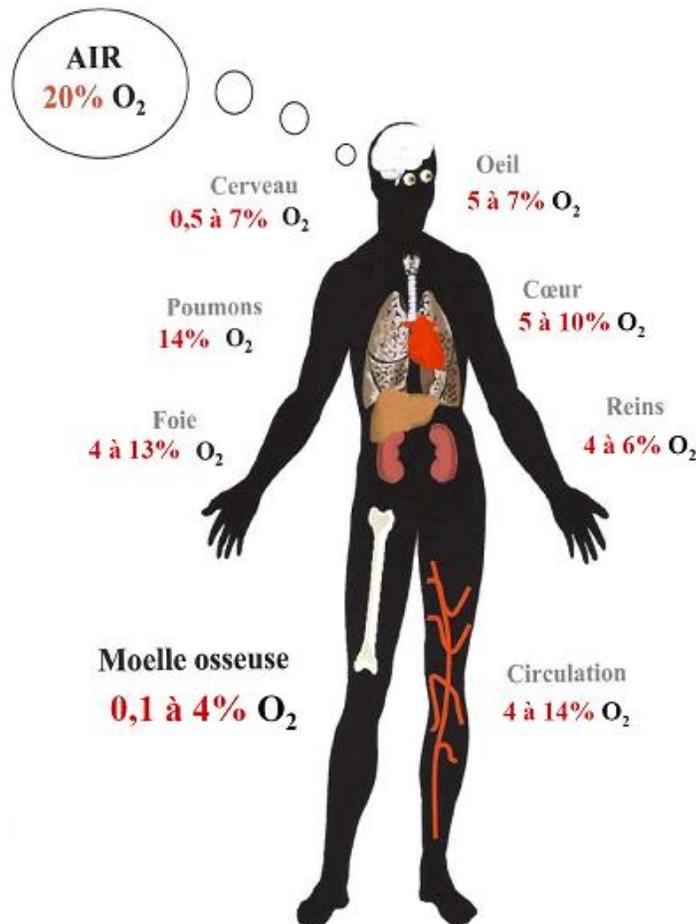


Figure 24 : Concentration en oxygène dans les principaux organes du corps humain
(figure D'après Hermitte F., thèse n°1254 et Debeissat C., thèse n°, Université Victor Segalen Bordeaux 2)

Depuis, il a été confirmé que la culture de CSH à faible concentration d'oxygène (0,1 à 5%), aussi appelée hypoxie, maintient les CSH et accroît leurs capacités de greffe à long terme²⁵⁸⁻²⁶⁰, contrairement à la culture classique effectuée en normoxie. Chow et al. ont suggéré que les CSH devaient être localisées dans un environnement très pauvre en oxygène²⁴⁸. La saturation en oxygène a été analysée dans la MO humaine et a confirmé que l'oxygène diffuse en formant un gradient²⁶¹. Les travaux de Parmar confirment le fait que les CSH et leur niche se localisent principalement à la limite du gradient d'oxygène au sein de la MO, dans des zones hypoxiques proches de l'anoxie²³⁶.

L'ensemble de ces résultats implique que les CSH et progéniteurs sont organisés d'une manière dépendante de l'oxygène et que la disponibilité en oxygène doit contrôler l'hématopoïèse en maintenant des fonctions des CSH telles que le cycle cellulaire, la survie, le métabolisme et la protection contre le stress oxydatif.

IV. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION HIF

A. INTRODUCTION ET GÉNÉRALITÉS

L'oxygène est un puissant stimulus capable de déclencher des mécanismes d'adaptation au niveau des cellules, des tissus et de l'organisme. De faibles concentrations en oxygène sont généralement associées aux ischémies tissulaires, aux phénomènes d'inflammation et à la progression tumorale^{262,263}. Cependant, l'aménagement de microenvironnements hypoxiques contribue fortement au développement de l'embryon et de l'adulte et permet généralement la création de niches qui régulent la différenciation cellulaire^{264,265}. Le clonage et la caractérisation des facteurs de transcription *hypoxia inducible factor* (HIF) ont permis de comprendre par quels mécanismes l'oxygène régule le développement embryonnaire. Ces facteurs sont des hétérodimères formés de deux protéines bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) : une sous-unité alpha sensible aux variations d'oxygène (sauf HIF-3 α) d'environ 120 kDa et une sous-unité beta insensible aux variations d'oxygène de 91-94 kDa, également appelée ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*). Il existe 3 isoformes pour la sous-unité alpha (HIF-1 α , 2 α , 3 α) et 3 paralogues de HIF-1 β (ARNT1, 2, 3), (revu dans Zagorska and Dulak, *Acta Biochimica Polonica* 2004)²⁶⁶. Les deux sous-unités α et β appartiennent à la famille des facteurs de transcription comprenant les domaines bHLH et PAS (*PER-ARNT-SIM*)²⁶⁷. Bien que la structure, la régulation et les fonctions des isoformes de HIF semblent similaires, chaque sous-unité possède ses propres caractéristiques : HIF-1 α est ubiquitaire, alors que, HIF-2 α , 3 α et ARNT2, 3 sont exprimées de manière plus restreinte (*figure 25*). Parmi les sous-unités alpha, le rôle de HIF-3 α est le moins connu, mais il a été montré que le « splicing » alternatif de HIF-3 α inhibe l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α et HIF-2 α , notamment en entrant en compétition pour les coactivateurs p300/CBP de HIF-1 α et HIF-2 α ^{268,269}. En effet, HIF-3 α est un régulateur négatif de la réponse hypoxique et ce sont les autres sous-unités alpha qui assurent la transduction du signal hypoxique.

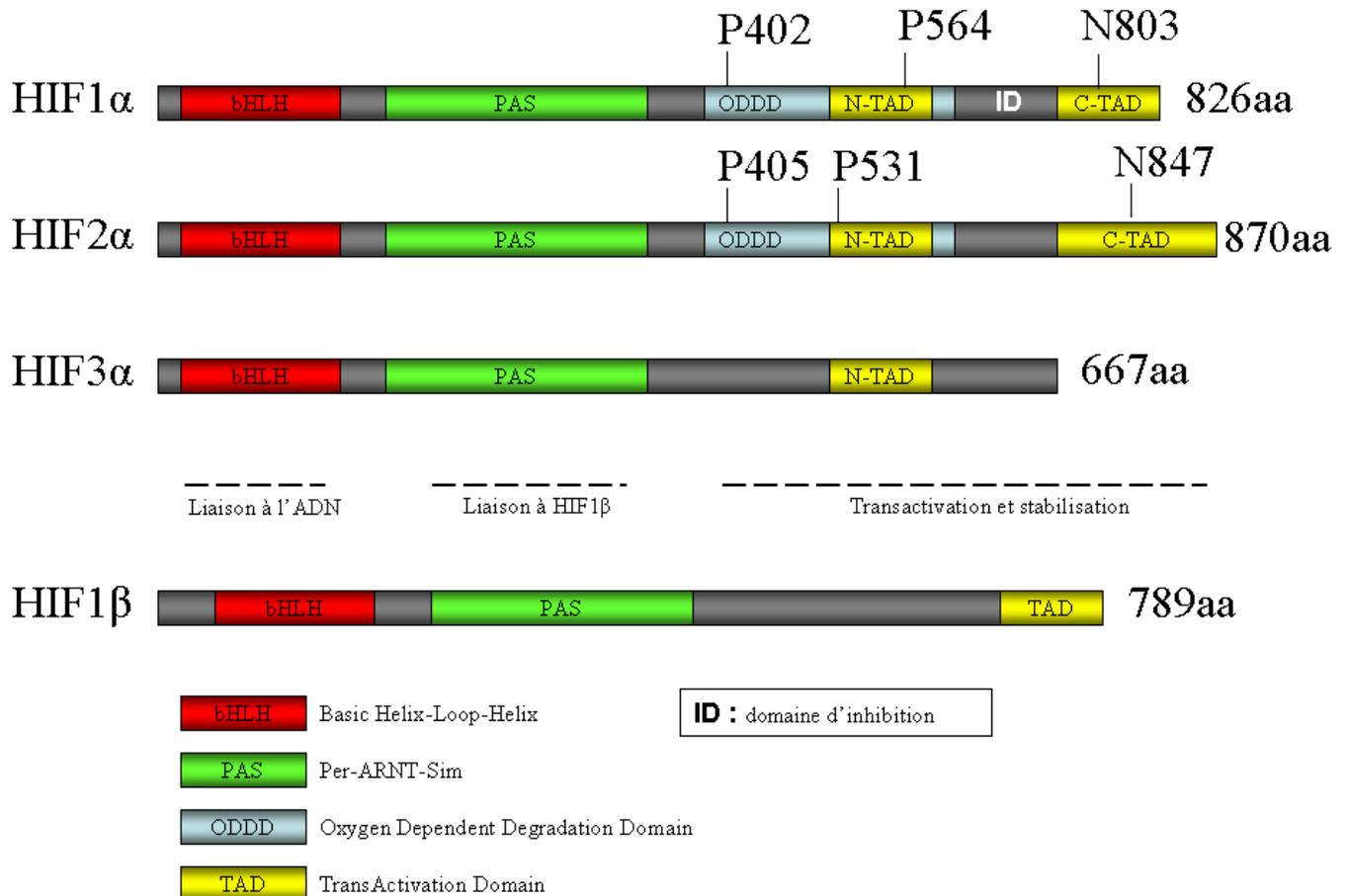


Figure 25 : Structures des facteurs de transcription HIFs

Historiquement, HIF-1 α fut le premier facteur identifié comme liant les éléments de réponse (*enhancers*) de l'EPO et du VEGF²⁷⁰⁻²⁷². Par la suite, HIF-1 α a été impliqué dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques tels que l'angiogenèse, la migration, la survie, le métabolisme glycolytique et la croissance tumorale (revu dans Semenza, Oncogene 2010)²⁷³. Quant à HIF-2 α , initialement détecté dans les cellules endothéliales²⁷⁴, il apparaît avec l'émergence des vertébrés, prédisant un rôle important dans le modelage du squelette^{275,276} et de son microenvironnement²⁷⁷.

Les isoformes HIF-1 α et HIF-2 α , qui présentent une forte homologie, reconnaissent les éléments de réponse à l'hypoxie HRE : (A/G)CGTG présents dans les régions promotrices de respectivement 546 et 143 gènes²⁷⁸. L'inactivation de ces facteurs dans des modèles murins (KO)

a permis de mettre en évidence leurs fonctions et leurs caractéristiques^{279,280}. Ainsi, les souris KO pour HIF-1 α ont un développement anormal du système vasculaire et les embryons meurent au stade E11^{281,282}. Les souris KO pour HIF-2 α meurent peu de temps avant ou après la naissance avec de multiples déficiences d'organes (rétinopathies, stéatoses hépatiques, myopathies, hypocellularités de la MO, azoospermies et anomalies mitochondriales) ainsi que des modifications biochimiques (hypoglycémie, acidose lactique, cycle de Krebs altéré et une dérégulation de l'oxydation des acides gras)²⁸³. Ces différents phénotypes observés chez les souris KO pour HIF-1 α et HIF-2 α indiquent une différence de fonction entre le moment d'expression et le lieu d'expression, impliquant des effets non-redondants de ces facteurs qui ne peuvent être interchangeables sans altérer l'homéostasie de l'organisme²⁸⁴.

1) La structure des facteurs de transcriptions HIF-1 α et HIF-2 α

a) Structure générale

En plus des domaines de liaison à l'ADN (bHLH, 83% d'homologie) et de dimérisation (PAS, 70% d'homologie), ces deux sous-unités alpha partagent un domaine de dégradation dépendant de la concentration d'oxygène (ODDD, dont les 30 acides aminés encadrant les deux résidus proline présentent 70% d'homologie), ainsi que deux domaines de transactivation : le domaine d'activation N-terminal (N-TAD 40% d'homologie) et le domaine d'activation C-terminal (C-TAD 69% d'homologie), tous deux localisés, en C-terminale, dans le domaine TAD. Cette homologie de séquence confère des propriétés communes à HIF-1 α et HIF-2 α ²⁸⁵⁻²⁸⁷. Par exemple, les deux sous-unités alpha, dimérisent avec l'ARNT, sont déstabilisées de la même manière en présence d'oxygène et leur activité transcriptionnelle en C-TAD est régulée par le facteur FIH (*factor inhibiting HIF*) qui hydroxyle un résidu asparagine (N803 pour HIF-1 α et N847 pour HIF-2 α) et bloque le recrutement des co-activateurs p300 et CBP^{288,289}. Cependant, il semble que l'hydroxylation de l'asparagine 847 de HIF-2 α n'empêche que très peu l'activité transcriptionnelle de ce dernier^{290,291}.

b) Les domaines de transactivation N-TAD et C-TAD

Les facteurs HIF-1 α et HIF-2 α régulent l'activité d'un certain nombre de gènes qui leur sont communs et l'activité de gènes cibles spécifiques à chaque facteur. Ainsi, HIF-1 α régule spécifiquement des gènes de la glycolyse tels que PGK (*phosphoglycerate kinase*) et LDHA (*lactate dehydrogenase*) et d'autres gènes tels que la CA IX (*carbonic anhydrase*) et BNIP3 (*Bcl-2 and nineteen-kilodalton interacting protein-3*). Tandis que, HIF-2 α régule spécifiquement l'activité du facteur de transcription OCT4, de la cyclin D1 et du TGF- α (*transforming growth factor- α*). D'autres gènes leurs sont communs, notamment le plus connu d'entre eux, le VEGF-A, mais aussi le GLUT-1, l'ADRP (*adipose differentiation-related protein*), l'ADM (*adrenomedullin*) et le NDRG1 (*N-myc downstream regulated 1*)^{292,293}. En générant des cellules souches embryonnaires qui expriment HIF-2 α au locus de HIF-1 α , leurs différentes fonctions ont pu être étudiées au cours du développement embryonnaire et de la croissance tumorale, et ont permis de montrer que HIF-2 α accroît la croissance de tératomes chez la souris nude^{284,294}.

Hu et ses collaborateurs ont montré que le domaine N-TAD confère aux facteurs HIF leur spécificité de gènes, alors que le domaine C-TAD permet l'expression des gènes communs à HIF-1 α et HIF-2 α ²⁹². En effet, le remplacement du domaine N-TAD de HIF-2 α par celui de HIF-1 α est suffisant pour convertir HIF-2 α en une protéine aux spécificités transcriptionnelles de HIF-1 α . Par ailleurs, leurs travaux prennent en compte l'activité transcriptionnelle en fonction du type cellulaire, par exemple, nous savons maintenant que GLUT-1 est activé par HIF-1 α dans la lignée cellulaire Hep3B et par HIF-2 α dans les 786-O. Cette spécificité d'expression s'explique par la liaison sur le domaine N-TAD de cofacteurs propres à chaque sous-unité alpha et exprimés en fonction du type cellulaire. C'est notamment le cas pour HIF-2 α qui nécessite la participation des facteurs de transcription ELK appartenant à la famille des facteurs Ets afin de transactiver des gènes tels que Cited-2, l'EPO et PAI-1²⁵.

2) La régulation des facteurs de transcriptions HIF-1 α et HIF-2 α

a) Système de dégradation dépendant de l'oxygène

La clef de voûte du système de dégradation des protéines HIF est située dans le domaine ODDD où les prolines 402/564 pour HIF-1 α et les prolines 405/531 pour HIF-2 α sont hydroxylées en présence d'oxygène par trois PHD (*prolyl hydroxylases 1, 2 et 3*) qui sont des dyoxygenases dépendantes de l'oxygène, du Fe(II+) et du 2-oxoglutarate²⁹⁵. Bien que les trois isoformes des PHD soient capables d'hydroxyler les facteurs HIF²⁹⁶, les PHD2 et PHD3 jouent un rôle majeur respectivement dans la régulation de HIF-1 α et HIF-2 α ^{297,298}. La modification post transcriptionnelle entraînée par l'hydroxylation des résidus prolines, permet la fixation d'un complexe d'ubiquitylation composé de la E3-ubiquitin ligase von Hippel-Lindau (VHL), de la cullin 2, et des elongin B et C. Ainsi, en présence d'oxygène, l'ubiquitination de HIF- α mène à sa dégradation par le protéasome 26S²⁹⁹. En hypoxie, les PHD qui sont dépendantes de l'état d'oxydo-réduction du fer sont inactives, permettant la stabilisation et transactivation des gènes cibles de HIF (*figure 26 et 27*).

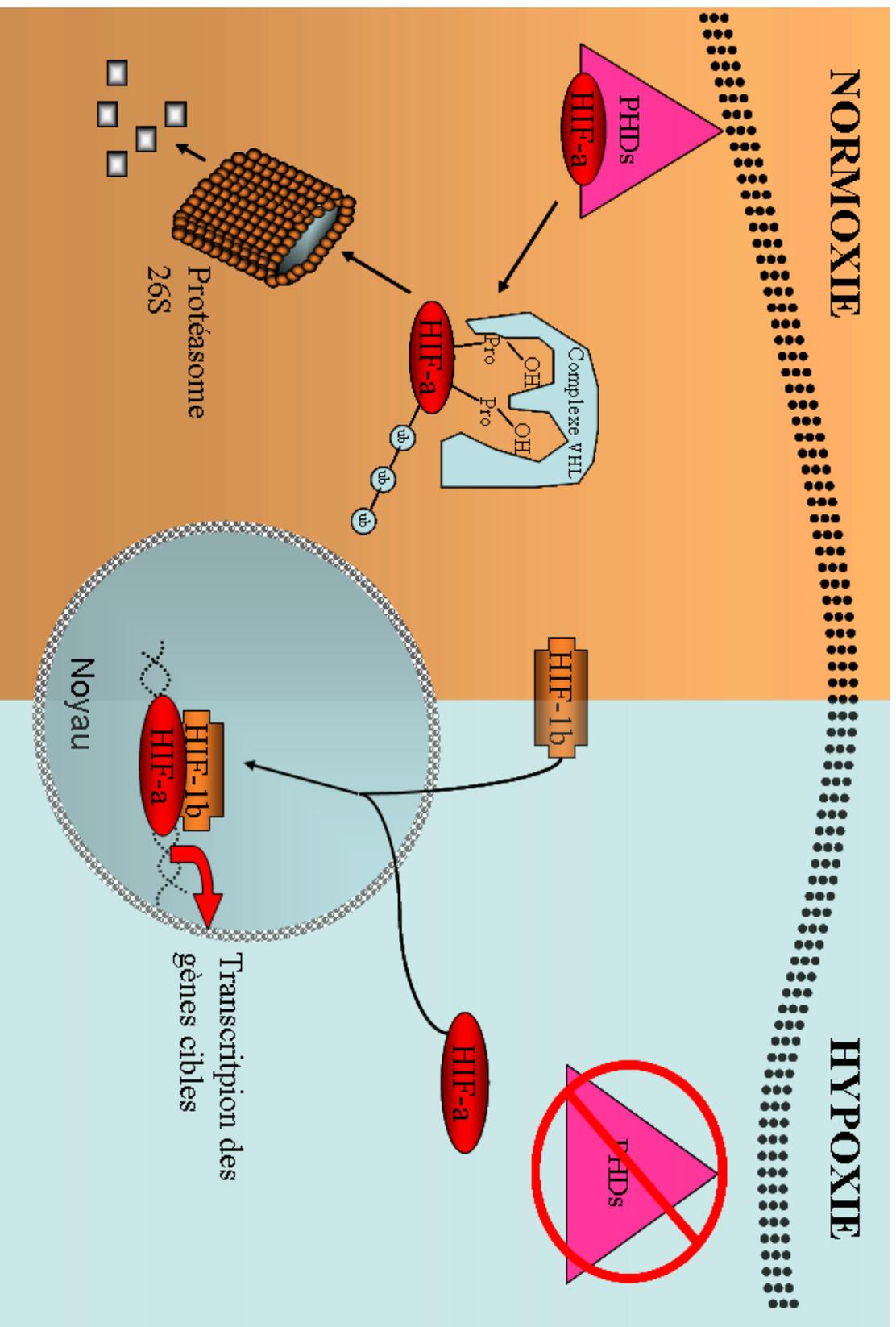


Figure 26 : Dégradation dépendante de l'oxygène, des PHD, du complexe d'ubiquitinylation et du protéasome 26S

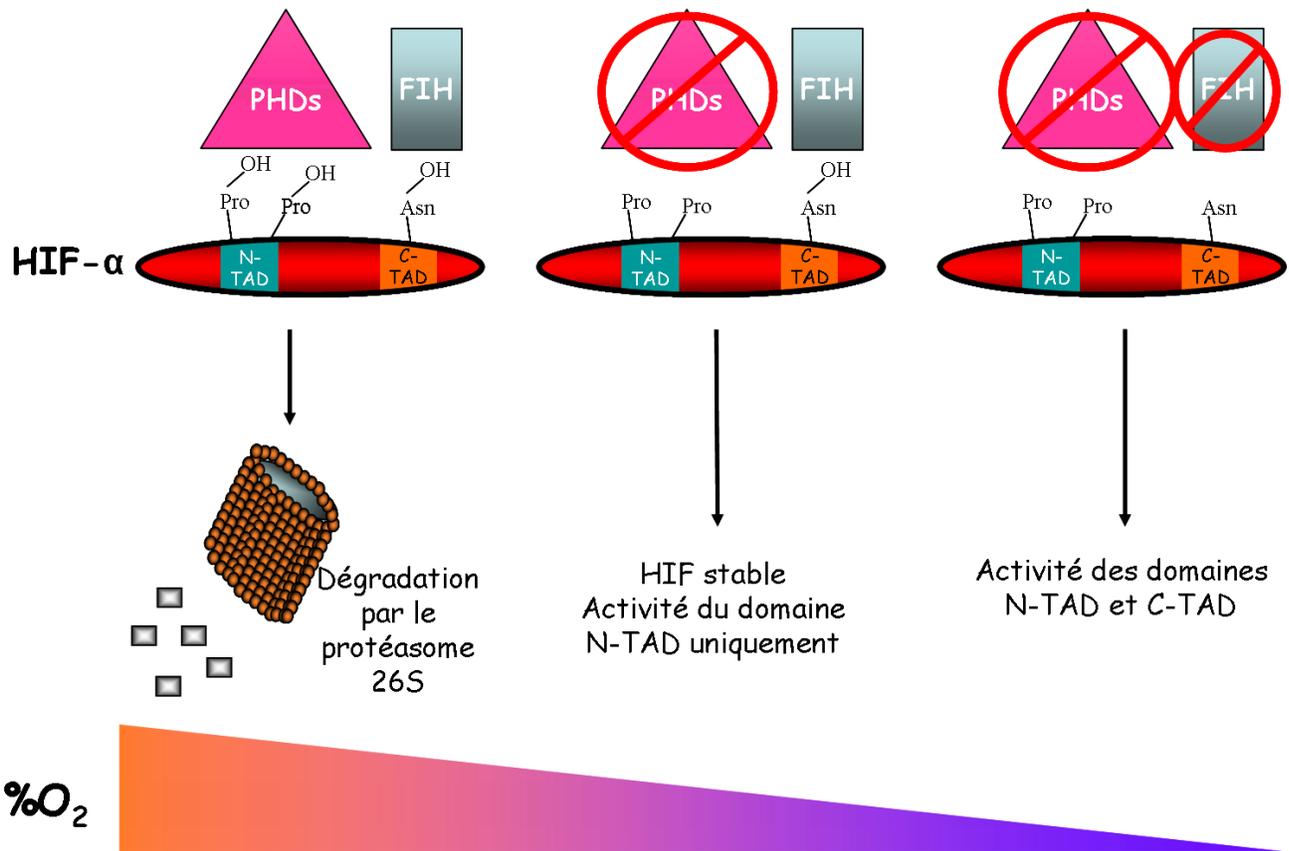


Figure 27 : Activation hypothétique des domaines N-TAD, C-TAD, en fonction du gradient d'oxygène

D'après les différents K_m des PHD et FIH déterminés *in vitro*, ce modèle suggère que lorsque la concentration en oxygène diminue, les PHD perdent en premier leur activité catalytique, alors que FIH hydroxyle toujours le domaine C-TAD. Ce qui mène à la stabilisation des protéines HIF- α et à l'activité du domaine N-TAD. A des concentration en oxygène plus faible, FIH perd son activité catalytique et le domaine C-TAD est déréprimé pour conduire à une activité transcriptionnelle totale (*modifiée d'après Lisy et Peet Cell Death Differ. 2008 Turn me on: regulating HIF transcriptional activity*).

b) Autres systèmes de dégradations

HIF-1 α est un facteur ubiquitaire transcrit et traduit de manière constitutive. Cependant, en normoxie, HIF-1 α possède une demi-vie très courte, inférieure à 5 minutes³⁰⁰. Comme HIF-1 α , HIF-2 α est stabilisé en hypoxie, mais son niveau de protéine augmente lors d'une hypoxie prolongée²⁷⁹, contrairement à celui de HIF-1 α ³⁰¹. En effet, une hypoxie prolongée induit la fixation des facteurs HIF-1 α et HIF-2 α aux HRE d'un antisens naturel de HIF-1 α , l'aHIF qui

déstabilise l'ARNm codant pour HIF-1 α . Un autre rétrocontrôle négatif de l'expression de HIF-1 α passe par l'expression de gènes induits par l'hypoxie comme la PHD2²⁹⁸.

- HSP70 et CHIP

En hypoxie, l'HSP70 lie spécifiquement la protéine HIF-1 α et permet le recrutement de l'ubiquitine ligase CHIP (*carboxyl terminus of Hsc-interacting protein*), entraînant ainsi son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome 26S³⁰² (*figure 28*).

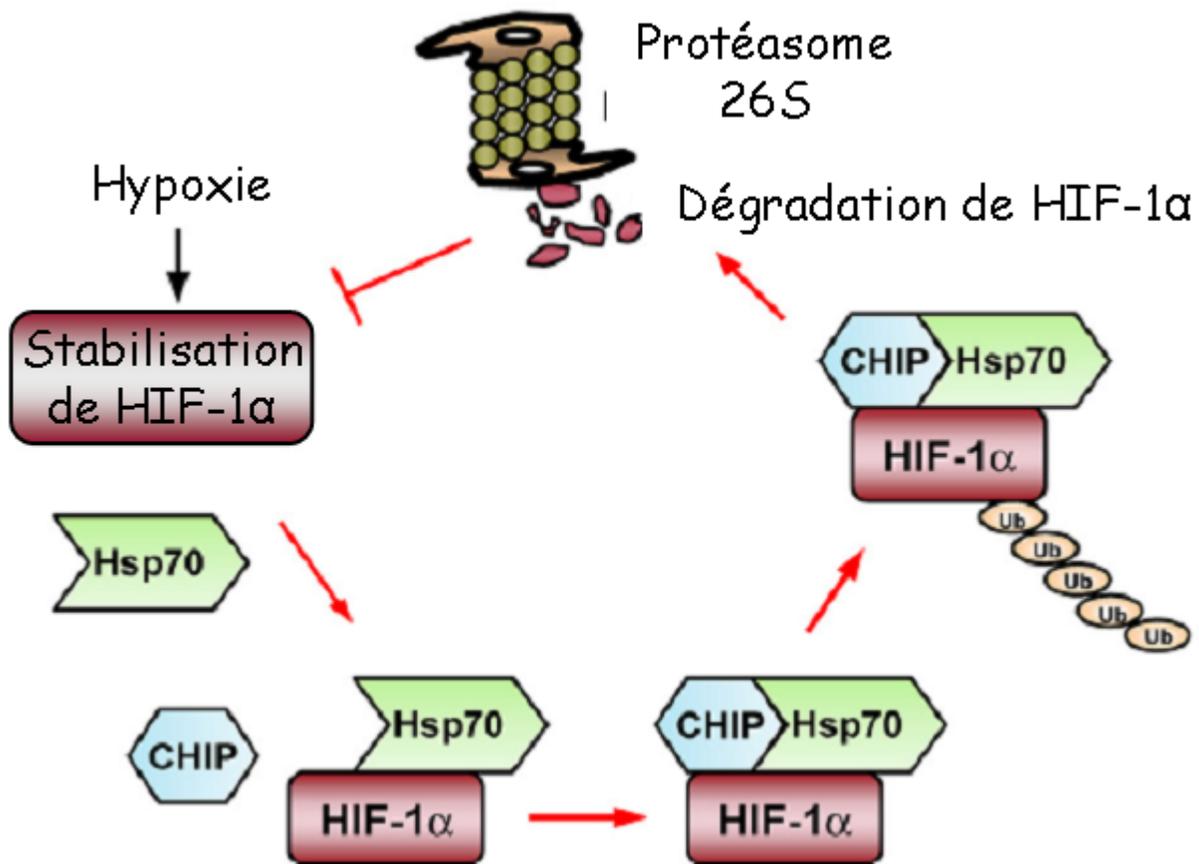


Figure 28 : Ubiquitinylation et dégradation de HIF-1 α dépendantes de l'HSP70 et de CHIP (modifiée d'après Luo et al., JBC 2010 Hsp70 and CHIP selectively mediate ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha but Not HIF-2alpha).

- RACK1

En présence ou absence d'oxygène, RACK1 (*receptor of activated protein kinase C*) entre en compétition avec la protéine chaperonne HSP90 (qui accélère la stabilisation des sous-unités alpha de HIF³⁰³) et lie la protéine HIF-1 α . Cette liaison permet le recrutement d'un complexe d'ubiquitinylation indépendant de VHL et mène à la dégradation de HIF-1 α par le protéasome 26S³⁰⁴ (*figure 29*).

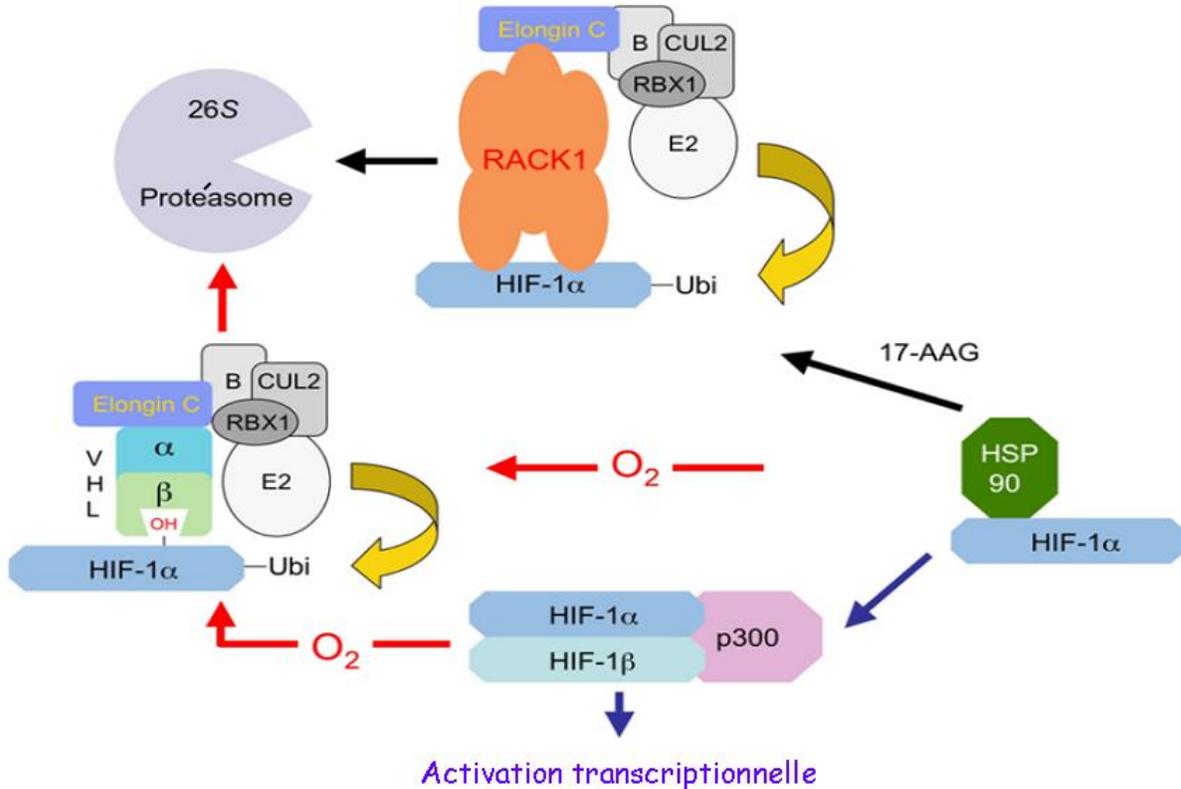


Figure 29 : Mise en parallèle des mécanismes de dégradation de HIF-1 α dépendant et indépendant de l'oxygène

RACK1 entre en compétition avec HSP90 et recrute les elongin B et C. Le complexe d'ubiquitinylation ainsi formé entraîne la dégradation de HIF-1 α (*D'après Liu et al., Mol Cell. 2007 RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha*)

- HAF

HAF (*hypoxia associated factor*), une protéine E3-ubiquitine ligase détectée dans les tissus en prolifération, régule la stabilité de HIF-1 α par ubiquitinylation et dégradation de manière oxygène indépendante. Sa surexpression diminue HIF-1 α et son inhibition l'augmente, sans toutefois modifier le statut de HIF-2 α ³⁰⁵.

- ARD1

ARD1 est une acétyl-transférase, et HIF-1 α est un de ses substrats. Sa surexpression diminue l'expression de HIF-1 α et inversement son inhibition l'augmente. L'acétylation de HIF-1 α accroît son interaction avec VHL et par conséquent sa dégradation³⁰⁶.

- CITED2

CITED2 (*p300/CBP interacting transactivator with ED rich tail 2*) est un régulateur négatif de HIF-1 α qui entre en compétition avec HIF-1 α pour lier p300/CBP^{24,307}. En hypoxie, CITED2 est activé via un HRE, ce qui signifie que cette régulation négative est potentiellement assurée par HIF-1 α lui-même ou HIF-2 α qui est un très fort inducteur de CITED2²⁵.

- IRP1

L'ARNm de HIF-2 α contient dans sa région 5' UTR un IRE (*iron response element*). En normoxie, l'IRE est lié par la protéine IRP1 (*iron regulatory protein 1*) qui empêche la traduction de l'ARNm. En hypoxie, ce complexe est déstabilisé et libère la partie non codante de l'ARNm qui peut alors être traduit.³⁰⁸ Il ne semble pas y avoir d'IRE fonctionnel dans la partie 5' UTR de HIF-1 α (*figure 30*).

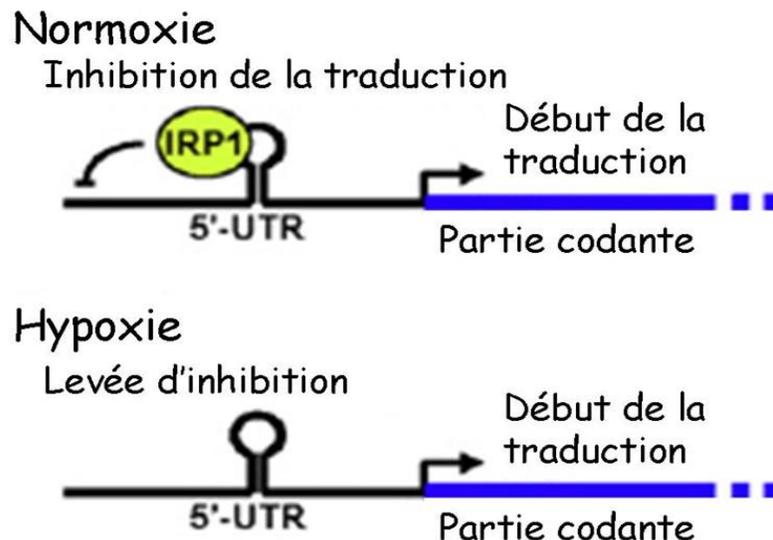


Figure 30 : Répression de HIF-2 α par IRP1

(adaptée d'après Zimmer et al., *Molecular Cell*. 2008 *Small-molecule inhibitors of HIF-2 α translation link its 5'UTR iron-responsive element to oxygen sensing*)

- Int6

Int6 (*translation initiation factor 6*) est un gène suppresseur de tumeur qui lie spécifiquement HIF-2 α en C-terminal. Il existe une forme tronquée, due à l'insertion du MMTV (*mouse mammary tumor virus*) dans la région codante de Int6, le mutant Int6 Δ fonctionne comme un dominant négatif³⁰⁹. La liaison de Int6 avec HIF-2 α induit sa déstabilisation et une dégradation indépendante de VHL, alors que la liaison du mutant stabilise HIF-2 α même en normoxie³¹⁰. De plus, l'utilisation d'un siRNA anti-Int6 suffit à stabiliser HIF-2 α en normoxie et à activer ses gènes cibles (angiopoïétin, Tie 2, fetal liver kinase 1 et VEGFA)^{310,311}.

Il existe d'autres modifications post-transcriptionnelles ou post-traductionnelles capables de modifier le comportement des sous-unités alpha, mais leur rôle n'est pas toujours bien établi.

c) Modification post-traductionnelles

- La phosphorylation

La kinase caséine II phosphoryle la thréonine 796 de HIF-1 α , cette thréonine est adjacente à une leucine en position 795 et forme un motif très conservé entre les différentes sous-unités alpha, chez HIF-2 α , elle a été identifiée en position 844. La phosphorylation a pour effet d'augmenter l'interaction entre C-TAD et p300³¹², en diminuant l'efficacité d'hydroxylation de FIH³¹³.

Les isoformes HIF- α sont également la cible des MAPK p42/44 qui, par phosphorylation, augmentent leur activité transcriptionnelle³¹⁴⁻³¹⁶ et l'interaction avec d'autres facteurs de transcriptions tels que AP-2/Sp1 pour HIF-1 α ³¹⁶. Cependant, il semble que ces modifications n'aient pas un effet direct sur la stabilité de la protéine mais plutôt sur sa capacité d'interaction avec des cofacteurs tels que p300 et CBP³¹⁷. Par ailleurs, l'activation de la voie des MAPK et la phosphorylation des sérines 641/643 de HIF-1 α , une fois dans le noyau, inhibe son exportation extranucléaire et favorise donc son interaction avec ses cofacteurs³¹⁸.

- La sumoylation

La sumoylation régule de manière positive et négative la stabilité de HIF-1 α . L'ajout de groupements SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) sur les lysines 391/477 de HIF-1 α augmente sa stabilité et son activité transcriptionnelle^{319,320}. Cependant, plus récemment il a également été montré le contraire, avec une diminution de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α après sumoylation. Cet effet est expliqué par une augmentation de l'affinité de VHL pour HIF-1 α /SUMO, indépendante de l'hydroxylation des prolines^{321,322}. De façon similaire, HIF-2 α est régulé par sumoylation au niveau de la lysine 394 et sa dégradation est contrôlée par VHL et RNF4³²³.

- La S-nitrosylation

En présence d'acide nitrique, la S-nitrosylation de HIF-1 α sur le résidu cystéine 800 active l'interaction avec p300/CBP et stimule son activité transcriptionnelle^{324,325}. Aucune S-nitrosylation n'a pas encore été établie pour HIF-2 α .

d) Autres systèmes de régulation

Parmi les systèmes de régulation des facteurs HIF, certains sont communs aux deux facteurs, tandis que d'autres agiront spécifiquement sur HIF-1 α ou HIF-2 α , permettant ainsi une spécificité d'expression dépendante des activateurs et cofacteurs des HIF.

- PLD & mTOR

La phospholipase D (PLD) augmente la traduction des facteurs HIF en présence ou non de VHL, ce qui pour effet d'accroître la survie cellulaire, notamment dans les tumeurs RCC (*renal cell carcinoma*)³²⁶. Par ailleurs, le produit de la PLD, l'acide phosphatidique, interagit avec le complexe mTOR et empêche son inhibition par la rapamycine³²⁷. Cette interaction permet l'activation de la signalisation en aval de mTOR. HIF-1 α et HIF-2 α sont respectivement la cible des complexes mTORC1 et mTORC2^{328,329}. Il a été montré que les complexes mTORC1 et 2 activent la protéine HIF-1 α et que AKT3 est nécessaire à cette activation, alors que seule la phosphorylation de AKT2 par mTORC2 active la protéine HIF-2 α . De plus, le complexe mTORC1 est sensible à la rapamycine, tandis qu'il faut une exposition prolongée pour

légèrement modifier l'expression du complexe mTORC2. Cette observation permet d'envisager de nouvelles approches dans le traitement des RCC où HIF-2 α occupe une place centrale. En effet, l'inhibition de HIF-2 α dans des cellules de cancers rénaux est suffisante pour prévenir la formation tumorale³³⁰ (*figure 31*).

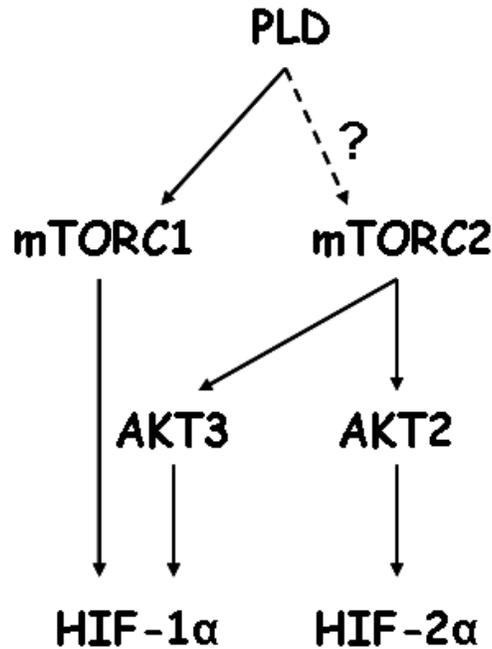


Figure 31 : Régulation de HIF par mTOR

Récemment, la PLD a été identifiée comme un élément essentiel de la mise en place de l'effet Warburg, décrit en 1923 par Otto Warburg comme l'utilisation d'un métabolisme glycolytique par les cellules cancéreuses au lieu des oxydations phosphorylantes retrouvées dans les cellules saines. Cet effet est dépendant de la voie mTOR et, curieusement, la réorientation du métabolisme est fonction du type cellulaire. Par exemple, dans une lignée de cellules cancéreuses mammaires, c'est le complexe mTORC1 via l'activation de HIF-1 α qui est nécessaire à la mise en place de la glycolyse en anaérobie et dans un modèle de carcinome rénale, c'est la voie mTORC2/AKT2/HIF-2 α qui y est indispensable³³¹.

HIF-1 α

- Siah2

Siah2 est une E3 ubiquitine ligase, qui en hypoxie (2 à 5% d'oxygène) a pour cible les PHD 1 et 3. L'inhibition des PHD permet l'accumulation de HIF-1 α et la transactivation de ses gènes cibles. L'activation de Siah2 est rendue possible par la MAPK p38 et AKT³³². C'est l'hypoxie qui, en entraînant la génération de ROS mitochondriaux, est à l'origine de la phosphorylation de p38³³³.

- HSP90

HSP90 régule de manière oxygène indépendante la signalisation HIF-1 α et protège la protéine des mauvais repliements et de la dégradation, en se liant au domaine PAS^{334,335}. L'utilisation d'inhibiteurs tels que la geldanamycine et le 17-AAG (*17-allyl-aminogeldanamycin*) induit une dégradation de HIF-1 α dans des RCC en l'absence même de VHL^{336,337}. Par ailleurs, il semble que le rôle de stabilisateur de l'HSP90 ne se limite pas à HIF-1 α , mais s'étende à ses isoformes HIF-2 α et HIF-3 α ³⁰³.

- HDAC7

HDAC7, une histone désacétylase, forme un complexe avec HIF-1 α . En hypoxie, le complexe formé est transloqué dans le noyau où il lie p300 et déclenche la transcription de gènes cibles tels que VEGF, GLUT-1. La liaison de HDAC7 à HIF-1 α se produit dans le domaine TAD, au niveau d'une zone appelée l'ID (*inhibitory domain*), de cette façon HDAC7 protège HIF-1 α de la dégradation et augmente l'affinité avec p300^{309,338}.

- STAT3

Les protéines STAT sont activées par phosphorylation sur un résidu tyrosine et jouent un rôle important dans de nombreux processus de signalisation comme la réponse aux cytokines, aux facteurs de croissance et aux hormones. L'hypoxie active STAT3 qui accélère l'accumulation de HIF-1 α et prolonge sa demi-vie dans les cellules de tumeurs solides³³⁹. STAT3 interagit avec le domaine C-terminal de HIF-1 α et stabilise HIF-1 α par compétition avec VHL. En effet, la stabilisation de HIF-1 α est due à une diminution de la poly-ubiquitination de HIF-1 α par une

inhibition de l'interaction entre VHL et HIF-1 α , et ce mécanisme fonctionne de manière dose dépendante lors de la surexpression d'une forme active de STAT3³⁴⁰.

- Le calcium

Le niveau intracellulaire de calcium et la calmoduline régule l'activité de la calcineurine, une sérine/thréonine phosphatase. L'activité phosphatase de la calcineurine est nécessaire à la régulation de HIF-1 α , en déphosphorylant RACK1, la calcineurine empêche l'ubiquitinylation et la dégradation de HIF-1 α ³⁴¹. En effet, RACK1 doit être phosphorylé pour se dimériser avec HIF-1 α .

HIF-2 α

- SIRT1

En hypoxie, HIF-2 α est désacétylé et activé par SIRT1 (*sirtuin 1*) une acétylase dépendante du NAD (*nicotinamide adenine dinucleotide*), cette désacétylation permet la transactivation de gènes cibles tels que SOD2, VEGFA et EPO. L'inactivation de SIRT1, en hypoxie, entraîne une accumulation de formes acétylées de HIF-2 α , suggérant que SIRT1 serait la principale désacétylase de HIF-2 α . De plus, des animaux déficients en sirtuin 1 ont une production d'EPO diminuée au stade E14,5, comme on peut l'observer dans des animaux HIF-2 α ^{-/-} ^{342,343}, tandis que la désacétylation de HIF-1 α par SIRT1 réprime l'activité de HIF-1 α ³⁴⁴.

3) Les co-activateurs de HIF-1 α et HIF-2 α

D'autres facteurs que p300/CBP participent à la signalisation dépendante de HIF. Ils peuvent être répartis de manière ubiquitaire et agir en synergie avec les deux isoformes de HIF. Cependant, ils peuvent également permettre de les différencier, soit en fonction des gènes cibles transcrits, soit en fonction d'une expression spécifique du tissu, qui déterminera l'expression des facteurs HIF dans le temps et dans l'espace.

P300/CBP qui lient les sous-unités alpha en C-TAD permettent le recrutement d'autres co-activateurs tels que SRC-1 (*steroid receptor coactivator*), TIF-2 (*transcription intermediary factor 2*), ou Ref-1 (*Redox factor 1*)^{345,346}. Les co-activateurs sont nécessaires à la constitution du

complexe d'initiation de la transcription qui contient l'ARN polymérase II et ils permettent l'acétylation de la chromatine donnant ainsi accès à l'ADN qui sera transcrit en ARN codant.

SRC-1 et TIF-2 appartiennent à la famille des co-activateurs SRC-1/p160, ils possèdent une activité histone acétyl-transférase et sont capables, en conditions hypoxiques, d'interagir avec les domaines TAD de HIF-1 α et d'augmenter son activité transcriptionnelle. Ref-1 est une protéine nucléaire qui contrôle la réduction des cystéines et répare l'ADN grâce à son activité d'endonucléase. Ref-1 agit en synergie avec les co-activateurs du complexe HIF-1 α /CBP/p300/SRC-1/TIF-2 et augmente l'affinité de HIF-1 α pour des gènes cibles tels que le VEGFA^{347,348}. Ainsi, en fonction des co-activateurs qui constituent le complexe de transcription, l'affinité pour tel ou tel gène sera modifiée. Par exemple, dans le cas de l'EPO, ce n'est plus SRC-1 qui est indispensable mais SRC-3³⁴⁹. Il semblerait que l'ensemble de ces co-activateurs soit commun aux deux sous-unités alpha, et que dans ce cas, c'est le type cellulaire ou le tissu dans lequel ils s'expriment qui détermine quel HIF prédominera.

a) Les co-activateurs de HIF-1 α

- STAT3

Dans les cellules saines comme dans les cellules tumorales, l'hypoxie induit l'activation de la protéine tyrosine kinase, Src, qui est nécessaire à la transcription du VEGFA. Src phosphoryle la protéine STAT3 qui lie HIF-1 α et le promoteur du VEGFA, où ils forment un complexe de transcription avec les co-activateurs CBP/p300 et Ref-1. L'inhibition de STAT3 ou de HIF-1 α , par l'emploi de mutants dominants négatifs, inhibe la liaison au promoteur du VEGFA et réduit significativement l'expression du VEGFA³⁵⁰.

- Sp1 & Smad3

HIF-1 α est capable d'interagir avec différents cofacteurs pour activer ses gènes cibles, et l'activation de voies extrinsèques permettent d'augmenter la stabilité des complexes de transcription. Par exemple, le TGF- β via les Smad3/4 va permettre d'augmenter la transcription du gène EPO. Smad3/4 lie un site SBE (*Smad Binding Element*) en aval du HRE de HIF-1 α , qui se trouve mitoyen du site de liaison du facteur tissu spécifique HNF-4 (*orphan hepatic nuclear factor receptor 4*). Ainsi, HNF-4 interagit avec Smad3 et le complexe HIF-1 α . Un quatrième

facteur intervient dans cette interaction, il s'agit du facteur Sp1 qui lie le promoteur de l'EPO situé en amont des éléments de liaison des autres facteurs et permet l'induction optimale de la transcription de l'EPO. Cependant, l'induction est véritablement complète lorsque le TGF- β via les Smads et un repliement de l'ADN permet la liaison entre le complexe HIF et Sp1. Donc Sp1 renforce la coopération entre promoteur et « enhancer », alors que Smad3 permet de stabiliser l'interaction entre le complexe multifactoriel HIF-1 α /Sp1/HNF-4 et le co-activateur CBP/p300³⁵¹ (figure 32).

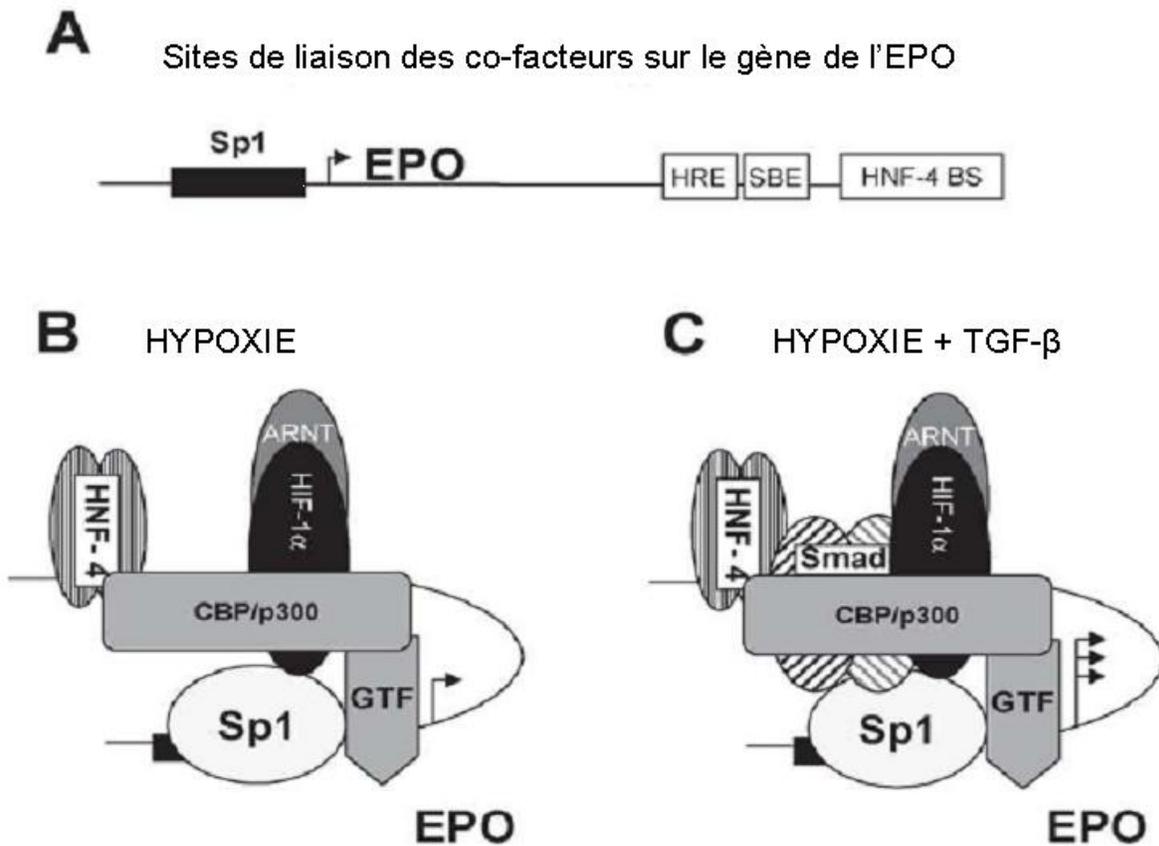


Figure 32 : Répression schématique de la transcription de l'EPO sous stimuli hypoxique et TGF- β

A. Le promoteur proximal de l'EPO et sa région 3' en aval avec quelques sites de liaison (enhancers) les plus pertinents (HRE : hypoxia response element ; SBE : Smad binding site ; HNF-4 BS ; HNF-4 binding site). **B.** Interaction entre le promoteur et les enhancers après un stimulus hypoxique. **C.** Interaction entre le promoteur et les enhancers après des stimuli hypoxique et TGF- β . (Sánchez-Elsner et al., *J Mol Biol.* 2004 *A cross-talk between hypoxia and TGF-beta orchestrates erythropoietin gene regulation through SP1 and Smads*). *GTF* : facteurs de transcriptions généraux.

Cet exemple n'est pas le seul cas où HIF-1 α et Sp1 interagissent. L'interaction entre HIF-1 α et Sp1 a été décrite dans la régulation d'une voie de réparation de l'ADN, appelée MMR (*mismatch repair*). Ces travaux montrent comment l'hypoxie régule le MMR ; il y est décrit que HIF-1 α entre en compétition avec c-Myc pour lier Sp1 et se fixer aux promoteurs de MSH2, une protéine du MMR impliquée dans la reconnaissance des mésappariements et à celui de NBS1 qui reconnaît les cassures doubles brins. La liaison du complexe HIF-1 α /Sp1 réprime l'expression de ces deux protéines et entraîne une instabilité génomique source de mutations et de transformations cellulaires³⁵².

Les structures des facteurs HIF-1 α et HIF-2 α possédant une très forte homologie de séquence, on aurait pu s'attendre à une certaine redondance dans l'activité de ces deux facteurs ; cependant, comme les « knockouts » chez la souris le montrent, ce n'est pas le cas. Cette dichotomie s'explique en partie par la présence de cofacteurs différents.

b) Les co-activateurs de HIF-2 α

- NEMO

HIF-2 α , mais pas HIF-1 α , est capable de lier le facteur NEMO (*NF-Kappa B essential modulator*), et cette interaction renforce le recrutement du co-activateur CBP/p300 et augmente l'activité transcriptionnelle de HIF-2 α , même en normoxie, et ceci de façon dose dépendante³⁵³. Outre le fait de montrer l'interaction de HIF-2 α avec un facteur différent de ceux liés par HIF-1 α , ces travaux sont très importants car ils montrent que les facteurs HIF et notamment HIF-2 α peuvent être activés en dehors d'un environnement hypoxique.

- ETS

Un autre facteur qui interagit spécifiquement avec HIF-2 α est le facteur Ets-1. Le tandem formé de HIF-2 α /Ets-1 lie et active fortement le promoteur du VEGFR2 dans les cellules endothéliales³⁵⁴.

ELK-1, un membre de la famille des facteurs de transcription ETS, interagit avec HIF-2 α . Ainsi, une étude menée sur 11 gènes transactivés par HIF-2 α , dans des MCF-7, montre que 10 de ces gènes possèdent à proximité du HRE un site de liaison des facteurs ETS²⁵. L'interaction de

HIF-2 α avec ELK-1 permet donc l'expression de gènes tels que CITED2, WISP2, EPO, IGFBP3 (*insulin-like growth factor binding protein 3*) et PAI-1 (*plaminogen activator inhibitor 1*)^{25,292}.

4) Le rôle antagoniste des facteurs HIF dans la signalisation c-Myc

c-Myc joue un rôle central dans la croissance cellulaire en régulant cyclines et leurs inhibiteurs. La stabilisation de HIF-1 α en hypoxie bloque la prolifération cellulaire en inhibant l'activité transcriptionnelle de c-Myc³⁵⁵, tandis que la stabilisation de HIF-2 α a l'effet opposé, et accroît la prolifération cellulaire en augmentant les capacités transcriptionnelles de c-Myc³⁵⁶.

Ces effets sont dus à la stabilisation et déstabilisation du complexe transcriptionnel de c-Myc. Le domaine PAS de HIF-1 α lie Sp1 et empêche son interaction avec c-Myc, diminuant ainsi l'interaction de c-Myc avec son promoteur. Les gènes cibles de c-Myc s'en trouvent réprimés comme c'est le cas pour p21 ou encore MSH2 et NSB1, décrit précédemment³⁵⁷.

Dans le cas de HIF-2 α , la PDK1, une kinase, phosphoryle son domaine PAS sur la thréonine 324 ; cette modification post-traductionnelle bloque l'interaction avec Sp1³⁵⁷. Cependant, HIF-2 α forme un complexe avec Max, une sous-unité du complexe de transcription de c-Myc. Cette interaction augmente la stabilité du complexe de c-Myc et ses effets sur le cycle cellulaire, améliorant ainsi l'expression de la cyclin D2, de E2F1, tout en réprimant celle de p21 et p27³⁵⁶ (*figure 33*).

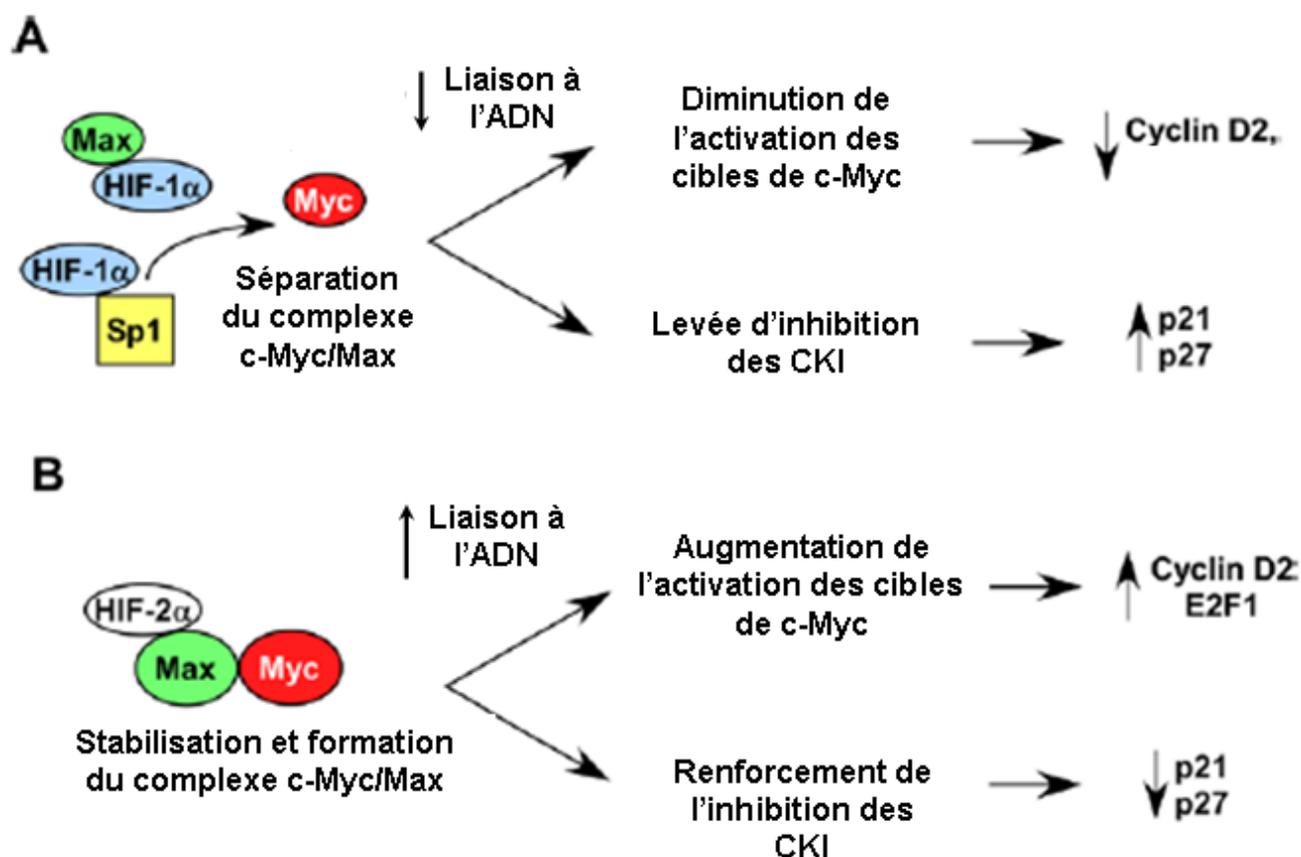


Figure 33 : Représentation de l'axe HIF/c-Myc

A. HIF-1 α réprime la signalisation c-Myc en déstabilisant son complexe transcriptionnel **B.** HIF-2 α renforce la signalisation c-Myc en favorisant la stabilisation et formation du complexe transcriptionnel c-Myc/Max. (adaptée de *Gordan et al., Cancer Cell. 2007 HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation.*).

Les facteurs HIF sont régulés de nombreuses façons, soit par l'environnement, soit par des interactions protéines/protéines. Ces interactions sont déterminantes dans l'activation spécifique de HIF-1 α ou de HIF-2 α . Récemment, il a été montré que des cytokines essentielles au maintien et à l'expansion des cellules souches permettent de stabiliser, en normoxie, les facteurs HIF.

En normoxie, après 24 heures de traitement au SCF, les cellules MO-7e (une lignée hématopoïétique) se mettent à exprimer de manière stable les facteurs de transcription HIF-1 α et HIF-2 α qui sont transcriptionnellement actifs³⁵⁸. La TPO joue également ce rôle dans les cellules

primitives de la moelle osseuse de souris. La TPO accroît la production de ROS mitochondriaux et permet la stabilisation, en normoxie, de HIF-1 α ³⁵⁹.

Ainsi, les facteurs de transcription HIF sont stimulés, par l'hypoxie et par de nombreux facteurs environnementaux ou sécrétés, tels que des facteurs de croissance essentiels au maintien des cellules souches. L'étude des mécanismes de croissance et progression tumorale a révélé une forte activation des facteurs HIF, qui contrôlent le métabolisme cellulaire, la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, l'invasion cellulaire (métastase, EMT : *Epithelial mesenchymal transition*) et la différenciation^{273,360}.

B. PRINCIPALES VOIES DE SIGNALISATION DEPENDANTES DE HIF

1) Les facteurs HIF sont les principaux médiateurs de l'angiogenèse

La disponibilité en oxygène et en nutriments est essentielle à la croissance tumorale. Le rayon de diffusion de l'oxygène, à partir des vaisseaux sanguins, étant de 100 μ m, les cellules tumorales doivent développer de nouveaux réseaux sanguins : c'est l'angiogenèse tumorale³⁶¹. Pour basculer vers un phénotype pro-angiogénique, la tumeur doit activer un nombre important de gènes, dont la grande majorité est sous le contrôle des facteurs HIF. Les principaux facteurs sous la dépendance des facteurs HIF sont : le VEGF et ses récepteurs dont l'activation est commune à HIF-1 α et HIF-2 α , les facteurs PDGF-B (*platelet-derived growth factor B*) et les MMP-2 et 9 activés par HIF-1 α et les gènes dépendants de HIF-2 α , l'EPO, le PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*), les angiopoïétines 1 et 2 et le récepteur Tie2^{362,363}.

2) La prolifération et les facteurs HIF

HIF-2 α joue un rôle important dans la croissance tumorale, non seulement en facilitant l'accès de l'oxygène et des nutriments au cœur de la tumeur, mais aussi en augmentant la prolifération des cellules tumorales³³⁰. HIF-2 α favorise l'entrée des cellules tumorales dans le cycle cellulaire en contrôlant l'expression du TGF- α et de la cyclin D1 (CCND1) qui régulent la croissance cellulaire et sont fréquemment surexprimés dans les tumeurs^{293,364}. Il reste à

déterminer si l'activation de ces deux facteurs est un effet direct ou indirect de l'activation de HIF-2 α . Une autre voie de régulation de la prolifération passe par l'interaction entre HIF-2 α et c-Myc que l'on a décrit précédemment³⁵⁶. De plus, HIF-2 α accroît l'efficacité de traduction de l'EGFR (*epithelial growth factor receptor*) dont l'accumulation permet une croissance tumorale autonome, grâce à un effet autocrine³⁶⁵.

HIF-1 α n'a pas une action directe sur la croissance cellulaire, cependant en contrôlant la production d'IGF-2, une hormone de croissance, et l'expression de BNIP-3, impliqué dans les mécanismes d'autophagie induit en hypoxie, HIF-1 α accroît la progression tumorale^{366,367}.

3) Les facteurs HIF régulent le métabolisme cellulaire

Les tumeurs ont un métabolisme accru orienté vers la glycolyse plutôt que vers les oxydations phosphorylantes. Cet état, appelé effet Warburg, diminue la respiration mitochondriale et accroît la production de lactate et requiert une activité enzymatique soutenue avec un afflux important de glucose. Un certain nombre des gènes du métabolisme et du transport du glucose sont sous la dépendance du facteur HIF-1 α . Il permet notamment l'expression de GluT-1, de la LDHA, de PGK et de l'aldolase A³⁶⁸. HIF-1 α peut également réguler négativement la masse mitochondriale en activant un répresseur de c-Myc, MXI-1³⁶⁹.

Ce métabolisme accru a pour effet de diminuer le pH du microenvironnement tumoral en libérant des métabolites acides que la perfusion sanguine ne suffit pas à éliminer. Les cellules tumorales qui se retrouvent dans cet environnement acide, doivent lutter pour maintenir un pH intracellulaire viable. L'activation de HIF-1 α permet l'expression à la surface des cellules tumorales de la CA IX (*carbonic anhydrase IX*) dont l'activité contribue à la désacidification du milieu intracellulaire et à l'acidification du milieu extracellulaire, en catalysant la conversion de l'H₂O et du CO₂ en H⁺ et HCO₃⁻³⁷⁰.

Une autre conséquence d'un métabolisme accru est la génération d'une quantité importante de ROS capable de provoquer des cassures de l'ADN. Afin de lutter contre un excès de ROS, les cellules saines et tumorales activent des enzymes anti-oxydantes. Cette activation est sous la dépendance de HIF-2 α qui permet l'expression des enzymes Gpx 1 et 8 (Glutathione peroxidase), SOD1 et 2, et catalase. En effet, les souris HIF2^{-/-} présentent une réduction d'expression des enzymes anti-oxydantes primaires et une dégénérescence mitochondriale²⁸³. Par

ailleurs, l'induction de ROS dans des cellules tumorales déficientes en HIF-2 α provoque un arrêt du cycle cellulaire et une mort cellulaire dépendante de p53³⁷¹ (figure 34).

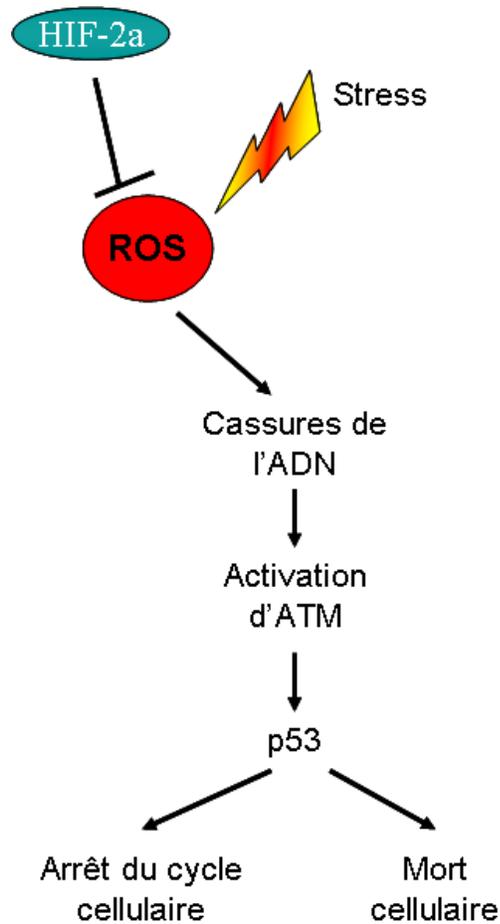


Figure 34 : Représentation de l'axe HIF-2 α /p53

(modifiée d'après Bertout *et al.*, *PNAS*. 2009 *HIF2alpha inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses*).

4) Rôle des facteurs HIF dans le processus de métastase

Le processus de métastase est composé d'une succession d'étapes (dégradation de la MEC, inflammation, invasion tissulaire et EMT : *epithelial mesenchymal transition*) qui permettent à la tumeur originelle de coloniser d'autres tissus ; les métastases sont les principales cause de mortalité des cancers. L'activation des facteurs HIF corrèle avec la présence de métastases dans de nombreuses tumeurs car ils permettent l'activation de gènes directement liés

aux processus de métastase : E-cadhérine, lysyle oxydase (LOX), CXCR4, SDF-1, Snail et TWIST^{228-230,372-376}. L'inflammation modifie le réseau sanguin en régulant sa tonicité et sa pression, rendant plus accessibles les vaisseaux sanguins aux cellules tumorales. Ainsi, la stabilisation de HIF-1 α induit l'expression de gènes qui contrôlent cette tension vasculaire, tels que, l'adrénomedulline (ADM), l'iNOS (*nitric oxide synthases*), et la cytokine pro-inflammatoire IL-8 (revu dans Hickey et Simon³⁶³). Cependant, l'étape essentielle du processus de métastase est l'EMT. L'EMT augmente la mobilité des cellules en diminuant les interactions cellules/cellules et cellules/MEC. La répression de l'E-cadhérine par les facteurs HIF³⁷³ déstabilise les interactions cellules/cellules et libère les cellules tumorales qui peuvent rejoindre la circulation sanguine grâce à l'activation par l'axe HIF/Notch des protéines TWIST et Snail^{374,377}. L'interaction entre le récepteur CXCR4 et son ligand SDF-1 permet une migration dirigée des cellules tumorales qui métastasent (*figure 35*).

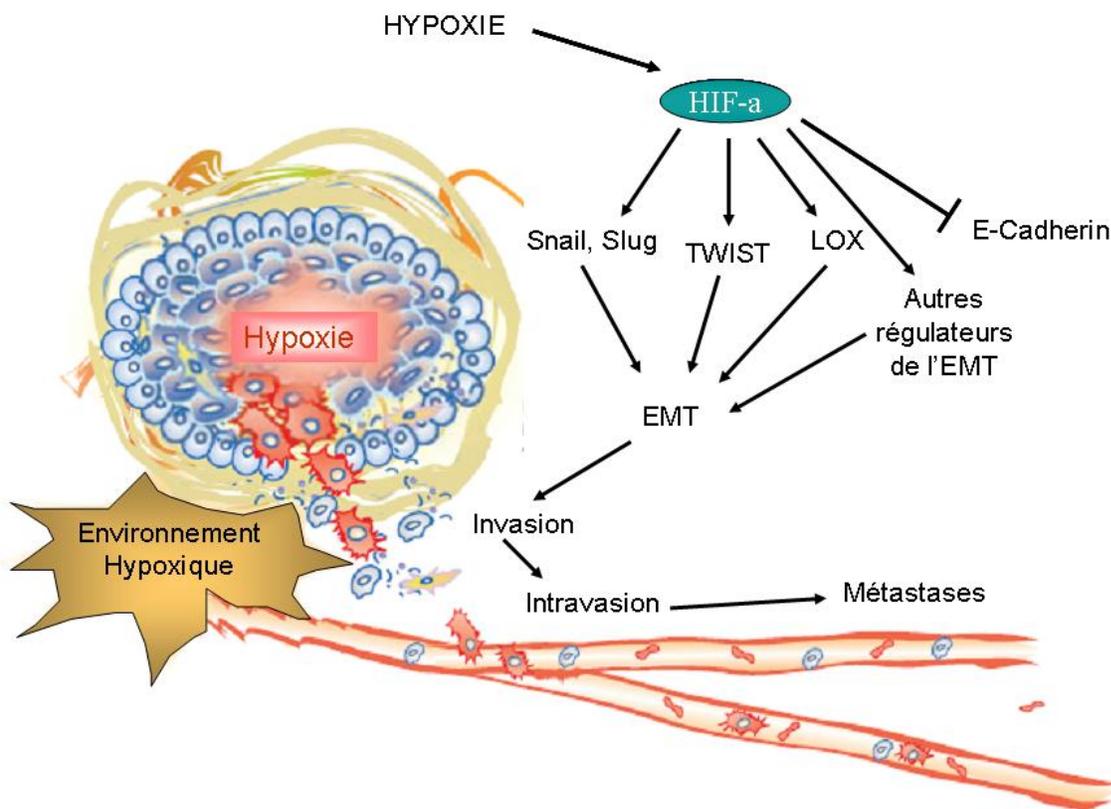


Figure 35 : Régulation de l'EMT par les facteurs HIF

(Modifiée d'après de Peinado et Cano, *Nature Cell Biology*. 2009 *A hypoxic twist in metastasis*).

5) Différenciation

On retrouve, dans les cellules tumorales, une petite population de cellules qui présente les caractéristiques de cellules souches : ce sont les cellules souches cancéreuses. Ces cellules sont maintenues dans un état indifférencié et sont capables d'autorenouvellement et de différenciation³⁷⁸. Elles sont à l'origine des résistances aux agents chimiothérapeutiques et des rechutes, en permettant *de novo* la croissance tumorale. L'hypoxie est capable de maintenir et de stimuler un phénotype cellulaire indifférencié³⁷⁹⁻³⁸¹. Cet effet est en grande partie dépendant de l'interaction des facteurs HIF avec la voie de signalisation Notch^{379,382}, mais il requiert également la transactivation directe, par les facteurs HIF, de gènes impliqués dans le maintien des cellules souches²⁹⁴. Des études menées par l'équipe de M.C. Simon montrent que OCT4, un des facteurs majeurs du maintien des cellules souches est exclusivement activé par HIF-2 α ²⁹⁴. De plus, les tumeurs dérivées de cellules ES surexprimant HIF-2 α possèdent un phénotype très indifférencié.

Alors que HIF-1 α , la première sous-unité alpha identifiée, a été largement décrite, le rôle de HIF-2 α dans le développement et la tumorigenèse révèle des fonctions biologiques différentes, voire antagonistes, entre les deux protéines (*figure 36*). On sait aujourd'hui que HIF-2 α est responsable d'hypertension pulmonaire, de polycythémie (maladie de Chuvash) et d'anémie^{383,384}. La surexpression des facteurs HIF est un évènement fréquent dans les cancers humains et est souvent associée à de mauvais pronostics vitaux. Cependant, il ne s'agit pas d'un évènement précoce : les facteurs HIF ne sont pas stabilisés par gain de fonction mais plutôt par des évènements externes comme la perte de fonction du gène suppresseur de tumeur VHL. Toutefois, si aucune mutation stabilisatrice de HIF-1 α n'a encore été identifiée, il existe des mutations connues de HIF-2 α , qui interviennent dans le domaine ODDD (G537W, G537R, M535V, P534L et D539E) et sont à l'origine d'érythrocytoses familiales³⁸⁵⁻³⁸⁷. L'ensemble de ces mutations se trouve dans le voisinage de la proline 531 et « gênent » la liaison du complexe d'ubiquitinylation et donc ralentissent la dégradation de HIF-2 α .

De plus, HIF-2 α régule l'EPO chez l'adulte³⁸⁴, contribue au phénotype agressif des tumeurs³⁶⁰, maintient les neuroblastomes³⁸² et gliomes³⁸⁸ dans un état indifférencié, et joue un rôle majeur dans l'homéostasie des ROS²⁸³. Ainsi, les facteurs HIF-1 α et HIF-2 α , qui ont pour cible

plus d'une centaine de gènes, semblent être de bons candidats pour l'étude du maintien des cellules souches dans leurs niches hypoxiques.

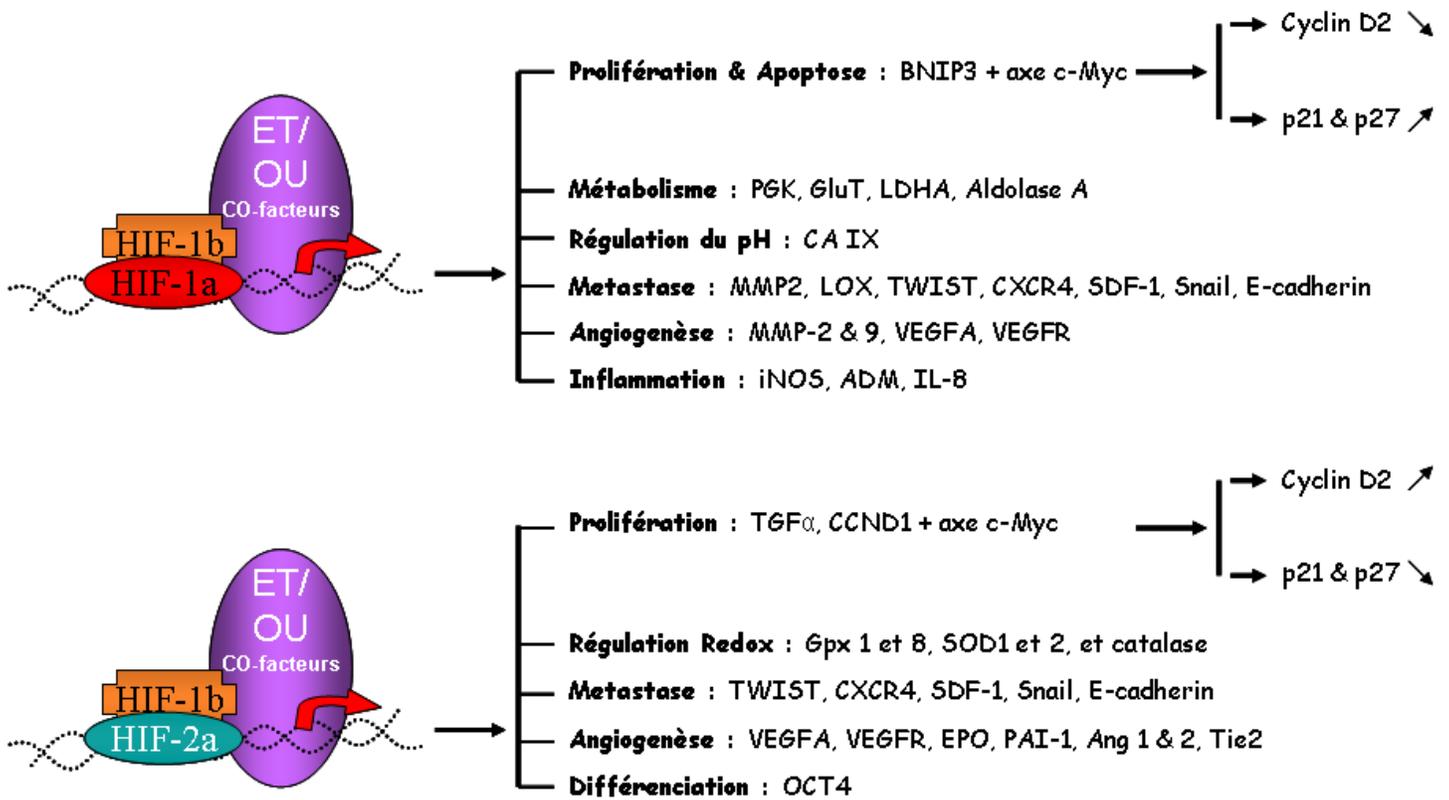


Figure 36 : Processus physiologiques et pathologiques dépendant de HIF-1α et HIF-2α
A. Signalisation dépendante de HIF-1α **B.** Signalisation dépendante de HIF-2α

C. HIF ET LES CELLULES SOUCHES

La présence de faibles concentrations d'oxygène dans les niches participe au maintien des cellules souches^{243,389}. L'hypoxie accroît le potentiel de greffe des CSH^{390,391}, et permet la conservation d'un phénotype primitif des CSH^{154,392}.

1) HIF et les cellules souches

Les cellules souches sont gouvernées par des grandes voies de signalisation (Notch, Wnt) et l'activation de facteurs de transcription capables de les maintenir dans un état indifférencié.

a) HIF régule la différenciation via Notch

Gustafsson a montré que l'hypoxie modifie directement l'activité de Notch³⁷⁹. L'hypoxie induit l'accumulation Hes1 et Hey2, qui sont des cibles directes de Notch. Hes1 est également exprimé en présence de chlorure de cobalt, un chélateur du fer qui inhibe l'activité des PHD et stabilise les protéines HIF. De plus, le domaine intracytosolique de Notch (ICD) interagit avec HIF-1 α et augmente sa stabilité³⁷⁹. Par ailleurs, même si les données concernant une éventuelle interaction entre ICD et HIF-2 α sont rares, les travaux de Pietras montrent que l'inhibition de HIF-2 α , dans les cellules souches tumorales du neuroblastome, diminue l'expression de Hes1 et de Hey1 et provoque la différenciation de ces cellules³⁸². Etant donné le rôle de HIF dans la régulation des effecteurs de la voie Notch, une niche hypoxique devrait optimiser l'activité de la voie Notch et renforcer l'inhibition de la différenciation et ainsi contribuer au maintien des CSH (*figure 37*).

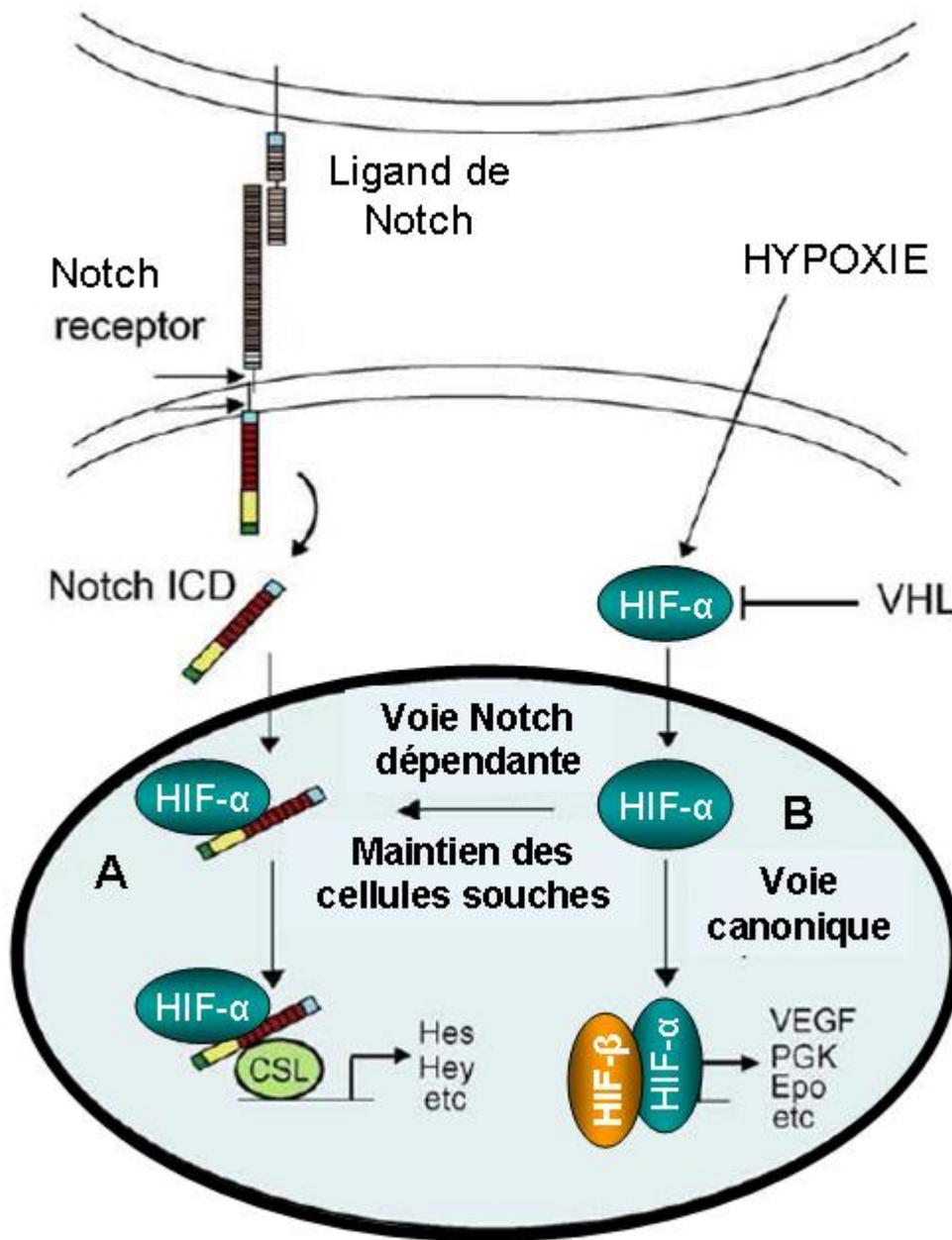


Figure 37 : Représentation schématique de la voie de signalisation HIF/Notch

A. Voie dépendante de Notch, CSL = protéine de liaison à l'ADN **B.** Voie canonique (*adaptée de Gustafsson et al., Dev Cell. 2005 Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state*).

b) HIF-1 α régule la différenciation via Wnt

La voie Wnt est également une composante essentielle de la régulation et de l'homéostasie des CSH. Dans les cellules ES en hypoxie, HIF-1 α module la signalisation Wnt/ β -caténine, en augmentant l'activation de la β -caténine et l'expression des effecteurs de la voie Wnt : LEF-1 et TCF-1³⁹³. De manière intéressante, ces résultats se vérifient dans les cellules souches neurales, mais pas dans les cellules plus différenciées, où HIF-1 α capture la β -caténine et empêche la formation du complexe de transcription β -caténine/TCF³⁹⁴.

c) HIF-2 α et les iPs

Récemment, la génération de cellules iPs a permis d'envisager une nouvelle approche de la médecine régénérative et des biothérapies, en générant à partir de cellules somatiques des cellules souches pluripotentes⁹². Cette dédifférenciation des cellules est possible grâce à la transduction de quatre facteurs de transcription (OCT4, Sox2, Klf4 ou Nanog et c-Myc), cependant, la fréquence de génération des cellules iPs est faible. Afin, d'augmenter cette fréquence d'apparition les cellules ont été placées en hypoxie (à 5%) et les résultats montrent une augmentation de la génération des iPs. En plus d'une augmentation de fréquence d'apparition, l'hypoxie a permis de limiter le nombre de facteurs de transduction, en passant de quatre facteurs à deux facteurs (OCT4 et Klf-4)³⁹⁵.

Dans les cellules ES, la transcription d'OCT4 est contrôlée par HIF-2 α , où il lie le promoteur de Sox2 ; par ailleurs, son inhibition dans les cellules ES a pour effet de diminuer l'expression des trois facteurs Sox2, Oct4 et Nanog^{294,396,397}. HIF-2 α a également pour effet d'augmenter l'activité transcriptionnelle de c-Myc. Le contrôle exercé par HIF-2 α sur l'ensemble de ces facteurs permet d'envisager la génération d'iPs à partir de la modulation de ce seul facteur³⁸⁹.

2) HIF et les cellules souches hématopoïétiques

Les niches dans lesquelles résident les CSH sont des environnements très hypoxiques, parfois même anoxiques. Cet environnement, ainsi que certains facteurs indispensables au maintien des cellules souches, font des facteurs HIF de bons candidats à la régulation des CSH.

a) HIF-1 α et les CSH

Récemment, il a été montré, chez la souris, que l'expression de HIF-1 α est essentielle pour le maintien et la quiescence des cellules souches^{22,398}. L'adaptation des CSH à leur environnement hypoxique s'accompagne d'une modification de leur métabolisme qui est orchestrée par HIF-1 α . Les CSH ont une activité mitochondriale ralentie au profit d'une glycolyse importante ; pour s'adapter à ce changement, les CSH activent HIF-1 α via la protéine à homéodomaine Meis1 de la famille des gènes Hox. Meis1 est fortement exprimé dans les CSH, et son défaut entraîne chez l'embryon une mort in utero à E14,5 suite à des déficiences du système vasculaire et du système hématopoïétique³⁹⁹. Ce phénotype métabolique adopté par les CSH leur confère également un avantage de survie dans la niche hypoxique où les cellules plus différenciées qui ont un métabolisme oxydatif ne survivent pas.

HIF-1 α ne se contente pas de modifier le métabolisme des CSH, il régule également le cycle cellulaire de ces dernières. Son inhibition a pour effet de provoquer une augmentation des ROS intracellulaires qui entraîne une prolifération excessive des CSH et la perte de leurs fonctions par un mécanisme de sénescence dépendant de l'activation des facteurs p16 et p19. A l'inverse, sa surexpression bloque les CSH en quiescence ainsi que les progéniteurs, et augmente l'apoptose dans la population de CSH³⁹⁸. Ces études révèlent un rôle essentiel de HIF-1 α dans l'homéostasie des CSH, qui agit de manière dose dépendante sur l'engagement des CSH dans le cycle cellulaire et sur leur capacité de cellules souches.

Les centaines de cibles potentielles de HIF-1 α dans les CSH suggèrent que le métabolisme et le cycle cellulaire ne sont pas les seuls processus dans lesquels HIF-1 α peut intervenir. Par exemple, HIF-1 α régule l'expression de Foxo3a dont l'inactivation dans les CSH a pour effet d'augmenter la concentration de ROS et d'épuiser le stock de CSH⁴⁰. Ce même Foxo3a, en hypoxie, induit Cited2, un régulateur négatif de HIF-1 α et bloque l'apoptose dépendante de HIF-1 α ⁴⁰⁰. HIF-1 α joue également un rôle essentiel dans les processus de survie, de différenciation cellulaire et d'autophagie (*figure 38*).

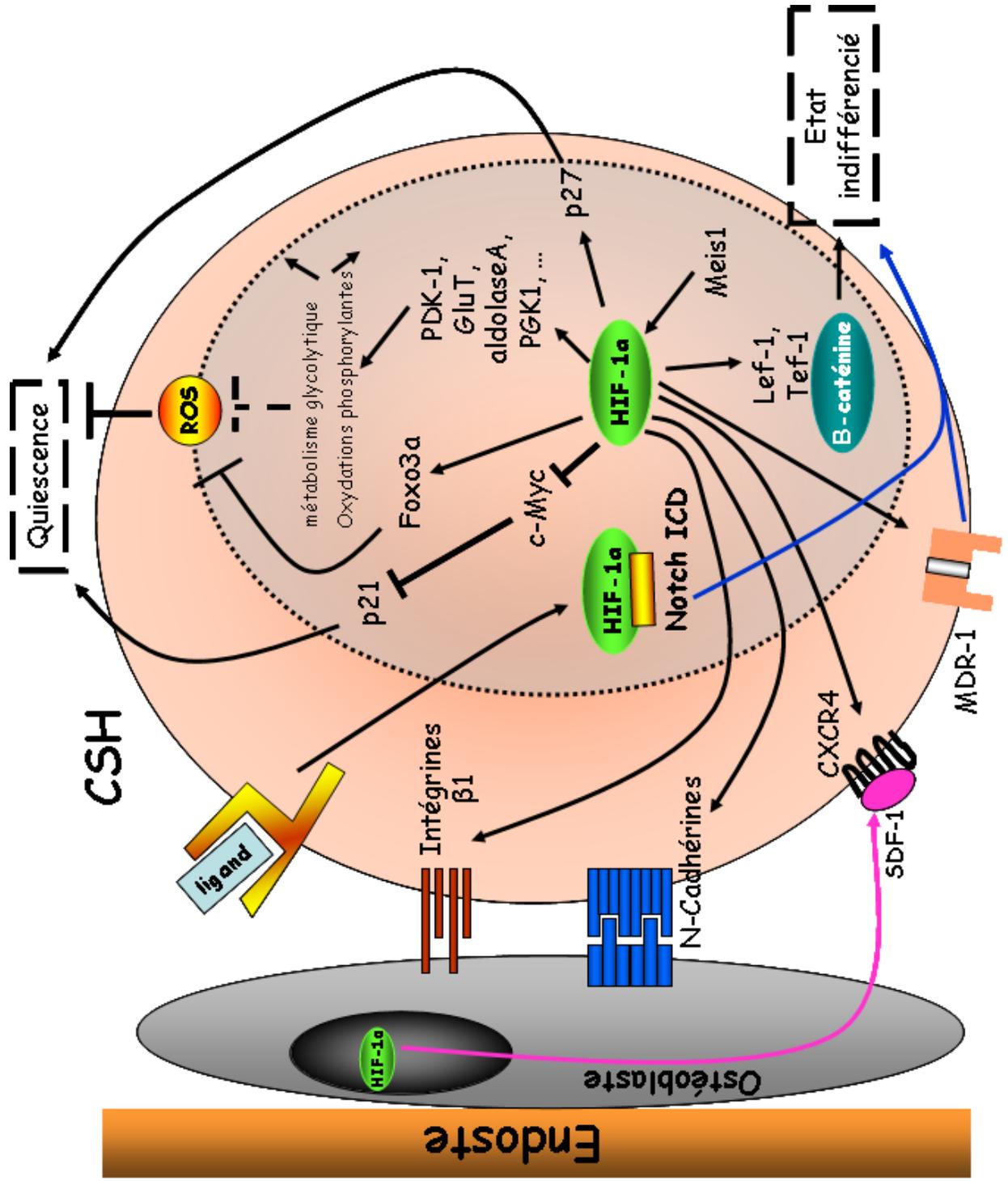


Figure 38 : Régulation hypothétique des CSH par HIF-1α

b) HIF-2 α et les CSH

Le rôle de HIF-2 α dans les CSH n'a pas encore été établi. Cependant, il est exprimé dans les CSH murines et dans les cellules ES humaines, où il est piégé dans le cytoplasme. Par ailleurs, il possède une activité transcriptionnelle limitée^{291,401}, ce qui ne l'empêche pas d'être l'inducteur de gènes clefs dans le maintien et l'autorenouvellement des cellules souches²⁹⁴. De manière intéressante, dans les CSH murines, il est davantage exprimé dans les cellules plus primitives CD34⁻ LSK (Lin⁻ Sca⁺ c-Kit⁺) que dans les cellules CD34⁺ LSK ; en outre, son expression est encore augmentée dans les cellules Lin⁻³⁹⁸. Contrairement à HIF-1 α qui apparaît avec le règne des métazoaires, HIF-2 α émerge avec les vertébrés, et joue un rôle clef chez les mammifères, notamment dans le remodelage osseux^{275,276} et la régulation du microenvironnement²⁷⁷. En outre, la niche ostéoblastique représente une région où l'hypoxie est permanente et, contrairement à HIF-1 α , qui est dégradé durant une hypoxie prolongée, HIF-2 α s'accumule²⁷⁹.

Comme HIF-1 α , il est impliqué dans la régulation de nombreux facteurs essentiels à la survie cellulaire, et régule la transcription de gènes qui sont exprimés dans les CSH et impliqués dans divers processus tels que la migration, le contrôle de l'environnement Redox, la régulation du cycle cellulaire et l'activation de grandes voies de signalisation.

HIF-2 α régule des facteurs de croissance essentiels à la survie des CSH, tels que le VEGF²⁸⁴, VEGFR³⁵⁴ et l'EPO⁴⁰². A l'inverse, le SCF, un facteur essentiel au maintien des CSH, régule HIF-2 α et permet sa stabilisation dans des cellules hématopoïétiques et ce, même en normoxie³⁵⁸.

Si HIF-2 α est faiblement exprimé dans les CSH, il est fortement exprimé dans les ostéoblastes qui recouvrent l'endoste et tapissent la niche ostéoblastique⁴⁰³. HIF-2 α est également capable d'induire l'expression du récepteur Tie2^{274,404} et de ses deux ligands Ang-1 et 2³¹¹. Or, le signal Ang-1/Tie2 permet l'interaction entre les CSH et les ostéoblastes, et la liaison à la MEC des CSH par activation des intégrines β 1²⁰⁴. De plus, la libération d'angiopoïétine 1 dans l'environnement des CSH et des ostéoblastes stimule l'expression de la N-cadhérine à la surface de ces deux types cellulaires^{175,207}. La perte de ces interactions entraîne l'épuisement des CSH en quiescence. Ce ne sont pas les seules molécules d'adhésion sous le contrôle de HIF-2 α : chez la

souris, l'intégrine alpha 9 (ITGA9) est directement activée par HIF-2 α ⁴⁰⁵, son homologue humain, avec laquelle elle partage 87% d'homologie, est exprimée à la surface des CSH et progéniteurs, où elle joue un rôle important dans l'adhésion et la différenciation⁴⁰⁶.

Les interactions et intégrations de signaux entre les ostéoblastes et les CSH sont indispensables au maintien des CSH. La voie Notch qui régule, entre autres, l'état de différenciation des CSH, est amorcée par les ostéoblastes. En effet, la liaison de la PTHrP à son récepteur le PPR, situé à la surface de la membrane des ostéoblastes, accroît le nombre d'ostéoblastes et augmente la sécrétion de Jagged1 (le ligand de Notch)¹⁷⁴. Or, il a été montré récemment que HIF-2 α active directement l'expression de la PTHrP dans les cellules tumorales et endothéliales⁴⁰⁷. Outre les effets déjà connus de HIF-2 α sur la voie Notch et ses effecteurs Hes1 et Hey1, HIF-2 α pourrait potentiellement amplifier la signalisation de Notch en modulant l'expression de son ligand Jagged1.

Des conditions de culture hypoxique accroissent le potentiel de greffe des CSH à long terme et ce, en régulant l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire tels que p21, p27 et p57⁴⁰⁸. Si HIF-1 α régule l'activité de ces trois gènes, HIF-2 α quant à lui est capable, en activant p27, de suspendre le cycle cellulaire de fibroblastes murins (NIH3T3), en phase G1⁴⁰⁹. Mais si l'arrêt du cycle cellulaire est important pour maintenir les cellules souches dans un état quiescent, il est également important de pouvoir le redémarrer pendant l'autorenouvellement et la différenciation des CSH. HIF-2 α , en activant l'expression de la cycline D1³⁶⁴ et en coopérant avec c-Myc³⁵⁶, pourrait permettre aux CSH de proliférer.

Si l'adhésion à une niche est nécessaire au maintien des CSH, elles peuvent tout de même migrer vers d'autres tissus. HIF-2 α , comme HIF-1 α , contrôle l'expression de SDF-1 et de son récepteur CXCR4²²⁸⁻²³⁰, ces deux facteurs jouant un rôle important dans la mobilisation et le homing des CSH.

Les CSH, pour se protéger de l'accumulation de métabolites toxiques et éviter des dommages de l'ADN, surexpriment des transporteurs ABC. Les transporteurs ABC qui sont des pompes à efflux ont la particularité de rejeter des colorants comme le Hoescht ; cette capacité permet d'identifier une population de cellules, appelée les cellules SP (« *side population* »), qui

définissent une population de cellules très primitives dans la MO. Bcrp-1 est un transporteur ABC qui est surexprimé dans les cellules souches murines, où son expression est dépendante de HIF-1 α ⁴¹⁰. Chez l'homme l'orthologue de Bcrp-1 est ABCG2 et son activation est dépendante de HIF-2 α ⁴¹¹. En évitant l'accumulation de toxine dans la cellule, le transporteur ABCG2 maintient un phénotype indifférencié.

L'accumulation de ROS peut également provoquer des dommages de l'ADN et induire la différenciation des CSH. Afin de limiter ces risques de dégâts sur l'ADN et de différenciation spontanée, la cellule dispose d'enzymes antioxydantes capables de neutraliser les ROS. Le foie des souris HIF-2 α ^{-/-} montre une augmentation du stress oxydatif et une détresse mitochondriale, dues à une réduction de l'expression de SOD2, ainsi que de la frataxine, la protéine chaperonne de l'aconitase, un senseur du stress oxydatif⁴¹². En plus des enzymes mitochondriales SOD2 et Frataxine, HIF-2 α contrôle l'expression de trois enzymes essentielles à la détoxification par élimination des ROS : la SOD1, la catalase et la glutathione peroxydase 1 (Gpx1)²⁸³. HIF-2 α est donc le principal facteur de transcription de la régulation Redox. Alors que HIF-1 α , en contrôlant la respiration mitochondriale, limite la production mitochondriale de ROS, HIF-2 α régule le stress oxydatif de la mitochondrie et régule l'homéostasie Redox de la cellule⁴¹³.

HIF-2 α est également le principal facteur de transcription de la protéine Cited2, qui est un régulateur négatif de HIF-1 α et joue un rôle important dans la régulation des CSH. Son KO empêche la génération de CFC et de CAFC, et la transplantation de CSH Cited2^{-/-} n'est pas capable de restaurer une hématopoïèse fonctionnelle. Comme pour HIF-1 α , le KO de Cited2 provoque une accumulation de p16 et p19, ainsi que de p53, qui entraîne la perte des CSH⁶⁸. Par ailleurs, si HIF-2 α contrôle effectivement l'expression de Cited2 dans les CSH, il doit modifier par l'intermédiaire de Cited2 l'expression de Bmi-1²⁹, qui est essentiel, chez l'adulte, au processus d'autorenouvellement des CSH⁶⁹ (*figure 39*).

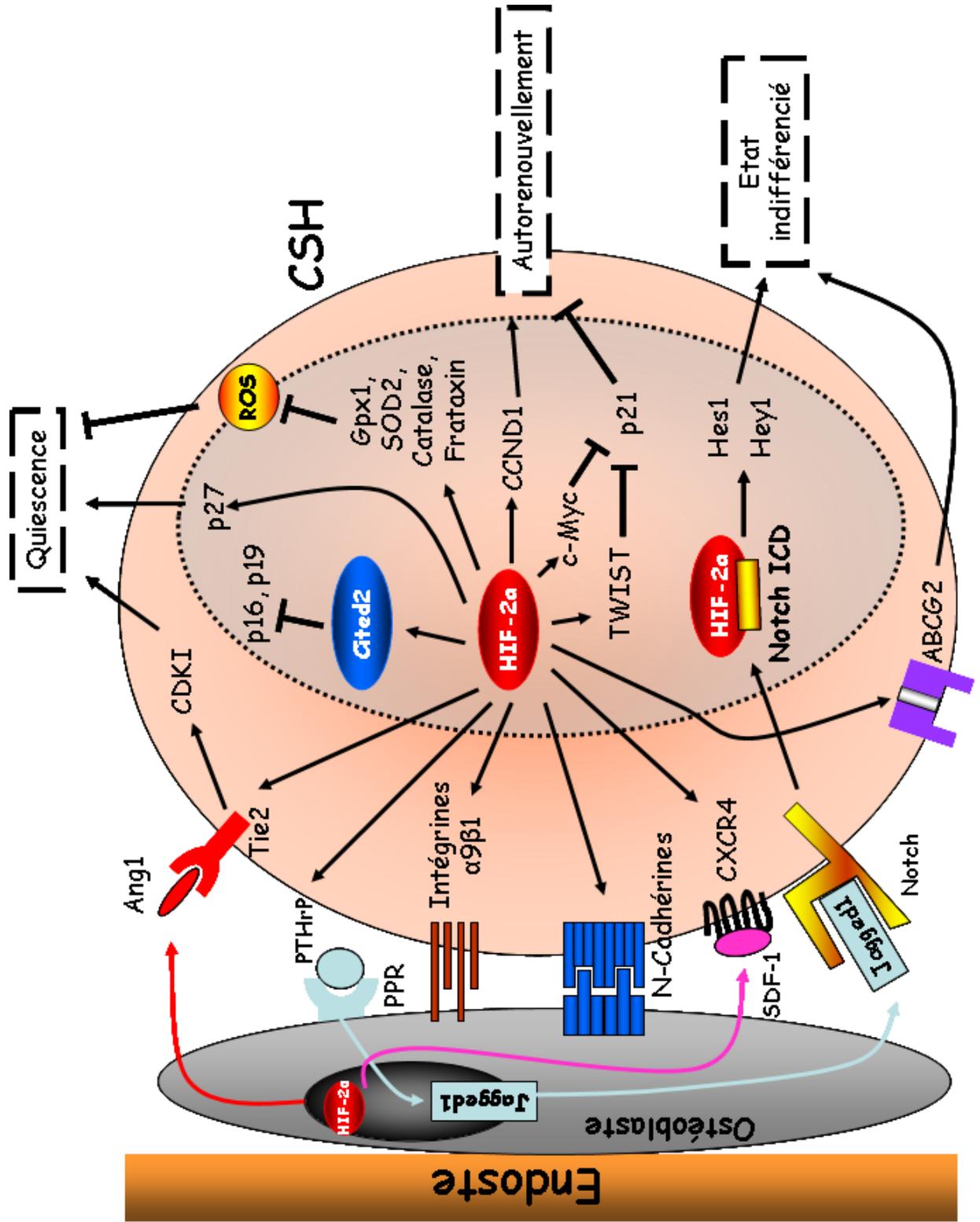


Figure 39 : Régulation hypothétique des CSH par HIF-2 α

RESULTATS

2^{ème} CHAPITRE : Les Résultats

**Rôle des facteurs de transcription HIF
(Hypoxia Inducible Factor) dans le maintien
à long terme des cellules souches
hématopoïétiques Humaines chez la souris
immunodéficiente**

I. PROJET DE RECHERCHE

A. SITUATION DU PROJET DE RECHERCHE

L'étude des cellules souches offre de nombreuses perspectives thérapeutiques dans les domaines de la médecine régénérative et dans la compréhension des mécanismes de résistance aux agents thérapeutiques dans les cancers³⁷⁸. Ainsi, il est important de comprendre les voies de signalisation majeures impliquées dans l'autorenouvellement/différenciation, la quiescence/prolifération et la survie/apoptose des cellules souches saines et tumorales. Le rôle de l'oxygène, qui est un élément clef durant l'embryogenèse et la progression tumorale, a longtemps été sous-estimé. Or, le taux physiologique d'oxygène est finement régulé dans les tissus des mammifères, et sa concentration diffère d'un tissu à l'autre, ainsi qu'au sein même de ces derniers, phénomène dû en grande partie à l'architecture vasculaire. La moelle osseuse et le cerveau, qui sont les régions les plus hypoxiques de l'organisme, fournissent de bons modèles pour l'étude de la régulation des cellules souches par l'oxygène. Parmar a montré que les cellules souches hématopoïétiques se distribuent en suivant un gradient d'oxygène^{236,237,243}, où les faibles concentrations en oxygène favorisent la conservation d'un état indifférencié.

L'hématopoïèse a été largement décrite au niveau cellulaire et moléculaire, et s'avère être l'un des principaux modèles utilisés dans l'étude des mécanismes gouvernant le caractère souche d'une cellule. Des études récentes révèlent dans des modèles murins que les facteurs de transcriptions (HIF) induits par l'hypoxie affectent le comportement des cellules souches hématopoïétiques^{283,398}.

La culture en hypoxie stabilise les sous-unités HIF- α ³⁹⁰. Cependant, les mécanismes qui relient le maintien des CSH à l'oxygène n'ont été que partiellement expliqués : régulation métabolique et contrôle de la quiescence. Les modèles de souris KO pour les sous-unités α ou β des facteurs HIF sont létaux^{282,414,415}.

Le KO conditionnel de HIF-1 α a permis de montrer très récemment que ce facteur joue un rôle essentiel dans la régulation des CSH en les maintenant dans un état quiescent³⁹⁸. En effet, l'inactivation de HIF-1 α dans les CSH murines conduit à une perte de fonctions par sénescence. Il a été établi que la sénescence des cellules inactivées pour HIF-1 α est dépendante des

inhibiteurs du cycle cellulaire p16 et p19. A l'inverse, la stabilisation de HIF-1 α augmente la quiescence des CSH, au détriment de leur capacité de reconstitution hématopoïétique.

Si le rôle de HIF-1 α dans les CSH murines est confirmé, celui de HIF-2 α reste à démontrer, et en particulier dans les CSH humaines. HIF-2 α est aujourd'hui reconnu comme étant le principal régulateur du gène de l'EPO³⁸⁴, il joue un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie des ROS²⁸³ et contribue au phénotype agressif des tumeurs³⁶⁰, notamment en maintenant les cellules tumorales dans un état indifférencié^{382,388}.

Nous avons donc développé un modèle nous permettant d'étudier le rôle des facteurs de transcription HIF-1 α et HIF-2 α dans les CSH humaines. En utilisant une stratégie d'ARN interférents médiés par des vecteurs lentiviraux et des cellules de sang de cordon CD34⁺, nous avons montré que les « *knockdown* » de chacun de ces facteurs affectent les capacités de reconstruction à long terme des CSH humaines chez la souris immunodéficiente NOD/LtSz-*scid* IL2rg^{null}. De plus, et ce de façon surprenante, l'inactivation de HIF-2 α dans les CSH humaines est plus délétère que l'inactivation de HIF-1 α , et entraîne une perte très importante des CSH.

B. RESULTATS

1) Etudes *in vitro*

Nous avons développé des vecteurs bicistroniques permettant l'expression du gène rapporteur codant pour l'EGFP et de shRNA inhibant spécifiquement soit HIF-1 α (shHIF1 α), soit HIF-2 α (shHIF2 α). Après avoir validé les shRNA sur la lignée cellulaire des HEK293T, nous avons infecté les cellules CD34⁺ et obtenu des pourcentages de transduction oscillant entre 50% et 60%. Le tri par cytométrie en flux a permis de déterminer l'impact de l'inactivation des facteurs HIF sur les capacités prolifératives des cellules CD34⁺ (*figure 40*).

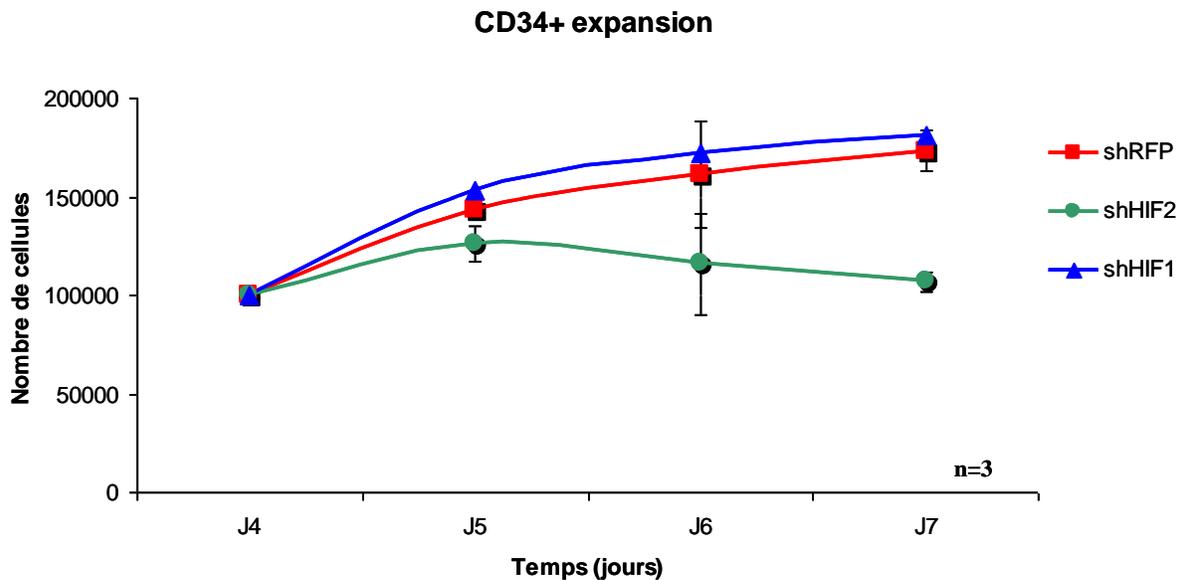


Figure 40 : Effet de l'inactivation des facteurs HIF sur la prolifération des CSH

Les cellules CD34+ sont transduites à J0 et cultivées en milieu Stem alpha® Liquid Serum Free Culture Medium + SCF 100 ng/ml + FIT3-L 100 ng/ml + TPO 50 ng/ml. Les cellules sont triées par cytométrie en flux quatre jours après transduction (J4) et comptées tous les jours jusqu'à J7. (n=3)

Le shRNA anti-HIF-1 α n'affecte pas, en normoxie, la prolifération des cellules CD34⁺, alors que le shRNA anti-HIF-2 α empêche l'expansion des cellules, même en normoxie. Nous avons alors évalué l'impact de l'inactivation des facteurs HIF sur les progéniteurs hématopoiétiques humains par un test CFC. Le nombre de colonies myéloïdes générées, en méthylcellulose, à partir de cellules CD34⁺, triées sur la GFP quatre jours après transduction, est équivalent au contrôle quel que soit le facteur HIF inhibé. En revanche, l'inactivation de HIF-2 α , mais pas de HIF-1 α , diminue la génération de colonies érythroïdes. Afin, de déterminer quelles étapes de la différenciation érythroïdes sont affectées par l'inactivation de HIF-2 α , nous avons réalisé un test de différenciation en culture liquide. Sur la base de deux marqueurs, le CD36 qui marque les progéniteurs, et la glycophorine A (GPA) exprimée à la surface des cellules érythroïdes matures, nous avons déterminé l'impact des KD de HIF-1 α et HIF-2 α sur la différenciation

érythroïde. HIF-1 α ne modifie pas l'expression des marqueurs CD36 et GPA, tandis que HIF-2 α induit un retard ou un défaut de l'expression de ces deux marqueurs. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour les tests CFC.

Pour comprendre quel peut être le rôle des facteurs HIF dans les CSH *in vivo*, les cellules CD34⁺ transduites ont été injectées dans des souris immunodéficientes NOD/LtSz-*scid* IL2rg^{null} préconditionnées au busulfan.

2) Etudes *in vivo*

La xéno greffe des cellules CD34⁺ transduites nous a permis d'étudier l'impact de l'inactivation des facteurs HIF sur le maintien des CSH. Après l'injection intraveineuse, les CSH humaines migrent dans la moelle osseuse et la rate des animaux. Une ponction de moelle dans le fémur, sous anesthésie générale, est analysée périodiquement durant 24 semaines, chez les animaux primaires, puis chez les animaux secondaires, afin d'estimer la quantité de cellules humaines, leur phénotype et l'expression du transgène.

Les facteurs HIF contrôlant l'expression de facteurs essentiels à la migration des CSH vers la moelle osseuse (CXCR4 et SDF-1), nous avons réalisé un test dit de « *homing* ». Après avoir transduit et cultivé les cellules CD34⁺ quatre jours, nous les avons injectées dans les souris, que nous avons sacrifiées 24 heures après la transplantation. Ce test montre que le KD des facteurs HIF n'empêche pas la migration des CSH vers la moelle osseuse.

L'analyse des ponctions fémorales, chez les animaux primaires puis secondaires, révèle la perte des cellules transduites pour les deux shRNA ; toutefois, l'effet est moins prononcé dans le cas des cellules transduites avec le shHIF-1 α .

Dans les différents tissus, la disparition au cours du temps des cellules inactivées pour HIF-1 α et encore plus pour HIF-2 α , quel que soit le stade de différenciation, suggère un rôle majeur de ces facteurs dans le maintien des CSH. Un effet plus spécifique de HIF-2 α sur la lignée érythroïde est également observé, et permet de confirmer les résultats obtenus *in vitro*.

II. L'ARTICLE

ARTICLE

Hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α regulate differentiation and long-term reconstitution abilities of human hematopoietic stem cells

Kevin Rouault-Pierre¹, Hamid Reza Rezvani¹, Isabelle Lamrissi-Garcia¹, Zoran Ivanovic^{2,3},
Hubert de Verneuil¹, Frédéric Mazurier^{1,*}

¹ INSERM U 1035, Bordeaux, F-33076 France; Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, F-33076 France

² Établissement Français du Sang-Aquitaine Limousin, Bordeaux, F-33000, France

³ CNRS UMR 5164, Bordeaux, F-33076 France ; Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, F-33076 France

*** Corresponding Author**

INSERM U 1035, Université Bordeaux 2, 146, rue Léo Saignat, Bordeaux, F-33076, France

Email address: mazurier@u-bordeaux2.fr

Phone: +33-557-571-373

Fax: +33-557-571-374

Abstract

Physiological oxygen level is tightly regulated in mammalian tissues. Moreover, oxygenation differs from one tissue to the other, as well as within a single tissue, due to vasculature modeling. Oxygen level has been shown to be a key stimulus of cell fate during embryogenesis and cancer progression. It is now widely admitted that stem cells fate follows oxygen gradients with low oxygen levels (hypoxia) promoting an undifferentiated state. Hematopoietic stem cells (HSCs) reside in bone marrow niches in which oxygen availability is low, even absent. Hypoxia-inducible factors (HIFs) are the main factors regulating the cell-response to oxygen variation. Studies on mouse models reveal that HIFs affect HSC activities. Here, we investigate the potential function of HIF-1 α and HIF-2 α within human HSCs. Knockdown of both factors was obtained by lentivirus-mediated short-hairpin RNA strategy. Transductions of CD34-positive cord blood cells reveal that HIF-2 α knockdown affects myelo-erythroid differentiation. Both HIF- α are required for long-term reconstitution in immune-deficient NOD-scid IL2Rg^{null} mice, whereas a more pronounced deficiency was observed for HIF-2 α . Overall, our data strongly support the existence of multiple but preponderant functions of HIF- α subunits in human stem cell maintenance and differentiation.

Introduction

The role of oxygen in cell and tissue specification has long been ignored, being regarded merely as an essential life molecule in the respiratory chain, and as a source of oxidative molecules. In the hematopoietic domain, since the pioneering work of Cipolleschi, oxygen has attracted interest as a key regulator of hematopoietic stem cell (HSC) maintenance¹. Furthermore, it has been confirmed that cell culture of murine and human HSCs and progenitors at low O₂ tension (0.1-5%), also called hypoxia, ensures their maintenance and, eventually, their expansion, in contrast to cultures at atmospheric oxygen level (normoxia)^{2,3}. In 2001, Chow *et al.* suggest that HSCs might be located in a very poorly oxygenized bone marrow environment⁴. Examination of oxygen saturation in human bone marrow corroborates the fact that oxygen spreads along a gradient in marrow⁵. Indeed, the adaptation of oxygenation to those supposed to exist in bone marrow environment enhances the efficiency of red blood cell production *ex vivo* starting from CD34-positive cells⁶. Side population (SP) cells, the only cells to retain repopulation ability, are highly hypoxic⁷. Survival in this low-oxygen microenvironment requires significant metabolic adaptation. HSCs utilize glycolysis instead of mitochondrial oxidative phosphorylation to meet their energy demands⁸. Together, these data imply that in hematopoietic hierarchy, HSCs and progenitors are organized in an oxygen-dependent manner, and that oxygen availability might govern hematopoiesis by maintaining HSC functions such as cell cycle, survival, metabolism, and protection against oxidative stress.

The hypoxia-inducible factors (HIF) are the main transcriptional factors responding to oxygen variation⁹. Now it is widely accepted that many molecules, such as growth factors, cytokines, hormones and reactive oxygen species (ROS), drive HIF expression¹⁰⁻¹². HIF-1 and HIF-2 are heterodimeric proteins belonging to the bHLH family, and comprise an alpha subunit (HIF-1 α , HIF-2 α), oxygen-regulated, and a beta subunit (HIF-1 β also called ARNT),

oxygen-independent. Dimerization occurs throughout the per-ARNT-Sim (PAS) domain. The keystone of the HIF- α degradation is a highly conserved oxygen-dependent degradation domain (ODDD). In ODDD, two essential proline residues (in human HIF-1 α : P402/P564; and in HIF-2 α : P405/P531) can be hydroxylated by specific prolyl-hydroxylases (PHDs), three oxygen-, Fe(2+)-, and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases. The post translational modifications enable binding of the von Hippel-Lindau E3-ubiquitin ligase (VHL). In the presence of O₂, ubiquitination of the HIF- α leads to degradation by the 26S proteasome¹³. In hypoxia, PHDs hydroxylation activity is inhibited, allowing HIF- α stabilization and gene transactivation, the N-terminal transactivation domain (NAD) conferring target gene specificity of each HIF- α subunit¹⁴. Transcriptional HIF activity is also regulated by oxygen through the hydroxylation of an asparagin residue by an asparaginyl hydroxylase also called FIH¹⁵. This amino-acid modification prevents interaction between HIF and cofactors such as CBP/p300.

HIF is a highly conserved protein throughout evolution^{16,17}. HIF-1 α was initially found to regulate the transcription of erythropoietin (EPO), and vascular endothelial growth factor (VEGF), and to monitor the glycolytic metabolism¹⁸, making it a very attractive target in the fight against cancers. HIF-2 α was firstly discovered in endothelial cells¹⁹. In evolution, this last factor appeared with the emergence of vertebrates, hence predicting an important role in skeletal modeling²⁰ and its microenvironment²¹. Its expression is tissue-specific and it is accumulated during prolonged hypoxia, in contrast to HIF-1 α ²². HIF-2 α is shown to regulate EPO in adults²³, to contribute to tumor aggressiveness²⁴, to maintain the undifferentiated state in neuroblastoma²⁵ and glioma²⁶, and to play a major role in ROS homeostasis²⁷. Recent data suggest relevant differences between the HIF- α subunits function in physiological and pathological processes. Although both factors bind the same DNA sequence, called hypoxia

response element (HRE), the transcription specificity differs according to their partners; moreover, these two proteins may act in synergy or in competition with antagonist effects²⁸.

In hematopoietic cells, little is known about HIF functions. In human, HIF-1 α has been found expressed in lineage-depleted CD34⁺CD38⁻ cells from bone marrow² as well as in circulating CD34⁺ and CD133⁺ cells under normoxic conditions²⁹. Mutations in VHL, PHD or HIF-2 α lead to a polycythemia, called Chuvash's disease³⁰ through increased EPO production by kidneys and increased sensitivity to EPO^{31,32}. In mice, HIF-1 α ³³ and HIF-1 β ³⁴ knockout (KO) results in embryonic lethality at E10.5, whereas HIF-2 α KO leads to increased embryonic or perinatal lethality depending on the mouse background^{27,35}. Cells from HIF-1 α -deficient yolk sac demonstrate erythropoietic defects³⁶. Recently, using a conditional KO model in which HIF-1 α deletion was restricted to hematopoietic cells, it has been shown that HSCs maintain cell cycle quiescence through a precise regulation of HIF-1 α levels³⁷. Hypocellularity in bone marrow of HIF-2 α KO mice was mainly attributed to a critical role of HIF-2 α in stromal cells supporting HSCs rather than in HSCs themselves^{35,38}. HIF-1 β -deficient embryonic stem cells have abnormal hematopoietic differentiation, partially rescued by VEGF³⁴.

In this study, we present a model designed to analyze the role of HIF-1 α and HIF-2 α in human HSCs. By using CD34-positive cord blood (CB) cells and lentivirus-mediated RNA interference strategy, we showed that knockdowns of both factors affect long-term reconstitution ability of HSCs in immune-deficient NOD-scid IL2Rg^{null} mice, with a more dramatic defect for cells deficient in HIF2 α .

Material and Methods

Generation of lentiviral vectors and viral particles

Twenty-one bp-sense and antisense oligonucleotides were designed in the 3'-coding region of the human *HIF-1 α* and *HIF-2 α* genes (Figure 1A). DNA fragments (Eurogentec, Angers, France) were cloned in the pic20-plasmid behind the polymerase III H1 promoter, while H1-shRNA sequences were subcloned in the lentivirus (pTrip Δ U3Ef1 α -EGFPMCS Δ U3) that contains the enhanced green fluorescent protein (eGFP) gene under the control of the EF1 α promoter (Figure 1A). An shRNA directed against the dsRed fluorescent protein (RFP) was used as control (shCtl). Lentiviral supernatants were produced by transient CaCl₂ transfection of HEK293T cells. Briefly, cells (0.8×10^6) were plated on poly-L-lysine coated 10-cm plates, and transfected 4 days later with the packaging construct pCMVPAX2 (10 μ g), the vesicular stomatitis virus glycoprotein envelope expressing plasmid pMD.G (4 μ g), and the vector construct (10 μ g) by CaCl₂ precipitation in serum-free DMEM medium. After 10 hours, DMEM was replaced by OPTIMEM (Gibco, Cergy Pontoise, France) supplemented with HEPES (Fluka, Lyon, France) at 2 mM and penicillin/streptomycin (P/S; Lonza, Basel, Switzerland) at 10 U/mL. Viral supernatants were collected 48 hours later, filtered through 0.22- μ m filters, concentrated by centrifugation (40,000 x g, 4 h, 4°C), and immediately after resuspension stored at -80°C. The viral titers, as measured on HEK293T cells by flow cytometry (eGFP expression), were 0.5×10^9 to 2×10^9 infectious particules/mL.

Cell purification, culture, and transduction

Cord Blood (CB) samples were obtained from normal full-term deliveries with signed, informed consent. The cells were processed within 24 to 48 hours following collection, as previously described³⁹. Mononuclear cells (MNCs), from individual or pooled samples, were isolated by centrifugation using Ficoll (Eurobio, Les Ulis, France) density gradient. CD34-positive cell enrichment was further achieved by EasySep™ positive selection on MNCs (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) and reach, as determined by flow cytometry, 92 to 99% purity.

Cell lines and CD34⁺ cells were cultured in DMEM medium with 10% fetal bovin serum and penicillin/streptomycin (P/S; 10 U/mL) and in STEM ALPHA.A serum free medium (STEM ALPHA, St. Genis L'Argentière, France) supplemented with stem cell factor (SCF: 100 ng/mL), Flt3-L (100 ng/mL), thrombopoietin (TPO: 50 ng/ml), penicillin/streptomycin (P/S; 10 Unit/ml), respectively. For transduction, cells were incubated with viral supernatants for 24 hours in STEM ALPHA.A at 37°C in a fully humidified 5% CO₂ atmosphere. After 4-5 days of culture in STEM ALPHA.A with cytokines, the percentage of eGFP-expressing cells was determined by flow cytometry.

Erythroid differentiation

The transduced CD34-positive cells (10^5 /mL) were cultured in STEM ALPHA.A medium containing P/S (10 U/mL), SCF at 100 ng/ml, FIT3-L at 100 ng/ml and TPO at 50 ng/ml for 4 days. Then, cells (0.5 to 1×10^5 /mL) were placed in Stem Alpha.AE base 1 supplemented with P/S (10 U/mL), SCF at 25 ng/mL, EPO at 3 U/mL, and IGF-1 50 ng/mL to induce erythroid differentiation. At day 12 after transduction, erythroid cell populations were defined

using the combination of CD36 and GPA expression by flow cytometry and the percentage of GFP-positive cells was determined within the erythroid cells.

Progenitor cells assay

150 human CD34-enriched cells were seeded in methylcellulose (StemαI, STEM ALPHA) supplemented with 10% of human plasma, SCF (60 ng/mL), interleukin-3 (30 ng/mL), erythropoietin (3.6 U/mL) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (30 ng/mL). Burst forming unit-erythroid (BFU-E) and colony forming unit-granulocyte macrophage (CFU-G, CFU-M, CFU-GM) derived colonies were counted on day 14.

NOD-scid IL2Rg^{null} mice repopulation assay

Cells were transplanted into 7- to 10-week old NOD-scid IL2Rg^{null} mice (also named NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) using intravenous injection for primary and secondary mice, as previously described⁴⁰ with small modifications. Prior to transplantation, mice received a preparative conditioning regimen consisting of a 3-day intraperitoneal injection of 22 mg/kg Busilvex[®] (Pierre Fabre, Boulogne, France). In agreement with Bordeaux 2 University's ethical committee board, bone marrow (BM) samples were aspirated from the right femur (RF), under isoflurane anesthesia, 3, 6 and 12 weeks after transplantation. To avoid possible pain, mice received Vetegesic[®] (Cetravet SA Cooperative, Dinan, France) at 100 µg/kg. After 24 weeks, blood was collected by heart puncture under anesthesia and mice were immediately sacrificed to harvest cells from the right femur, pooled BM (left femur + tibiae + pelvis), and spleen (Sp). Human cell engraftment was assessed by flow cytometry. Finally, pooled BM cells from primary mice were intravenously injected into busilvex-preconditioned secondary recipients.

Flow cytometry analysis

Flow cytometric analysis was performed using a FACScalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) as previously described³⁹. Isotype controls were mouse immunoglobulin-G conjugated to phycoerythrin (PE), allophycocyanin (APC) (both from BD), PE-cyanin 5 (PC5), or PC7 (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA). CD34 expression was assessed using anti-CD34-PC5. Human grafts in mice were assessed using anti-CD45-PC7, anti-CD19-PE, anti-CD33-APC, anti-CD36-PE, anti-glycophorin A (GPA)-APC, anti-CD3-APC, anti-CD34-PE, and anti-CD38-APC antibodies, as previously described^{39,41} (see also Figure 3B).

Cell sorting was performed using a FACS Aria (Becton Dickinson) on transduced cells. Cells were sorted according to the expression of eGFP and CD34 using an anti-CD34-PC5 antibody.

Western Blot

Western blot analysis was performed on 10^6 transduced CD34⁺ sorted cells, or 293T transduced cells (eGFP-positive cells 88% to 94%). Total protein extracts (50 µg) were run onto a 10% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gel. After protein liquid transfer, the HIF-1 α and HIF-2 α proteins were revealed using the HIF-1 α antibody (610959, BD transduction, Le Pont de Claix, France) and the HIF-2 α antibody (ab199, Abcam, Paris, France) on the SNAP i.d. Protein Detection System (Millipore®). Quantification of HIF proteins within cells transduced with the different vectors was carried out by quantitative densitometry of HIF bands on western blots (Fujifilm™ LAS-3000 Imager).

Statistics

Statistical analyses were performed using Student's t-test. $P < 0.05$ was considered significant. Results are presented as mean \pm SD.

Results

ShRNA delivery-coupled lentiviral vectors allow efficient HIF-1 α and -2 α knockdown

Bicistronic lentiviral vectors that carry two distinct promoters, EF1 α and H1, driving respectively GFP as a reporter gene, and a small hairpin RNA (shRNA) to specifically inhibit either human HIF-1 α (shHIF1 α) or HIF-2 α (shHIF2 α), were constructed, as well as a vector allowing the expression of a control shRNA (shCtl) (Figure 1A). Firstly, two RNA sequences were designed for each *HIF- α* gene, and tested in the HEK293T cell line. The transfer efficiency quantified by GFP expression ranged between 82 and 97% of transduction for all vectors (Figure 1B). Regarding the protein expression measured by western blot only 48 hours after transduction by the shHIF vectors, knockdown resulted in up to 60% extinction of HIF-1 α , (Figure 1C), and up to 50% extinction for the shHIF2 α sequences (Figure 1D) compared to non-transduced cells.

In human hematopoietic cells, HIF-1 α has been previously found expressed at the transcriptional level in lineage-depleted umbilical cord blood (CB) cells² and at the protein level in CD34-positive (CD34⁺) cells purified from peripheral blood²⁹. Here, we confirmed the expression of HIF-1 α in freshly isolated CD34-positive (CD34⁺) CB cells and, moreover, we evidenced expression of HIF-2 α in these cells (Figure 1E). To check whether the bands correspond well to HIF- α subunits, CD34⁺ cells were incubated with cobalt chloride that prevents prolyl-hydroxylase activity, and thus specifically promotes HIF- α stabilization. Increased intensity of the characteristic HIF-1 α (6.5 fold) and HIF-2 α (2.5 fold) bands, both at 120 kDa, validated the presence of both factors in CD34⁺ CB cells.

Gene transfer efficiency in the CD34-derived cells was measured by flow cytometry, 4 days after transduction (Figure 1E). Because of the lower transduction efficacy and protein content in CD34 cells compared to HEK293T cells, transduced cells were sorted 4 days after transduction and cultured for four additional days prior to assessing HIF- α protein expression. GFP-positive (GFP⁺) cells sorted and incubated with cobalt chloride, presented a 70% and 65% inhibition for HIF-1 α (Figure 1G) and HIF-2 α , respectively (Figure 1H) compared to non-transduced cells.

HIF-2 α is required for erythroid differentiation

Impaired formation of myelo-erythroid progenitors from embryonic or yolk sac cells, derived from Hif-1 α ^{-/-}, Hif-2 α ^{-/-} and Hif-1 β -knockout mice, has been reported^{34,36,42}. We therefore examined the effect of knockdown of HIF-1 α and HIF-2 α in human hematopoietic progenitor cells. The number of myeloid colonies generated in methylcellulose from GFP-sorted cells, after a 4-day culture, was equivalent in all conditions (Figure 2A). By contrast, the number of erythroid colonies was highly diminished upon HIF-2 α knockdown ($17 \pm 10\%$ of myeloid cells) as compared to HIF-1 α ($85 \pm 36\%$) and NT ($63 \pm 28\%$) and shCtl ($98 \pm 74\%$) groups.

In order to obtain a more detailed picture of erythroid differentiation, we performed an erythroid liquid culture assay on transduced CD34-derived cells. The CD36 cell surface marker characterizes progenitors, whereas more mature erythroid cells are marked by glycophorin A. In all groups, after a 12-day culture, most of the cells acquired the CD36-expression: $97 \pm 0.6\%$, $92 \pm 9.6\%$, $97 \pm 0.9\%$, and $88 \pm 12.3\%$ for NT, shCtl, shHIF1 α and shHIF2 α , respectively (Figure 2B). Evidence of differentiation defect of progenitors was observed for both knockdowns. Whereas the HIF-1 α downregulation slightly affects both progenitors and more mature cells, HIF-2 α knockdown induces a dramatic delay of

glycophorin A and CD36 expression, thus in agreement with the decline of erythroid cells observed in the CFU-assays.

HSC engraftment deficiency induced by HIF- α knockdowns is independent of homing

In order to determine whether HIF- α inactivation might impact *in vivo* human HSC fate, we performed xenograft assay in busulfan-preconditioned immune-deficient NOD-scid IL2Rg^{null} mice. Firstly, transduced cells were injected immediately after an overnight incubation with lentiviral vectors, and the human graft was examined in the bone marrow of the recipients 6 weeks after injection (Figure 3A). The human engraftment was determined by the expression of the human CD45 cell surface marker and the percentage of transduced human cells was measured, using the GFP expression, by flow cytometry (Figure 3B). A loss of transduced cells was observed for both HIF-1 α and HIF-2 α knockdowns, although the effect is less pronounced for the HIF-1 α vectors (up to 59% loss compared to the value at day 4) than for the HIF-2 α ones (up to 91%, see Figure 3C). Interestingly, higher loss incidence corresponds to vectors with higher extinction efficacy. For further experiments, the vectors providing the maximum effect were selected (namely, shHIF1 α .1 and shHIF2 α .1).

Hypoxia and HIFs have been described as important factors driving the expression of the chemokine SDF-1⁴³ and its receptor CXCR4 in tumors⁴⁴. Since the essential role of SDF-1 and CXCR4 have been described in human stem cell homing and repopulation⁴⁵, we hypothesized that HIF- α knockdowns might affect homing of transduced cells. To verify this hypothesis, we transduced cells and let shRNA expression to occur within a 4-day liquid culture prior to cell injection (Figure 3D). Mice were sacrificed 24 hours after injection and human cell homing was determined by the percentage of GFP-expressing cells among human cells (Figure 3E). As shown in figure 3F, no homing defect was noticed, since the percentage

of GFP-expressing cells in human grafts was not significantly different between the different groups.

HIF- α inactivation impairs long-term reconstitution ability of human hematopoietic cells

In mouse HSCs, HIF-1 α expression³⁷, but not HIF-2 α expression³⁵ is an absolute requirement to sustain long-term hematopoietic repopulation capacity. To investigate the role of HIF- α in the long-term maintenance of human HSCs, we followed the percentage of GFP-expressing cells in the human graft from bone marrow aspirates (at 3, 6, and 12 weeks and at sacrifice) for a period of 24 weeks after transplantation, and in secondary transplanted mice, as described in figure 4A. A progressive decrease in the percentage of GFP-expressing cells in the first 12 weeks was observed in most of the mice transplanted with the shHIF1 α -transduced cells, as compared to the shCtl-transduced ones (Figure 4B, C and 5A). In contrast, a more dramatic drop in the first 6 weeks was observed upon the transplantation of shHIF2 α -transduced cells (Figure 4B, C and 5A). Compared to prior transplantation, the proportion of transduced cells in primary pooled-BM by week 24 was 66% for the shHIF1 α group, only 10% for the shHIF2 α group, and 120% for the shCtl group (Figure 5B). Because the more immature cells provide the long-term engraftment these data suggest that long-term scid repopulating cells (LT-SRC) might be affected more severely than the short-term SRC (ST-SRC). To challenge persisting knockdown effect on more primitive cells, secondary mice were injected with the pooled bone marrow of the primary mice sacrificed at 24 weeks. The percentage of transduced cells remains stable over time (3, 6, 12 weeks) in bone marrow aspirates (data not shown) and in the hematopoietic tissues at sacrifice (24 weeks) for all

vectors (Figure 5B), which confirms that self-renewal or survival of transduced-LT-SRC in the bone marrow environment might be extensively governed by HIF-1 and HIF-2.

Human graft composition may vary in terms of cell differentiation in a time- and tissue-dependent manner (Figure S1), and cell lineages might be affected in a different way by inactivation of one of the factors. We therefore analyzed the GFP expression in human cells harvested from bone marrow (not aspirated bones), spleen and peripheral blood in primary and secondary mice at sacrifice, as well as the percentage of GFP-positive cells in human CD33-myeloid cells and CD19-lymphoid cells over time. GFP-positive cell levels were identical between the different tissues for each vector group (Figure 5B). The GFP expression kinetic was also similar for myeloid and lymphoid cells over time and in the different tissues (Figure 5D and F). Taken together, these data suggest that the decline phenomenon of HIF- α inactivated cells is not related to hematopoietic differentiation, since all lineages were affected with the same kinetic, but that it mostly appears in a common myelo-lymphoid progenitor or stem cell settled in the bone marrow of primary animals.

HIF-1 α and HIF-2 α affect differently erythroid and T-lymphoid lineages

Analysis of the human cell composition in the bone marrow at 2.5 weeks reveals the presence of CD45-positive myeloid and CD45-negative erythroid populations, already seen to originate from the rapid-SRC (R-SRC), and characterized by the Lin⁻CD34⁺CD38^{lo}CD36⁻ phenotype⁴¹. A comparison of the GFP expression in CD45⁺ and CD45⁻CD36⁺ populations reveals that shHIF2 α , but not shHIF1 α , affects both myeloid and erythroid cells (Figure 6A). However, it should be noted that there is a more severe decrease in the erythroid lineage compared to the myeloid differentiation. In fact, the proportion of erythroid lineage was $86 \pm 11\%$ of myeloid cells for shCtl and $84 \pm 26\%$ for the shHIF1 α groups, whereas it is only $51 \pm 31\%$ for the

shHIF2 α group. These data confirm the intrinsic function of HIF-2 α in the erythroid differentiation observed in vitro (Figure 2).

We further sought to determine whether HIF- α inactivation interfere with the T-lymphocyte development. Since human CD3⁺ T-lymphocytes are usually not detectable before 12-18 weeks in xenotransplant chimeras, we compared the percentage of transduced cells in lymphocytes population at 24 weeks. Interestingly, a lower proportion of GFP-expressing cells in T cells was noticed for the shHIF1 α vector in all hematological organs (Figure 6B), compared to the CD19 B-lymphocyte or CD33-myeloid cells (Figure 5D and F) measured in the same mouse bone marrow. The comparison of the ratio of the percentage of GFP-positive cells in the CD3⁺-T cells and the percentage of GFP-positive in CD19⁺-B cells between shCtl and shHIF1 α vectors indicates a 2-fold decrease in GFP-expressing cells for the shHIF1 α vector (Student's t-test: $P < 0.01$).

HIF-1 α and HIF-2 α knockdowns impair the most immature cells

Analysis of the GFP expression kinetic, tissue engraftment, and lineage differentiation strongly suggests an initial role of HIF-1 α and HIF-2 α in the stem cell behavior i.e. self-renewal, proliferation and/or survival. In order to confirm this assumption, we looked for the distribution of the GFP expression in different hematopoietic compartments in BM of primary mice at sacrifice (Figure 7A). The Lin⁻CD34⁺CD38^{lo/-} population is known to contain stem cells, ST- and LT-SRCs that home and repopulate hematopoietic tissues in a long-term manner, whereas the CD34⁻CD38⁺ population mostly comprises progenitor cells and CD34⁻CD38⁻ cells, which are mature hematopoietic cells. An impairment which would be limited to stem cells following HIF- α extinction would result in an equivalent percentage of GFP in all compartments, whereas an effect only on mature cells or an additive effect belonging to the

differentiation would result in a higher reduction in transduced progenitor/mature cells compared to transduced stem cells. Our results showed that HIF-1 α and HIF-2 α knockdowns only compromise the CD34⁺CD38^{lo/-} HSC compartment since the percentage of GFP expressing cells is identical in all compartments (Figure 7B).

Discussion

In this study, we have investigated the role of HIF-1 α and HIF-2 α in human hematopoietic stem/progenitor cells. By knocking down HIF-1 α and HIF-2 α , we can report for the first time that both transcription factors play important functions in human hematopoiesis. We have established that these two transcription factors are highly required for long-term HSC repopulation abilities, although a more profound defect was noted after HIF-2 α inhibition compared to HIF-1 α one. Moreover, these factors intervene in the differentiation of specific lineages: HIF-2 α is involved in erythroid differentiation, whereas HIF-1 α seems to be necessary for normal T-lymphoid development.

In *in vitro* assays, HIF-1 α and HIF-2 α are not required for the proliferation of human progenitors engaged in the myeloid lineage – both HIF-1 α - and HIF-2 α -deficient myeloid cells were able to form colonies in semi-solid medium (Figure 2A). These data are in agreement with the observation of the HIF- α deficient mouse models. Indeed, in a conditional HIF-1 α KO mouse model, HIF-1 α -deficient cells are still competent to generate CFU-C *in vitro* and CFU-S (12 days) after transplantation³⁷. Likewise, HIF-2 α deficient mouse bone marrow cells have normal CFU-S (8 days) production³⁵. It is worth noting that standard *in vitro* assays are typically performed under atmospheric oxygen concentration (21%). This hyper-oxygenized milieu favors a HIF- α downregulation, monitored by PHD activities, unless a specific mechanism such as growth factor stimulation, including SCF or TPO cell signaling, induces their stabilization^{46,47}. Thus it is not surprising that non-physiological CFC assay conditions did not reveal impaired progenitor development following HIF- α knockdowns.

However, when transplanted into the physiological mouse environment, cells faced low concentrations of oxygen. In this environment, short-term (2 to 3 weeks) CD45-positive

cell (mainly myeloid cells) repopulation was not affected by HIF-1 α , again, in agreement with data showing that ST-HSCs are not affected by HIF-1 α deletion in mouse³⁷. In contrast, a significant decrease in the number of myeloid cells was noted for HIF-2 α knockdown (Figures 5C and 6A), an observation that could not be linked to homing defect (Figure 3F). Several lines of evidence suggest that progenitor cells might reside in a relatively better-oxygenized environmental niches, although still hypoxic, than stem cells^{4,5,7}. HIF-1 α is stabilized at a lesser concentration (1%) of oxygen in a quick and transient manner compared to HIF-2 α , which is stabilized at 5% O₂ with a slower kinetic²². Therefore, it could be hypothesized that in vitro, the concentration of oxygen is sufficient to degrade both factors, whereas in vivo, HIF-1 α is not stabilized when HIF-2 α is still expressed and crucial for normal myeloid development and proliferation. Besides the control of HIF- α by oxygen tension, the difference in the target gene spectrum between the two factors could also be strongly suspected. On the other hand, we can presume that the decrease in progenitors derives from an upstream decline of stem cells such as ST-SRCs, rather than from a drop in committed cells.

HIF-1 α poorly influenced erythroid differentiation in vitro (Figure 2), whereas a strong effect was noticed when HIF-2 was extinguished both in vitro (Figure 2) and in vivo (Figure 6A), suggesting a cause independent of the oxygen status and unrelated to the erythropoietin production by kidney and liver. Interestingly, cells from Chuvash patients³¹ or from mice carrying a VHL mutation that recapitulates Chuvash polycythemia³² are highly sensitive to EPO and exhibit a higher erythroid capacity involving HIF-2 α signaling. While HIF-1 α knockdown seems to slightly impair progenitors (CD36⁺GPA⁻) and more mature cells (CD36⁺GPA⁺) in the same range, suggesting a very limited or upstream defect unrelated to erythroid differentiation, a progressive decrease to the terminal phase of the erythroid

differentiation was observed for HIF-2 α (Figure 2C). These data suggest that CD36 and glycophorin A expressions could be driven by HIF-2 α : while putative HREs exist in CD36 and in glycophorin A promoters, none of them have been functionally tested. More likely, there is a delayed differentiation through the control of other erythroid factors, such as those involved in cell metabolism, iron uptake, heme biosynthesis, or transcriptional activity.

Engraftment in the hematological tissues of NOD/SCID mice is a hallmark of hematopoietic stem cells. Based on the graft kinetic, on the length of the repopulation and on the clonal distribution, the existence of short- and long-term scid-repopulating cells (SRCs) has been postulated^{48,49}. In our mice, we observed that HIF-1 α and HIF-2 α knockdowns induce a progressive loss of transduced cells, which clearly indicates that the ST-SRCs are less concerned by the deficiency than the LT-SRCs. In addition, absence of difference in the percentage of GFP-expressing cells in the different hematopoietic compartments (mature CD34⁻CD38⁺ vs CD34⁺CD38⁻ stem cells), corroborates our assumption (Figure 7). However, although the kinetic of disappearance for HIF-1 α deficient cells parallels the HIF-2 α one to a significant extent, a stronger effect was observed for HIF-2 α , a phenomenon that cannot be justified by the composition of the graft, since all lineages behave similarly. This observation pleads once more in favor of the implication of the default in common progenitors or stem cells instead of a committed cell. One explanation that might account for the difference between HIF-1 α and HIF-2 α comes from the work of Covello and colleagues. By placing HIF-2 α into the HIF-1 α locus, they have shown that HIF-2 α rescues the loss of HIF-1 α by activating HIF-1 α target genes⁵⁰. Hence, HIF-2 α may potentially substitute HIF-1 α in HSCs, though conversely, the expression of HIF-1 α would not appear to be sufficient to replace HIF-2 α . However, at this stage of the study, it is difficult to identify the mechanisms by which the HIF subunits contribute to the stem cell maintenance, and the manner in which their activities differ.

Since 1978, the concept of “stem-cell niche” has emerged⁵¹, drawing attention to a place where heterogeneous cell populations interact, secreting cytokines which can activate signal transduction, building physical links between cells and the extracellular matrix, and evolving in an environment which is poorly served in nutrients and gases such as oxygen. Within the bone marrow, many HSCs reside at, or near, the endosteum, but others also reside adjacent to sinusoidal blood vessels⁵². Oxygen tension rapidly decreases in tissues – it is indeed admitted that cell oxygenation is highly proportional to the distance from the closest vessel or capillary. The mean diameter of a cell is 20 μm , ranging from 10 to 100 μm , and a distance of 140 μm from a vessel is enough to place a cell in high hypoxia. Thus it is possible to create a hypoxic niche with very few cell layers, even in a well-vascularized area. Low oxygen tension has been shown to prevent differentiation of healthy stem cells^{3,53,54}, as well as cancer stem cells (neuroblastoma and breast cancer)⁵⁵⁻⁵⁷, particularly through HIF signaling. It is therefore tempting to speculate that HIF- α participates in stem cell maintenance. While HIF-1 α is rapidly stimulated under a hypoxic stress, its expression is relatively transient, even if the hypoxia persists. In contrast, HIF-2 α is slowly induced, but its expression is stable, suggesting different functions. The difference in the sensitivity to oxygen is related to the PHD activity. Interestingly, in hematopoietic cells, HIF- α and PHDs are very variable between stem and mature cells³⁷, suggesting a complex regulation of HIF- α during hematopoiesis. Furthermore, within the bone marrow environment, the relationship between stromal, osteoblastic or endothelial cells and HSCs has to be considered either in terms of cell-cell contact and secretion of growth factor, and not just in terms of oxygen consumption. Therefore, understanding the precise regulation of HIF-1 α and HIF-2 α in bone marrow (especially in the hypoxic niche area) and mechanistic studies elucidating the impact of HIF- α on the long-term repopulation ability of HSC and on maturation steps driving HSC commitment deserve more investigation.

Acknowledgements

The authors extend their warmest thanks to all the staff at the *Maternité de Bagatelle* (Bordeaux, France) for providing cord blood samples, and to the laboratory of virology headed by Professor Fleury. The authors also extend their thanks to B. Rousseau (University of Bordeaux) for his help in providing animals and V. Pitard for cell sorting. K. R. is financed by a grant from the French *Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche* (MESR). The COST Action TD0901 also supports this work.

Contribution

K. R.-P. and F. M. designed and performed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript, while H. R. R and I. L.-G. performed the experiments, and Z. I. and H. V. analyzed the data.

Conflict-of-interest disclosure

The authors declare no competing financial interests.

Figure legends

Figure 1. Efficient HIF-1 α and HIF-2 α knockdowns using lentiviral-mediated RNA interference. (A) Lentiviral constructs for shCTL directed against dsRed mRNA, for two shHIF1 α and two shHIF2 α under the control of the H1 promoter. Vectors also contain the eGFP gene driven by the human EF1 α promoter. Upper cases indicate the loop and lower cases the shRNA sequence (left) and the inverted one (right). (B) Transduction efficiency determined in HEK293T cells by flow cytometry and eGFP expression for the different constructs: 0% for NT, 82% for shRFP, 82% for shHIF1 α .1, 87% for shHIF1 α .2, 87% for shHIF2 α .1, 97% for shHIF2 α .2 (C and D). Knockdown efficacy for HIF-1 α and HIF-2 α , respectively, was determined by western blot in the cells described in B. A 6-hour incubation with CoCl₂ was used to stabilize HIF and therefore to get a better image of the knockdown efficacy. (E) HIF- α expression showed by western blot in freshly purified CD34-positive cells. CoCl₂ was used to confirm the size of the HIF band. (F) Gene transfer efficiency in CD34-derived cells 4 days after transduction (upper panel). Because of the lower transduction compared to HEK293T cells, CD34 were sorted (lower panel) to determine the protein level for the different vectors by western blotting (G and H).

Figure 2. HIF-2 α inhibition affects erythroid differentiation. Differentiation ability of CD34⁺ transduced cells was challenged in methylcellulose and in liquid culture assays. (A) CFU (G, M, GM: indicated as myeloid) and BFU-E (erythroid) colonies formed from unsorted non-transduced cells (NT) and eGFP-positive sorted cells, as depicted in Figure 1F, were enumerated 2 weeks after seeding. # $P < 0.01$ compared to the value of myeloid for shHIF2 vector (Student's t-test) (B) GFP expression was determined in erythroid

differentiation assay after 12 days of culture by flow cytometry. CD36 is an early marker, whereas glycophorin A is a later marker. The percentage of CD36 was determined using the indicated gate, itself gated on viable cells by SSC and FSC (not shown). (C) Determination of the percentage of eGFP-positive cells 4 days after transduction or in early (CD36⁺Glycophorin A⁻) and late (CD36⁺Glycophorin A⁺) erythroid differentiated cells are presented as the mean \pm SD of 3 independent experiments. * $P < 0.01$ and ** $P < 0.05$ compared to at d4 value for the same vector (Student's t-test).

Figure 3. Both HIF-1 α and HIF-2 α are required for hematopoietic repopulation but not for homing in NOD-scid IL2Rg^{null} mice. (A) Schematic representation of the in vivo experiments. After a brief overnight incubation with lentiviral vectors, CD34-positive cells were directly and intravenously injected into mice. (B) Six weeks after the transplantation, animals were sacrificed and the bone marrow (pooled femurs and tibias) analyzed for the presence of GFP-positive cells in CD45-positive human cells by flow cytometry. Human CD45-positive myelo-lymphoid (R2) cells and CD45-negative erythroid (R3) were quantified by gating on viable cells. The percentage of GFP-positive cells among CD45-positive cells was determined by the region R4 gated on R2. (C) Data are presented as the percentage of GFP-positive cells compared to the percentage before transplantation (considered as 100%), for 4 mice in each group. (D) Schematic representation of the homing assay. Transduced cells were cultured 4 days prior intravenous injection. 24 hours after transplantation, animals were sacrificed and the bone marrow from both femurs was analyzed independently. (E) CD45-positive human graft was determined by flow cytometry in region R2 after gating on viable cells. GFP expression (R4) was quantified among these cells. (F) Data are presented as the percentage of GFP-positive compared to the percentage before transplantation (considered as 100%), for 6 mice (2 femurs per mouse) in each group from 2 independent experiments. NI:

non-injected control mouse; NT: non-transduced human cells. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared to the shCtl.

Figure 4. HIF-2 α knockdown has a higher incidence on long-term hematopoietic repopulation compared to HIF-1 α knockdown. (A) Schematic representation of the experiment. Overnight-transduced cells were injected intravenously into mice. Human graft and GFP expression were followed over time in bone marrow aspirates from the right femur at 3, 6 and 12 weeks and after sacrifice (week 24) in the right femur, pooled bone marrow (left femur, tibiae and pelvis), spleen and peripheral blood. Bone marrow was then injected into secondary mice to challenge the most primitive cells. Secondary graft was followed for 24 additional weeks similarly to the primary one. (B) As depicted in figure 3B, the percentage of GFP expression was determined in the human CD45-positive graft by flow cytometry for the non-transduced (NT) as well as shCtl-, shHIF1 α - and shHIF2 α -transduced cells. (C) The percentage of GFP-positive cells among CD45-positive human cells is shown in individual primary mice over time. 61 mice (16 NT, 14 shCtl, 19 shHIF1 and 12 shHIF2) from 6 independent experiments are shown. The horizontal grey bars indicate the lowest and the highest transduction values determined by the GFP expression after 4 days of in vitro culture.

Figure 5. HIF-1 α and HIF-2 α knockdowns impair myeloid and B-lymphoid lineages reconstitution in the same way. (A) GFP expression was determined after 4 days of culture (d4) and its kinetic was followed by flow cytometry in total CD45-positive human cells (R2 in Figure 3B and Figure 4) in the right femur of primary mice described in Figure 4C, at the indicated time; (B) in the pooled bone marrow (BM), in the spleen (Sp) and in the peripheral blood (PB) from primary (I^{ty}: black bars) and secondary (II^{ty}: open bars) mice, 24 weeks after

transplantation in both groups of mice. (C and D) GFP expression was determined in the CD45⁺CD33⁺-myeloid cells (gated on R2 in Figure 3B) and (E and F) in the CD45⁺CD19⁺-B-lymphoid cells. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ (Student's t-test) compared to shCtl in the corresponding organ. # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ (Student's t-test) compared to shHIF1 in the corresponding organ.

Figure 6. HIF-1 α is required for T-lymphoid lineage development whereas HIF-2 α is involved in erythroid differentiation in vivo. (A) GFP expression was analyzed in the CD45-positive (mostly myeloid; gate R2 in Figure 3B) and in CD45-negative erythroid (gate R3 in Figure 3B) populations at week 2.5 and compared to the determination at day 4 of in vitro culture. Data are presented as the mean of 33 mice from 3 independent experiments; * $P < 0.01$ compared to D4 cultured cells; ** $P < 0.01$ compared to myelo cells (Student's t-test). (B) GFP expression was analyzed in the CD3-T-lymphocytes in the different hematopoietic tissues in primary and in secondary transplants after sacrifice of the mice analyzed in figure 5A and B. # $P < 0.01$ (Student's t-test) compared to shCtl in the corresponding organ.

Figure 7. Hematopoietic repopulation deficiency appears in the most primitive cells. (A) At the time of the primary sacrifice (week 24), cells from pooled bone marrow were identified by flow cytometry on the base of the expression of the CD34 and the CD38 marker after gating on viable CD45-positive population. CD34⁺CD38^{lo/-}, CD34⁺CD38⁺ and CD34⁻CD38⁺ populations characterize primitive (including stem cells), progenitor and mature cells, respectively. (B) The histogram summarizes the percentage of GFP obtained for each subpopulation. Data are the mean \pm SD of 57 mice from 6 independent experiments.

Figure Supplemental S1. Hematopoietic repopulation deficiency appears in the most primitive cells. (A) Engraftment kinetic was followed by flow cytometry and presented as the mean of CD45-positive human cells (R2 in Figure 3B) from the right femur of primary mice at the indicated time; (B) in the pooled bone marrow (BM), in the spleen (Sp) and in the peripheral blood (PB) from primary (I^{ty}: black bars) and secondary (II^{ty}: open bars) mice, 24 weeks after transplantation in both groups of mice. The percentage of CD33⁺-myeloid cells (gated on R2 in Figure 3B) and CD19⁺-B-lymphoid cells among human CD45-positive cells was followed in aspirates at the indicated time points (C and E) and in the hematopoietic organs (D and F).

References

1. Cipolleschi MG, Dello Sbarba P, Olivotto M. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood*. 1993;82:2031-2037.
2. Danet GH, Pan Y, Luongo JL, Bonnet DA, Simon MC. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *J Clin Invest*. 2003;112:126-135.
3. Ivanovic Z, Bartolozzi B, Bernabei PA, et al. Incubation of murine bone marrow cells in hypoxia ensures the maintenance of marrow-repopulating ability together with the expansion of committed progenitors. *Br J Haematol*. 2000;108:424-429.
4. Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J*. 2001;81:685-696.
5. Harrison JS, Rameshwar P, Chang V, Bandari P. Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. *Blood*. 2002;99:394.
6. Vlaski M, Lafarge X, Chevaleyre J, Duchez P, Boiron JM, Ivanovic Z. Low oxygen concentration as a general physiologic regulator of erythropoiesis beyond the EPO-related downstream tuning and a tool for the optimization of red blood cell production ex vivo. *Exp Hematol*. 2009;37:573-584.
7. Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:5431-5436.
8. Simsek T, Kocabas F, Zheng J, et al. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell*. 2010;7:380-390.

9. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*. 2010;29:625-634.
10. Kietzmann T, Gorkach A. Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Semin Cell Dev Biol*. 2005;16:474-486.
11. Metzzen E, Ratcliffe PJ. HIF hydroxylation and cellular oxygen sensing. *Biol Chem*. 2004;385:223-230.
12. Rezvani HR, Dedieu S, North S, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha, a key factor in the keratinocyte response to UVB exposure. *J Biol Chem*. 2007;282:16413-16422.
13. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999;399:271-275.
14. Hu CJ, Sataur A, Wang L, Chen H, Simon MC. The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha. *Mol Biol Cell*. 2007;18:4528-4542.
15. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev*. 2002;16:1466-1471.
16. Jiang H, Guo R, Powell-Coffman JA. The *Caenorhabditis elegans* hif-1 gene encodes a bHLH-PAS protein that is required for adaptation to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:7916-7921.
17. Shen RJ, Jiang XY, Pu JW, Zou SM. HIF-1alpha and -2alpha genes in a hypoxia-sensitive teleost species *Megalobrama amblycephala*: cDNA cloning, expression and different responses to hypoxia. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2010;157:273-280.

18. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:721-732.
19. Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev*. 1997;11:72-82.
20. Tamiya H, Ikeda T, Jeong JH, et al. Analysis of the Runx2 promoter in osseous and non-osseous cells and identification of HIF2A as a potent transcription activator. *Gene*. 2008;416:53-60.
21. Srinivas V, Bohensky J, Zahm AM, Shapiro IM. Autophagy in mineralizing tissues: microenvironmental perspectives. *Cell Cycle*. 2009;8:391-393.
22. Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Lofstedt T, et al. Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell*. 2006;10:413-423.
23. Gruber M, Hu CJ, Johnson RS, Brown EJ, Keith B, Simon MC. Acute postnatal ablation of Hif-2alpha results in anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:2301-2306.
24. Qing G, Simon MC. Hypoxia inducible factor-2alpha: a critical mediator of aggressive tumor phenotypes. *Curr Opin Genet Dev*. 2009;19:60-66.
25. Pietras A, Hansford LM, Johnsson AS, et al. HIF-2alpha maintains an undifferentiated state in neural crest-like human neuroblastoma tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:16805-16810.
26. Li Z, Bao S, Wu Q, et al. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell*. 2009;15:501-513.

27. Scortegagna M, Ding K, Oktay Y, et al. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*^{-/-} mice. *Nat Genet.* 2003;35:331-340.
28. Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA, Simon MC. HIF-2 α promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell.* 2007;11:335-347.
29. Piccoli C, D'Aprile A, Ripoli M, et al. The hypoxia-inducible factor is stabilized in circulating hematopoietic stem cells under normoxic conditions. *FEBS Lett.* 2007;581:3111-3119.
30. Semenza GL. Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis. *Blood.* 2009;114:2015-2019.
31. Ang SO, Chen H, Hirota K, et al. Disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia. *Nat Genet.* 2002;32:614-621.
32. Hickey MM, Lam JC, Bezman NA, Rathmell WK, Simon MC. von Hippel-Lindau mutation in mice recapitulates Chuvash polycythemia via hypoxia-inducible factor-2 α signaling and splenic erythropoiesis. *J Clin Invest.* 2007;117:3879-3889.
33. Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J.* 1998;17:3005-3015.
34. Adelman DM, Maltepe E, Simon MC. Multilineage embryonic hematopoiesis requires hypoxic ARNT activity. *Genes Dev.* 1999;13:2478-2483.
35. Scortegagna M, Morris MA, Oktay Y, Bennett M, Garcia JA. The HIF family member EPAS1/HIF-2 α is required for normal hematopoiesis in mice. *Blood.* 2003;102:1634-1640.

36. Yoon D, Pastore YD, Divoky V, et al. Hypoxia-inducible factor-1 deficiency results in dysregulated erythropoiesis signaling and iron homeostasis in mouse development. *J Biol Chem.* 2006;281:25703-25711.
37. Takubo K, Goda N, Yamada W, et al. Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010;7:391-402.
38. Scortegagna M, Ding K, Zhang Q, et al. HIF-2alpha regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner. *Blood.* 2005;105:3133-3140.
39. Robert-Richard E, Ged C, Ortet J, et al. Human cell engraftment after busulfan or irradiation conditioning of NOD/SCID mice. *Haematologica.* 2006;91:1384.
40. Robert-Richard E, Lalanne M, Lamrissi-Garcia I, et al. Modeling of congenital erythropoietic porphyria by RNA interference: a new tool for preclinical gene therapy evaluation. *J Gene Med.* 2010;12:637-646.
41. Mazurier F, Doedens M, Gan OI, Dick JE. Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. *Nat Med.* 2003;9:959-963.
42. Covello KL, Kehler J, Yu H, et al. HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev.* 2006;20:557-570.
43. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med.* 2004;10:858-864.
44. Liu YL, Yu JM, Song XR, Wang XW, Xing LG, Gao BB. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 and metastasis by hypoxia-inducible factor in non small cell lung cancer cell lines. *Cancer Biol Ther.* 2006;5:1320-1326.

45. Lapidot T, Kollet O. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia*. 2002;16:1992-2003.
46. Kirito K, Fox N, Komatsu N, Kaushansky K. Thrombopoietin enhances expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in primitive hematopoietic cells through induction of HIF-1alpha. *Blood*. 2005;105:4258-4263.
47. Pedersen M, Lofstedt T, Sun J, Holmquist-Mengelbier L, Pahlman S, Ronnstrand L. Stem cell factor induces HIF-1alpha at normoxia in hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;377:98-103.
48. Guenechea G, Gan OI, Inamitsu T, et al. Transduction of human CD34+ CD38- bone marrow and cord blood-derived SCID-repopulating cells with third-generation lentiviral vectors. *Mol Ther*. 2000;1:566-573.
49. Mazurier F, Gan OI, McKenzie JL, Doedens M, Dick JE. Lentivector-mediated clonal tracking reveals intrinsic heterogeneity in the human hematopoietic stem cell compartment and culture-induced stem cell impairment. *Blood*. 2004;103:545-552.
50. Covelto KL, Simon MC, Keith B. Targeted replacement of hypoxia-inducible factor-1alpha by a hypoxia-inducible factor-2alpha knock-in allele promotes tumor growth. *Cancer Res*. 2005;65:2277-2286.
51. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4:7-25.
52. Kiel MJ, Morrison SJ. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:290-301.

53. Cipolleschi MG, Rovida E, Ivanovic Z, Praloran V, Olivotto M, Dello Sbarba P. The expansion of murine bone marrow cells preincubated in hypoxia as an in vitro indicator of their marrow-repopulating ability. *Leukemia*. 2000;14:735-739.
54. Ivanovic Z, Hermitte F, Brunet de la Grange P, et al. Simultaneous maintenance of human cord blood SCID-repopulating cells and expansion of committed progenitors at low O₂ concentration (3%). *Stem Cells*. 2004;22:716-724.
55. Das B, Tsuchida R, Malkin D, Koren G, Baruchel S, Yeger H. Hypoxia enhances tumor stemness by increasing the invasive and tumorigenic side population fraction. *Stem Cells*. 2008;26:1818-1830.
56. Holmquist L, Lofstedt T, Pahlman S. Effect of hypoxia on the tumor phenotype: the neuroblastoma and breast cancer models. *Adv Exp Med Biol*. 2006;587:179-193.
57. Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, et al. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain* 2010;133:983-995.

Figure 1

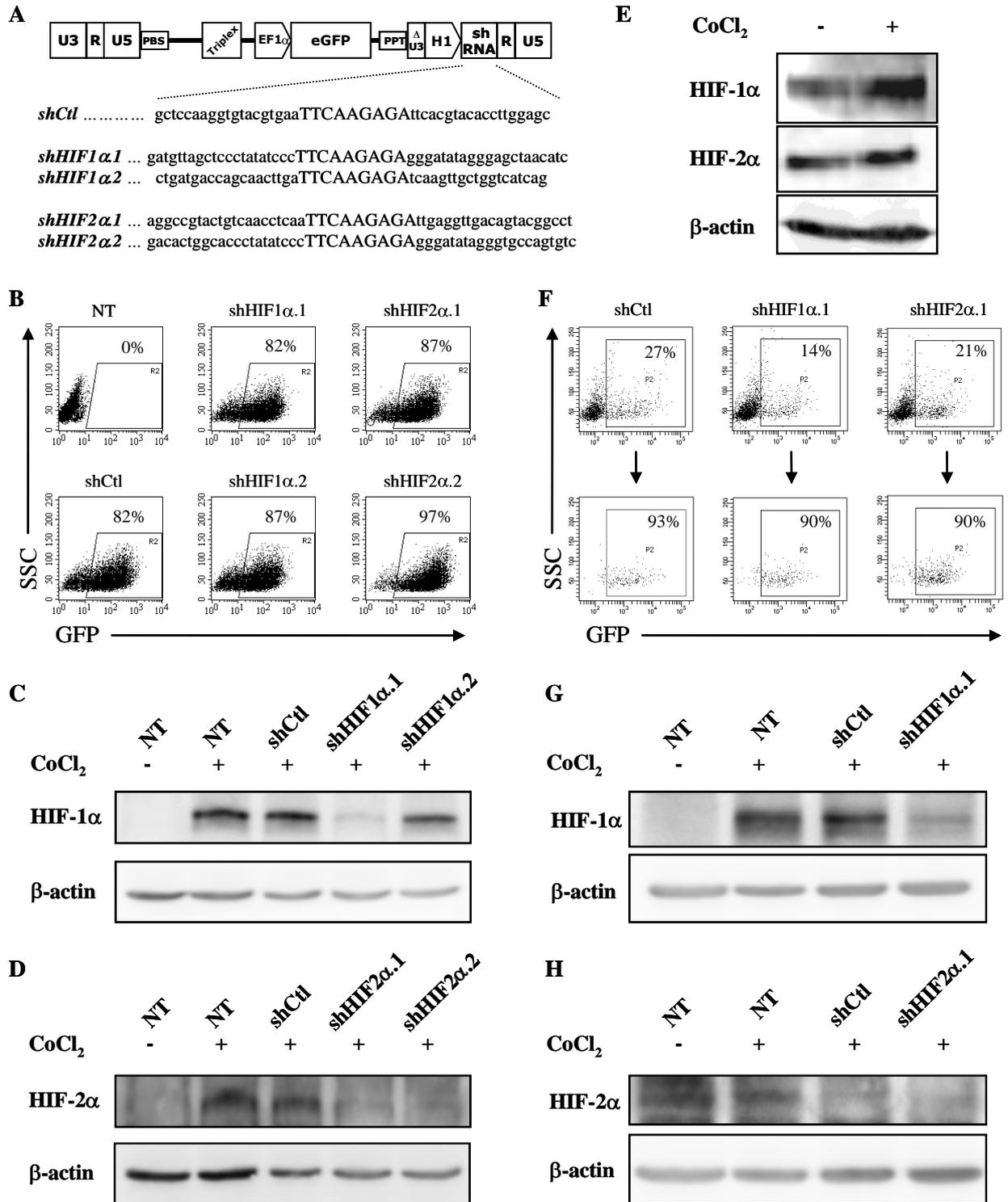
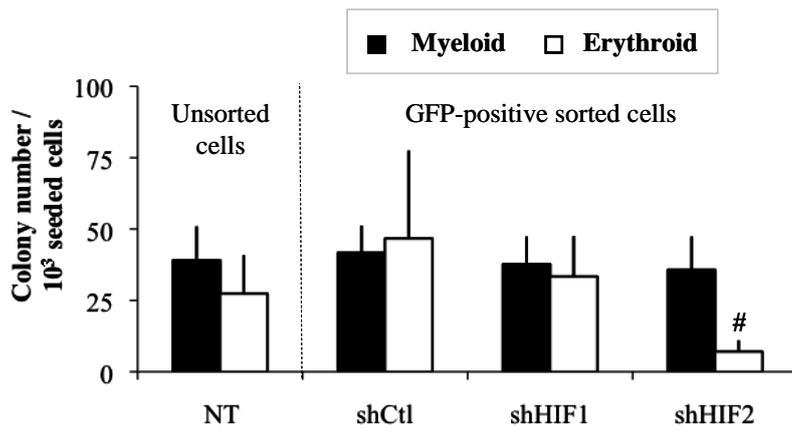
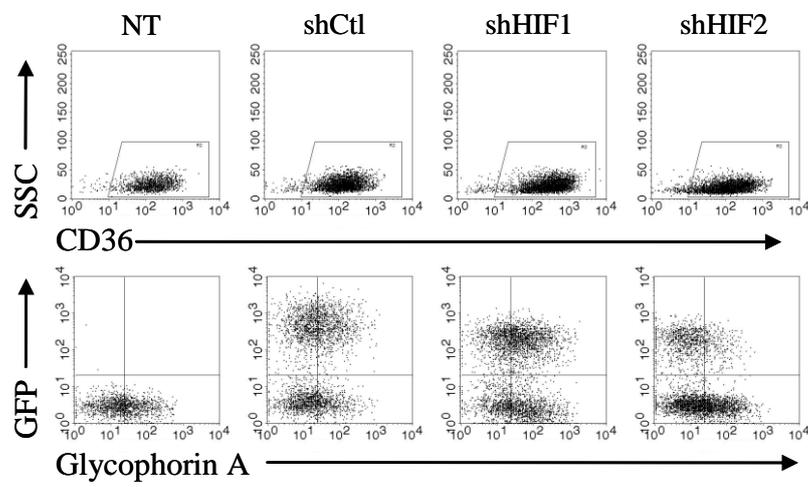


Figure 2

A



B



C

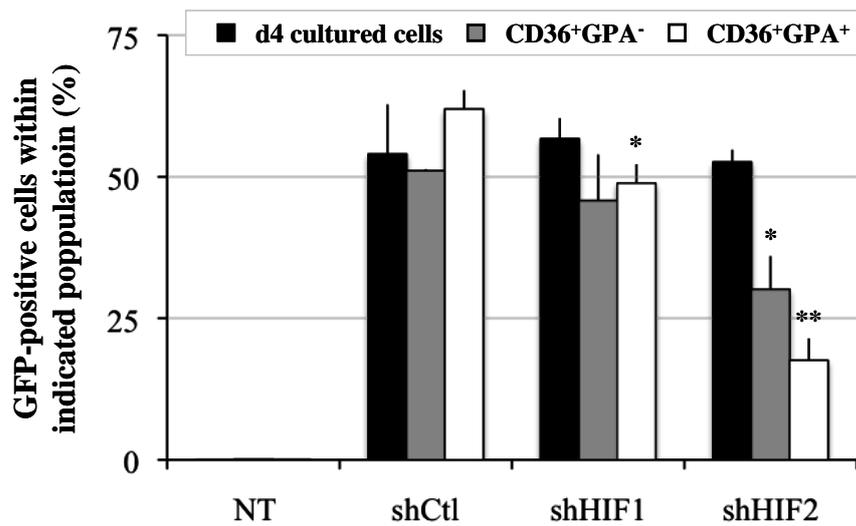


Figure 3

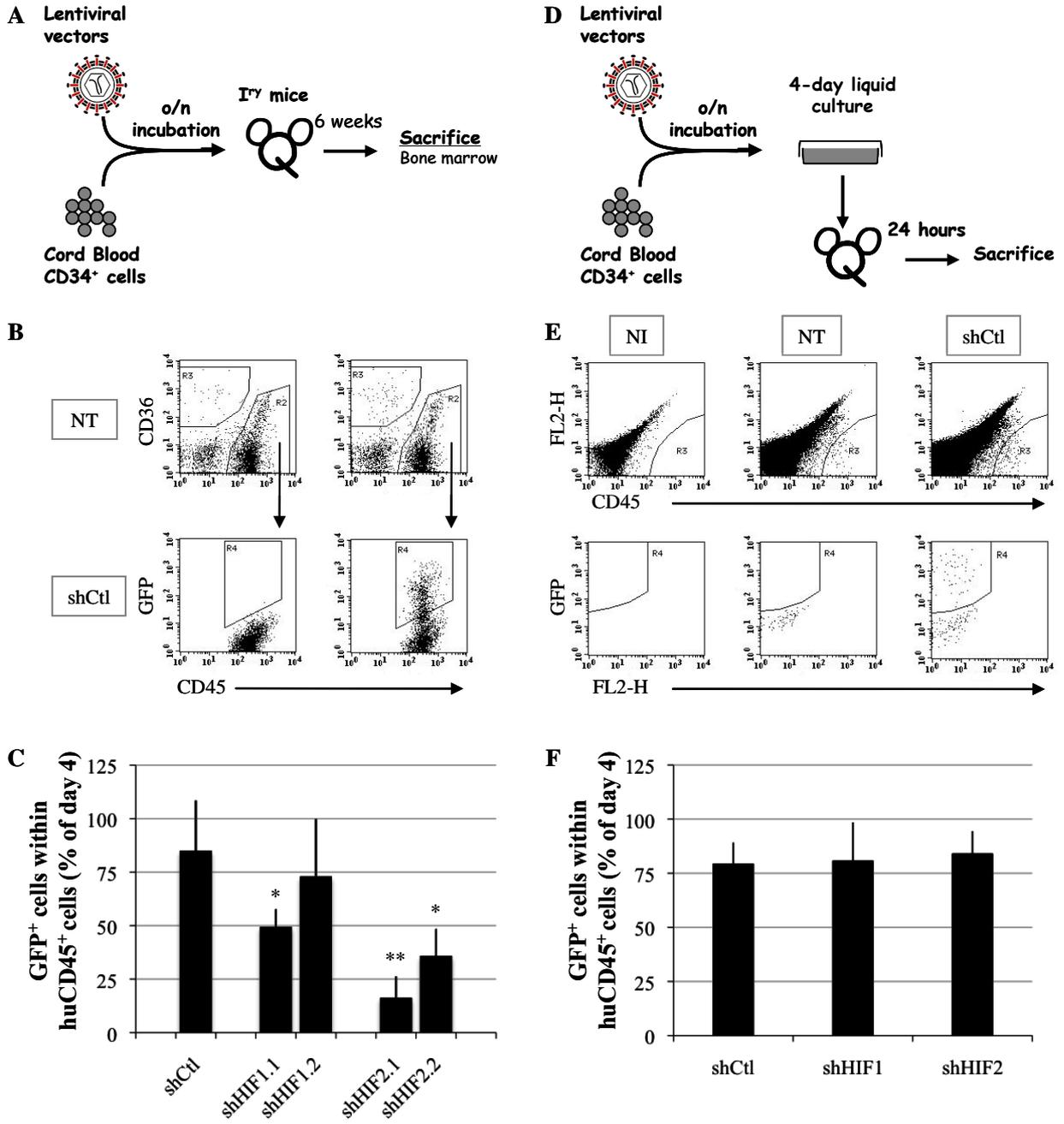
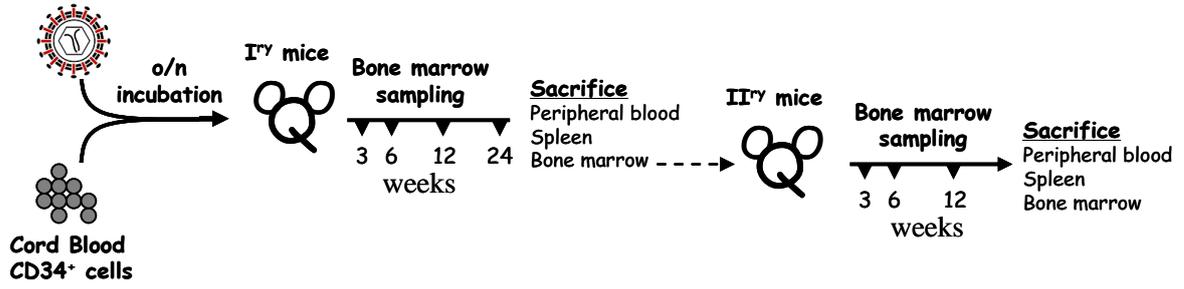
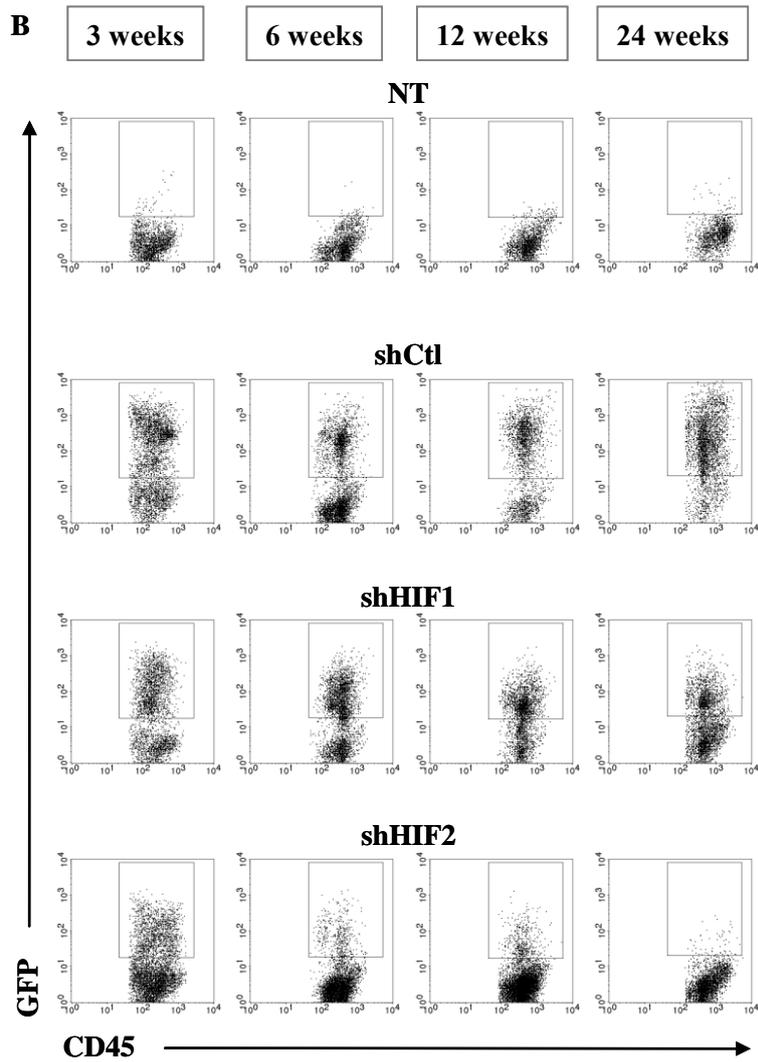


Figure 4

A Lentiviral vectors



B



C

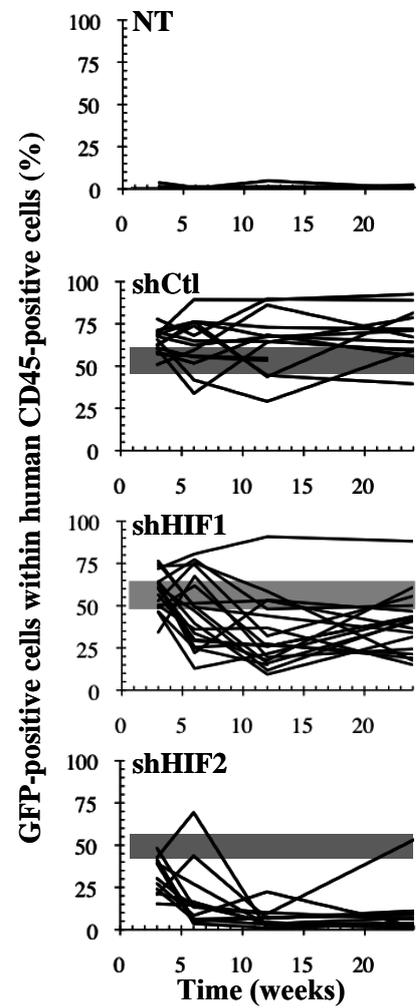


Figure 5

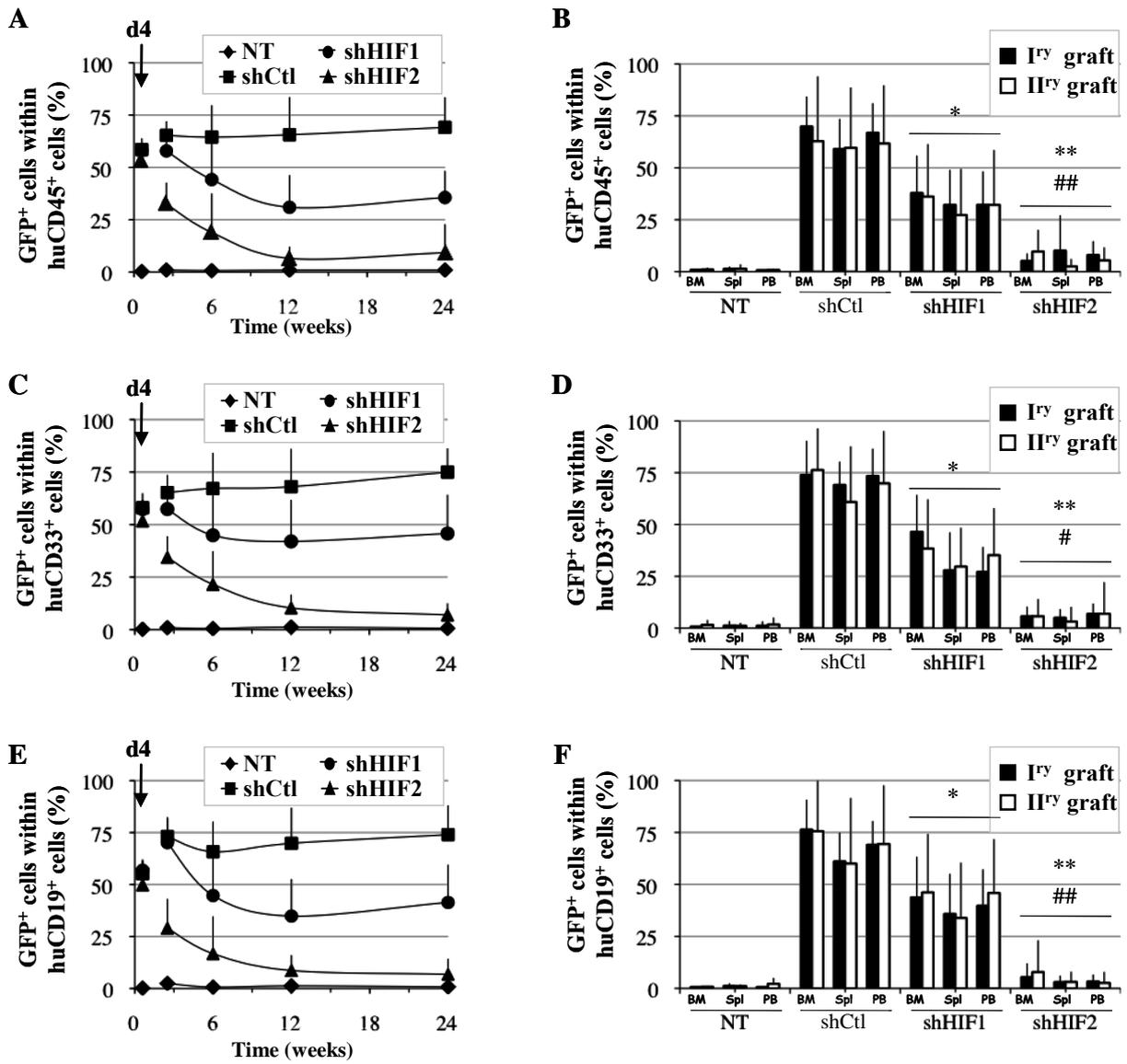
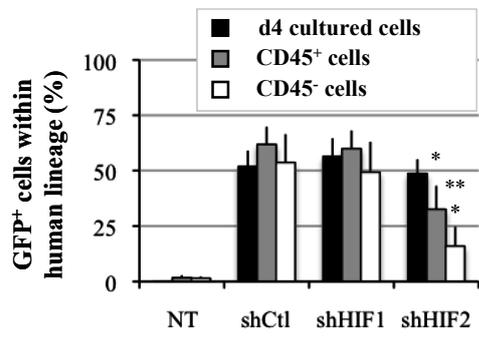


Figure 6

A



B

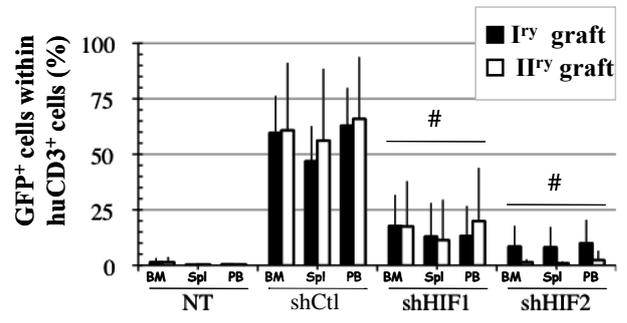
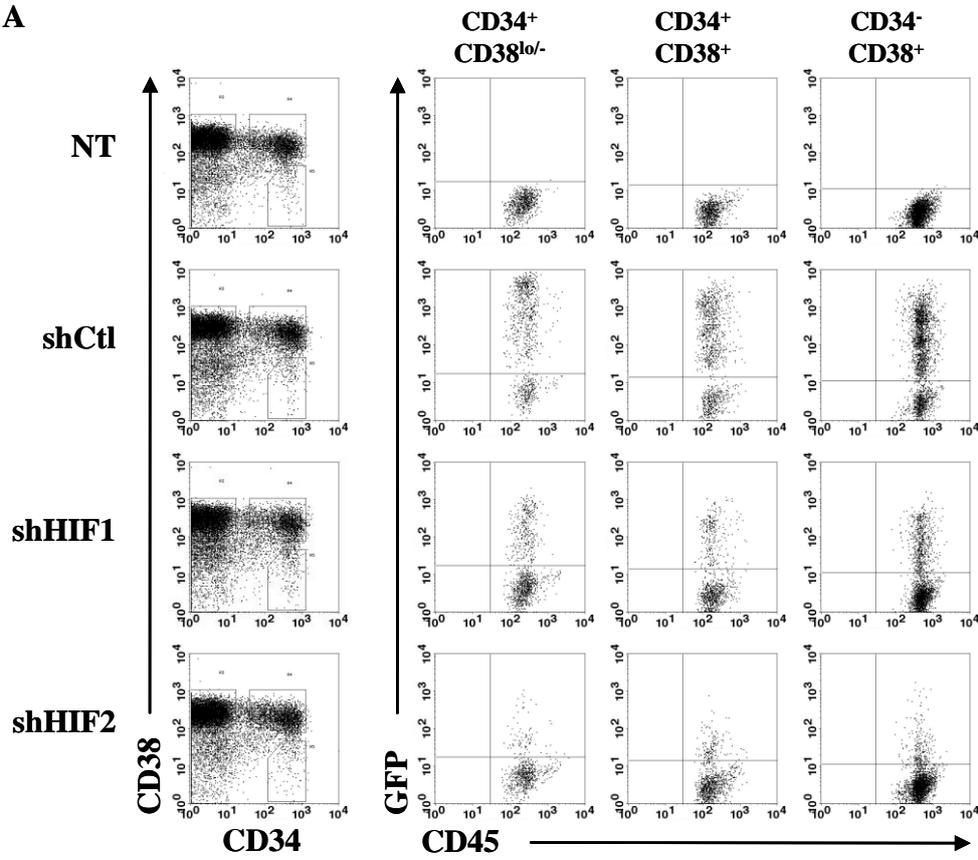


Figure 7

A



B

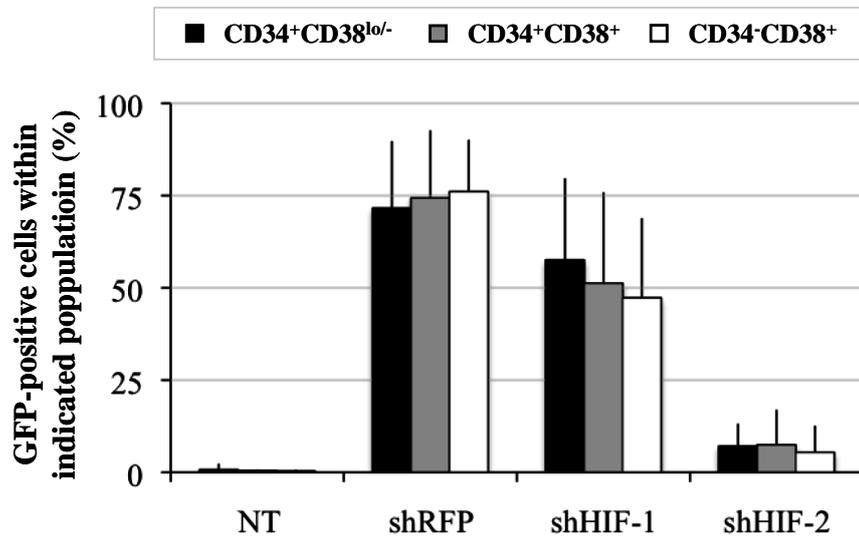
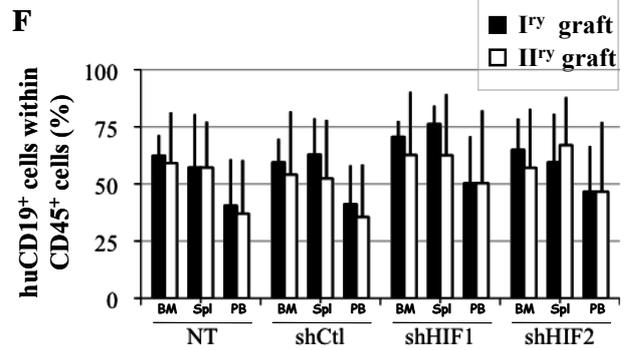
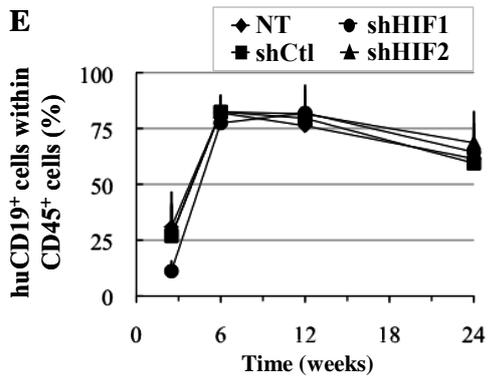
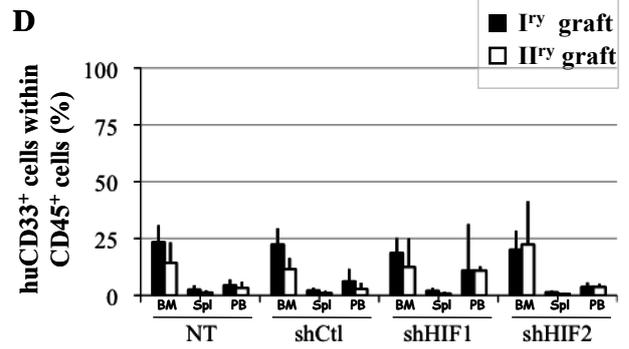
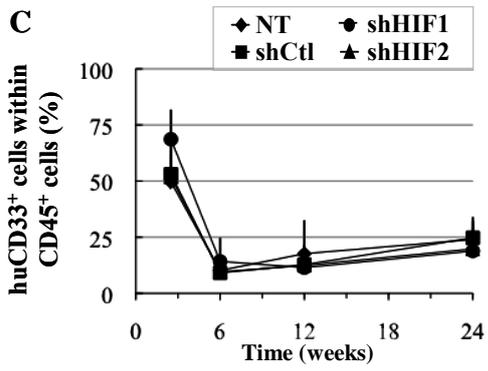
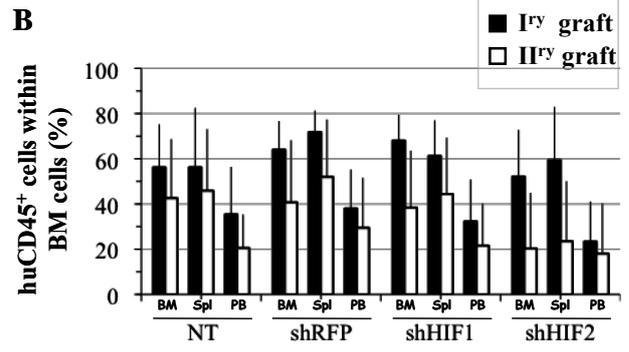
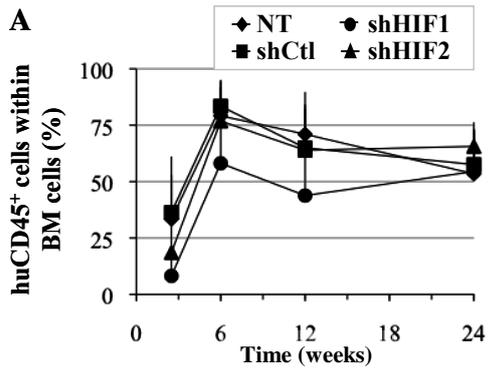


Figure Supplemental S1



DISCUSSION
&
PERSPECTIVES

3^{ème} CHAPITRE : Discussion et Perspectives

I. DISCUSSION

Nos travaux montrent, pour la première fois, l'importance des facteurs de transcription HIF dans le maintien à long terme des CSH humaines. Il est probable que l'inhibition de HIF-1 α provoque un déséquilibre dans le métabolisme glycolytique des CSH²² et pousse une partie des cellules en sénescence par la voie p16/p19 décrite par Takubo dans les CSH murines³⁹⁸. De façon intéressante, bien que la cinétique de perte des cellules déficientes pour HIF-1 α soit comparable à celle de HIF-2 α , un effet plus prononcé est observé dans les cellules inactivées pour HIF-2 α . En effet, une partie de la population des cellules inactivées pour HIF-1 α se maintient et se différencie normalement. Il est possible que HIF-2 α palie à l'absence de HIF-1 α dans cette population de cellules, leur permettant ainsi de perdurer. En effet, le knockin dans des cellules ES de HIF-2 α , au niveau du locus de HIF-1 α , a prouvé qu'il est capable d'activer les gènes cibles de HIF-1 α ²⁸⁴. A l'inverse, nos résultats semblent montrer que la seule présence de HIF-1 α , dans les cellules inactivées pour HIF-2 α , ne suffise pas à maintenir ces cellules, qui vont progressivement disparaître en douze semaines. Il n'est pas surprenant que la perte de HIF-2 α entraîne un déséquilibre cellulaire. En effet, HIF-2 α régule l'expression d'enzymes essentielles à la régulation des ROS telles que la catalase, la Gpx1 et les SOD²⁸³. Or, l'accumulation de ROS dans la cellule va provoquer des dommages de l'ADN, qui peuvent aboutir à la mort cellulaire.

Les facteurs de transcription HIF régulent potentiellement de nombreuses voies de signalisation nécessaires au maintien des CSH. HIF-1 α , par exemple, régule la quiescence des CSH en agissant sur le métabolisme glycolytique et en limitant la respiration mitochondriale qui est une source de ROS, mais ce ne sont pas les seules voies régulées par HIF-1 α : tout comme HIF-2 α , il participe à la signalisation de Notch ou encore à l'adhésion des cellules en régulant l'expression d'intégrines. HIF-2 α régule également l'expression de la pompe à efflux ABCG2 et des facteurs nécessaires à l'autorenouvellement des CSH tels que la cycline D1 et c-Myc.

Il est très probable que les effets observés en l'absence d'un de ces deux facteurs ne soient pas le résultat du dérèglement d'une seule voie mais plutôt de la perte de régulation d'une combinaison de voies indispensables au maintien des CSH.

II. RESULTATS PRELIMINAIRES AUX PERSPECTIVES

En inhibant l'expression des facteurs HIF-1 α et HIF-2 α , nous avons montré que ces deux facteurs sont nécessaires au maintien des capacités de repopulation à long terme des tissus hématologiques. En outre, nous avons pu constater que l'inhibition de HIF-2 α provoque une perte plus importante des CSH que celle de HIF-1 α et affecte profondément la différenciation de la lignée érythroïde *in vitro* mais aussi *in vivo*.

Afin de comprendre quels mécanismes pouvaient être mis en jeu, nous avons étudié le comportement des CSH *in vitro* et de façon surprenante, les résultats montrent que l'inhibition de HIF-2 α , même en normoxie, affecte le comportement des CSH. Nous avons donc trié les cellules et évalué leurs capacités prolifératives en présence ou en l'absence des facteurs HIF. Ces résultats ayant montré une absence de prolifération des cellules CD34⁺ en l'absence de HIF-2 α , et pas de modification dans le cas de HIF-1 α , nous nous sommes interrogés sur les mécanismes mis en place : arrêt du cycle cellulaire et/ou apoptose. Cette étude nous a conduits à l'analyse du statut de la protéine p53, responsable entre autres, de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'activation de la mort cellulaire programmée.

A. CYCLE CELLULAIRE ET MORT CELLULAIRE

L'inhibition de HIF-2 α dans les cellules CD34⁺ stoppe leur prolifération, alors que l'inactivation de HIF-1 α ne semble pas modifier les capacités prolifératives des cellules CD34⁺, en normoxie. Nous avons donc cherché à savoir si les différentes phases du cycle cellulaire étaient modifiées et si la mort cellulaire était augmentée.

Le marquage immunofluorescent par incorporation de BrdU (*bromodéoxyuridine*) permet de déterminer la fréquence de division des cellules. Le BrdU est incorporé pendant la synthèse S, il est ainsi possible de suivre la progression dans la phase S et dans les autres phases du cycle cellulaire en utilisant un contre marquage. Le BrdU incorporé est marqué par un anti-BrdU fluorescent qui est analysable en cytométrie. Ici, nous avons couplé le marquage BrdU à un marquage 7-AAD (*7-amino-actinomycin D*) qui marque l'ADN total. La combinaison des deux marqueurs permet, en cytométrie en flux, la caractérisation et la quantification des cellules qui synthétisent de l'ADN (incorporation du BrdU) et de déterminer la position des cellules dans le cycle cellulaire (G0/G1, S ou G2/M en fonction de l'intensité du marquage au

7-AAD). La population cellulaire la plus négative pour le 7-AAD (population en noire) correspond aux cellules en apoptose.

Les cellules ont été transduites à J0 et placées en milieu d'expansion STEM ALPHA[®] pendant 8 jours, puis incubées 5 heures avec du BrdU et marquées avec un anti-BrdU et le 7-AAD (*figure 41*).

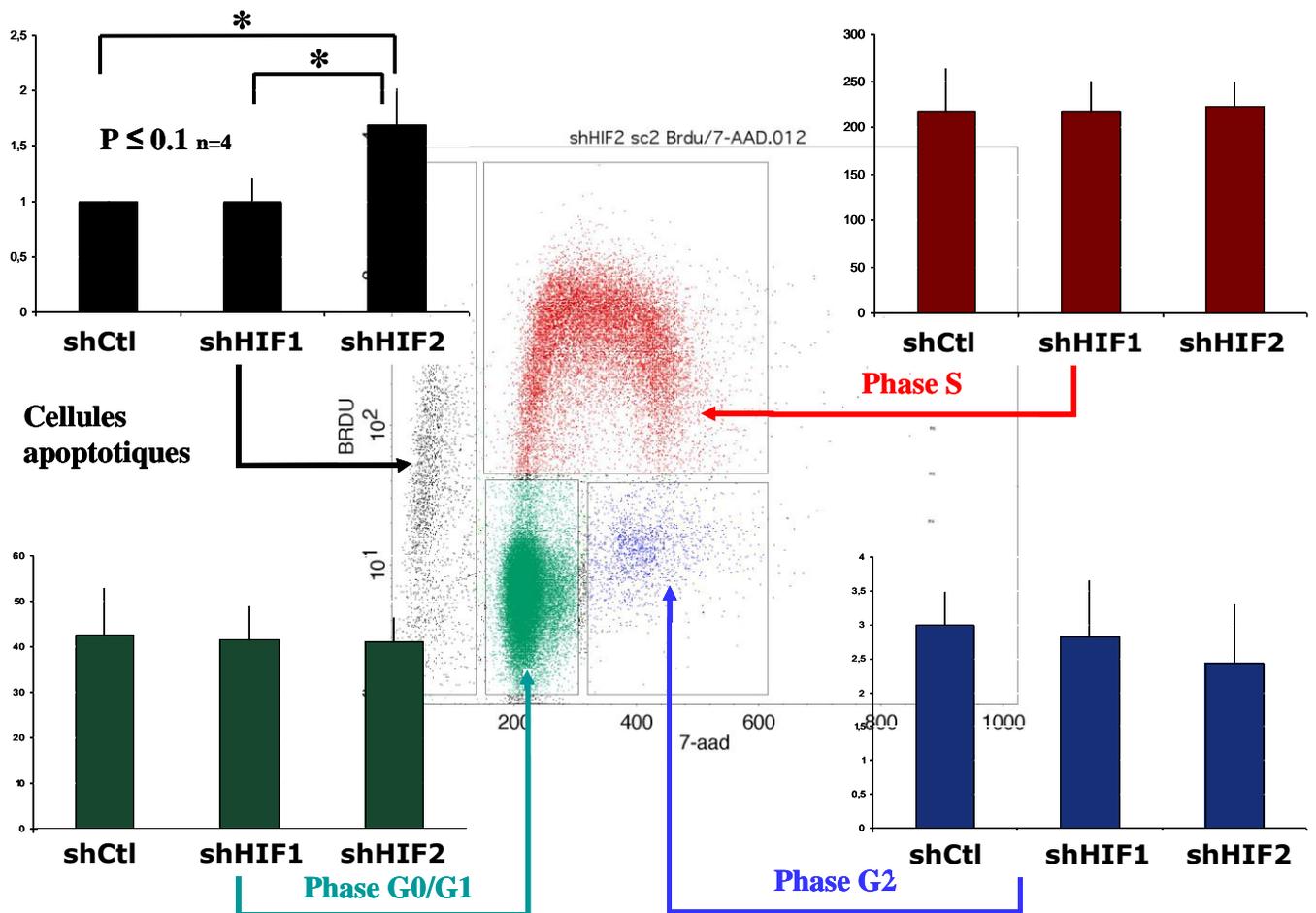


Figure 41 : Effets de l'inactivation des facteurs HIF sur le cycle cellulaire et l'apoptose des CSH

Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de modification significative des différentes phases du cycle cellulaire (n=4). Cependant, les cellules transduites avec le shHIF2 présentent une mort cellulaire plus importante.

D'après les travaux de Bertout, l'inhibition de HIF-2 α dans les cellules tumorales augmente les ROS intracellulaires³⁷¹. Les dommages de l'ADN occasionnés par cette

augmentation, activent les mécanismes de réparation de l'ADN médiés par ATM. Cette activation stabilise la protéine p53 qui provoque l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules. A l'inverse, la surexpression de HIF-2 α entraîne la dégradation de p53 de manière Hdm2 dépendante⁴⁴⁷. Il semble donc que la stabilisation de p53 et donc la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose soient dépendantes de l'état d'activation de HIF-2 α .

B. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION P53

En couplant la cytométrie en flux à un marquage fluorescent intracellulaire de la protéine p53, nous avons pu observer, *in vitro* après 8 jours de culture, le statut de p53 dans les cellules CD34⁺ transduites avec les différents shRNA (*figure 42*).

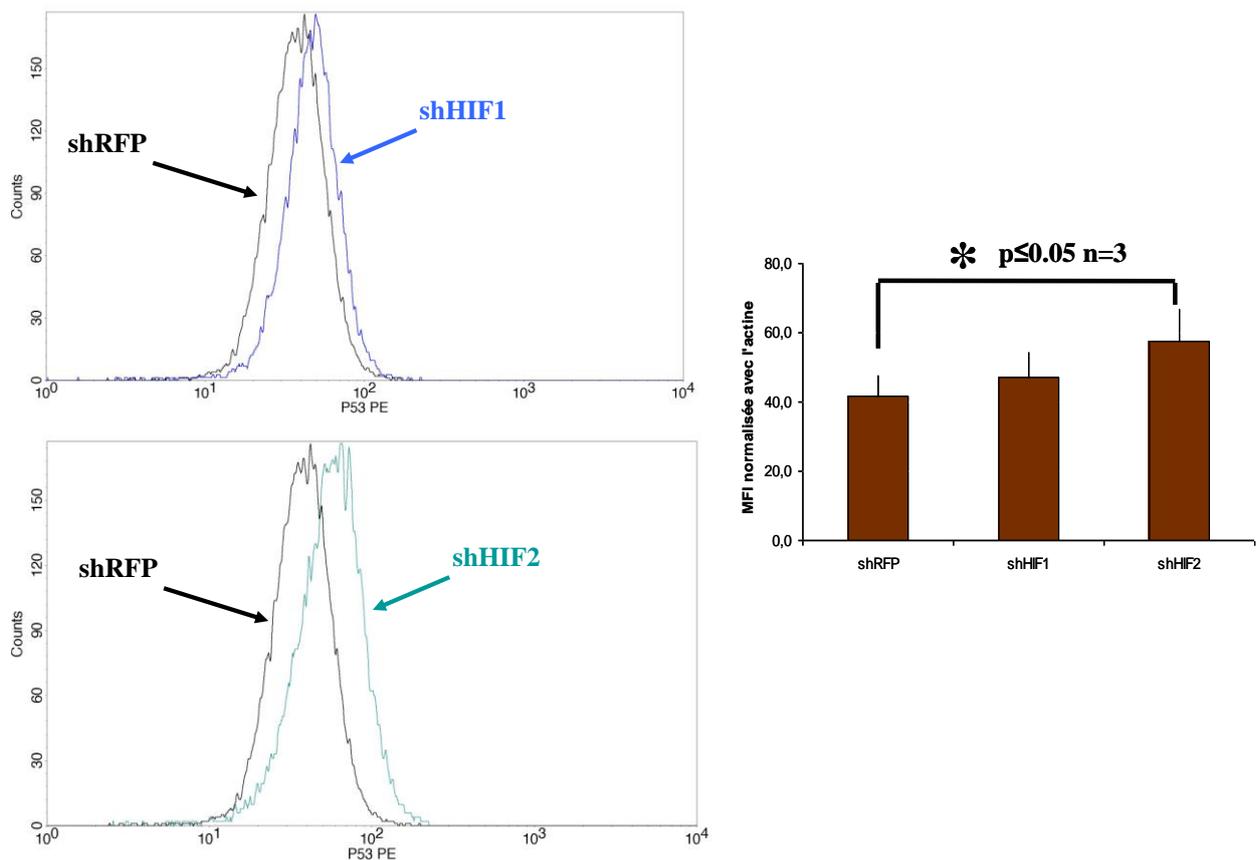


Figure 42 : Stabilisation de p53 dans les cellules CD34⁺ en l'absence de HIF-2 α

Les résultats obtenus avec le shHIF1 ne montrent pas d'augmentation significative de la protéine p53. Alors que l'inhibition de HIF-2 α accroît la stabilisation de la protéine p53. Nos résultats sont en accord avec les résultats déjà observés dans les cellules de RCC, de carcinomes pulmonaires et de neuroblastomes^{371,382}, où l'inhibition de HIF-2 α a pour effet de stabiliser p53 et ainsi d'augmenter l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose.

III. PERSPECTIVES

La stabilisation de p53, dans les cellules CD34⁺ humaines déficientes en HIF-2 α , doit être vérifiée *in vivo*. Cette approche pourrait être réalisée au laboratoire, en greffant des souris NOG, et par prélèvement intrafémoral après 6 à 12 semaines de greffes. Le marquage immunofluorescent de la protéine p53 et l'analyse par cytométrie permettrait de confirmer ou d'infirmer ces résultats. Si l'analyse confirmait ces résultats, il serait nécessaire de regarder le niveau de ROS cytoplasmique et mitochondriaux qui pourraient être à l'origine de cette stabilisation. Par ailleurs, la protéine p53 est également stabilisée sous l'action de p19^{arf}. Or, Cited2 qui est un gène cible de HIF-2 α régule négativement cette protéine. En effet, la délétion de Cited2 dans les CSH augmente l'expression de p16, de p19 et de p53, cette activation entraîne la perte des CSH⁶⁸. De plus, Cited2 permet l'expression de Bmi-1 qui réprime directement p16 et p19^{29,448}. (figure 43).

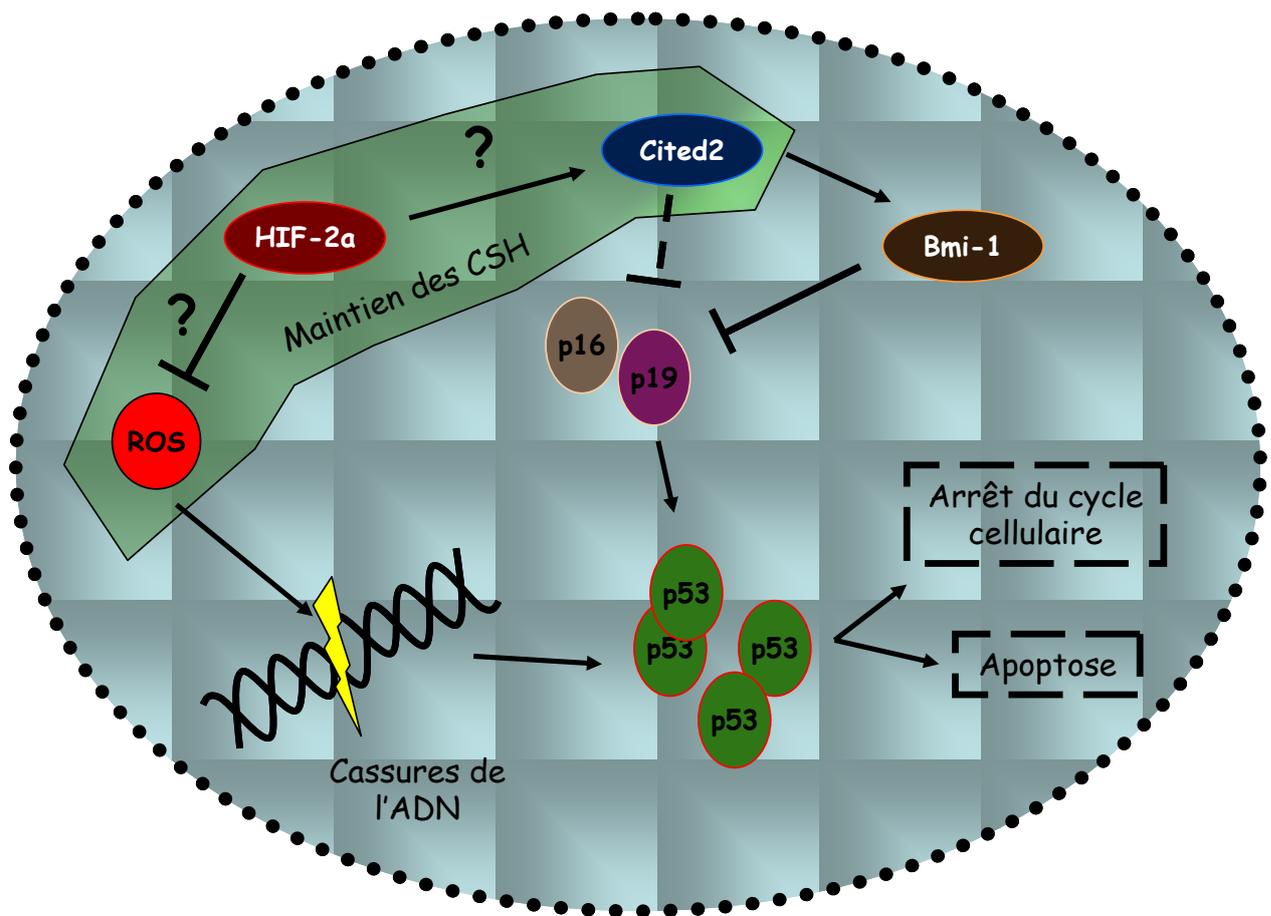


Figure 43 : Schéma hypothétique de la régulation des CSH par HIF-2 α

De plus, afin de caractériser les gènes cibles de HIF-1 α et HIF-2 α et les voies de signalisation affectées dans le maintien des CSH, nous avons réalisé un tri des cellules CD34⁺ humaines exprimant la GFP, 6 semaines après la xéno greffe. Les échantillons regroupent des lots de quatre animaux par condition (NT, shRFP, shHIF1.1, shHIF1.2, shHIF2.1 et shHIF2.2), qui sont actuellement stockés à -80°C. Une approche d'analyse du transcriptome est envisagée, toutefois nous avons déjà identifié des gènes potentiellement impliqués dans ces mécanismes et généré des amorces pour RT-qPCR (ABCG2, ITGA9, CCND1, Hes1, Hey1...).

Enfin, nous avons construit au laboratoire des vecteurs surexprimants les formes sauvages et mutées de HIF-1 α et HIF-2 α : *cartes des plasmides en annexe*

- **pRRLSIN-PGK-EGFP-MND-HA-HIF1alpha-WPRE**
- **pRRLSIN-PGK-EGFP-MND-HA-HIF1alpha-P402A/P564A-WPRE**
- **pRRLSIN-PGK-EGFP-MND-HA-HIF2alpha-WPRE**
- **pRRLSIN-PGK-EGFP-MND-HA-HIF2alpha-P405A/P531A-WPRE**

Ces vecteurs vont nous permettre de déterminer l'impact de la surexpression des facteurs HIF sur les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques humains *in vitro* et *in vivo*. L'utilisation de la forme sauvage versus la forme mutée va nous permettre d'observer un effet dose de l'expression des facteurs HIF.

BIBLIOGRAPHIE

1. Huang X, Cho S, Spangrude GJ. Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal. *Cell Death Differ.* 2007;14:1851-1859
2. Ema H, Morita Y, Yamazaki S, et al. Adult mouse hematopoietic stem cells: purification and single-cell assays. *Nat Protoc.* 2006;1:2979-2987.
3. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells.* 1978;4:7-25.
4. Moore MA, Metcalf D. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol.* 1970;18:279-296.
5. Cumano A, Godin I. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:745-785.
6. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development.* 1998;125:725-732.
7. Gekas C, Dieterlen-Lievre F, Orkin SH, Mikkola HK. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell.* 2005;8:365-375.
8. Ottersbach K, Dzierzak E. The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Dev Cell.* 2005;8:377-387.
9. Bonnet D. Hematopoietic stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2003;69:219-229.
10. Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:3120-3125.
11. Foudi A, Hochedlinger K, Van Buren D, et al. Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2009;27:84-90.
12. Wilson A, Laurenti E, Oser G, et al. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell.* 2008;135:1118-1129.
13. Ito K, Hirao A, Arai F, et al. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature.* 2004;431:997-1002.
14. Mitsiadis TA, Barrandon O, Rochat A, Barrandon Y, De Bari C. Stem cell niches in mammals. *Exp Cell Res.* 2007;313:3377-3385.
15. Gordan JD, Thompson CB, Simon MC. HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell.* 2007;12:108-113.
16. Yu L, Quinn DA, Garg HG, Hales CA. Gene expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and effect of heparin on their expression in mice with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;345:1565-1572.
17. Zhang J, Lu A, Li L, Yue J, Lu Y. p16 Modulates VEGF expression via its interaction with HIF-1alpha in breast cancer cells. *Cancer Invest;*28:588-597.
18. Peng ZG, Zhou MY, Huang Y, et al. Physical and functional interaction of Runt-related protein 1 with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Oncogene.* 2008;27:839-847.
19. Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res.* 2009;102:19-65.
20. Lekli I, Gurusamy N, Ray D, Tosaki A, Das DK. Redox regulation of stem cell mobilization. *Can J Physiol Pharmacol.* 2009;87:989-995.
21. Tang T, Arbiser JL, Brandt SJ. Phosphorylation by mitogen-activated protein kinase mediates the hypoxia-induced turnover of the TAL1/SCL transcription factor in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2002;277:18365-18372.

22. Simsek T, Kocabas F, Zheng J, et al. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell*;7:380-390.
23. Wolf N, Yang W, Dunk CE, et al. Regulation of the matricellular proteins CYR61 (CCN1) and NOV (CCN3) by hypoxia-inducible factor-1{alpha} and transforming-growth factor-3 in the human trophoblast. *Endocrinology*;151:2835-2845.
24. Freedman SJ, Sun ZY, Kung AL, France DS, Wagner G, Eck MJ. Structural basis for negative regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by CITED2. *Nat Struct Biol*. 2003;10:504-512.
25. Aprelikova O, Wood M, Tackett S, Chandramouli GV, Barrett JC. Role of ETS transcription factors in the hypoxia-inducible factor-2 target gene selection. *Cancer Res*. 2006;66:5641-5647.
26. Schmidt D, Textor B, Pein OT, et al. Critical role for NF-kappaB-induced JunB in VEGF regulation and tumor angiogenesis. *Embo J*. 2007;26:710-719.
27. Otto T, Fandrey J. Thyroid hormone induces hypoxia-inducible factor 1alpha gene expression through thyroid hormone receptor beta/retinoid x receptor alpha-dependent activation of hepatic leukemia factor. *Endocrinology*. 2008;149:2241-2250.
28. Oka M, Tachibana M, Noda K, Inoue N, Tanaka M, Kuwabara K. Relevance of anti-reactive oxygen species activity to anti-inflammatory activity of components of eviprost, a phytotherapeutic agent for benign prostatic hyperplasia. *Phytomedicine*. 2007;14:465-472.
29. Kranc KR, Bamforth SD, Braganca J, Norbury C, van Lohuizen M, Bhattacharya S. Transcriptional coactivator Cited2 induces Bmi1 and Me18 and controls fibroblast proliferation via Ink4a/ARF. *Mol Cell Biol*. 2003;23:7658-7666.
30. Lacorazza HD, Yamada T, Liu Y, et al. The transcription factor MEF/ELF4 regulates the quiescence of primitive hematopoietic cells. *Cancer Cell*. 2006;9:175-187.
31. Liu Y, Elf SE, Miyata Y, et al. p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. *Cell Stem Cell*. 2009;4:37-48.
32. Cheng T, Rodrigues N, Shen H, et al. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science*. 2000;287:1804-1808.
33. Yu H, Yuan Y, Shen H, Cheng T. Hematopoietic stem cell exhaustion impacted by p18 INK4C and p21 Cip1/Waf1 in opposite manners. *Blood*. 2006;107:1200-1206.
34. Yuan Y, Shen H, Franklin DS, Scadden DT, Cheng T. In vivo self-renewing divisions of haematopoietic stem cells are increased in the absence of the early G1-phase inhibitor, p18INK4C. *Nat Cell Biol*. 2004;6:436-442.
35. Janzen V, Forkert R, Fleming HE, et al. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature*. 2006;443:421-426.
36. Orford KW, Scadden DT. Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat Rev Genet*. 2008;9:115-128.
37. Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, et al. Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2004;431:1002-1007.
38. Zeng H, Yucel R, Kosan C, Klein-Hitpass L, Moroy T. Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells. *Embo J*. 2004;23:4116-4125.
39. Zhang J, Grindley JC, Yin T, et al. PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. *Nature*. 2006;441:518-522.
40. Miyamoto K, Araki KY, Naka K, et al. Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell*. 2007;1:101-112.
41. Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell*. 2007;128:325-339.
42. Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature*. 2002;419:316-321.

43. Porcher C, Swat W, Rockwell K, Fujiwara Y, Alt FW, Orkin SH. The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell*. 1996;86:47-57.
44. Robb L, Elwood NJ, Elefanty AG, et al. The scl gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *Embo J*. 1996;15:4123-4129.
45. Mikkola HK, Klintman J, Yang H, et al. Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature*. 2003;421:547-551.
46. Reynaud D, Ravet E, Titeux M, et al. SCL/TAL1 expression level regulates human hematopoietic stem cell self-renewal and engraftment. *Blood*. 2005;106:2318-2328.
47. Brunet de la Grange P, Armstrong F, Duval V, et al. Low SCL/TAL1 expression reveals its major role in adult hematopoietic myeloid progenitors and stem cells. *Blood*. 2006;108:2998-3004.
48. Suzuki N, Ohneda O, Minegishi N, et al. Combinatorial Gata2 and Sca1 expression defines hematopoietic stem cells in the bone marrow niche. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:2202-2207.
49. Tsai FY, Keller G, Kuo FC, et al. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*. 1994;371:221-226.
50. Ezoe S, Matsumura I, Nakata S, et al. GATA-2/estrogen receptor chimera regulates cytokine-dependent growth of hematopoietic cells through accumulation of p21(WAF1) and p27(Kip1) proteins. *Blood*. 2002;100:3512-3520.
51. Heyworth C, Gale K, Dexter M, May G, Enver T. A GATA-2/estrogen receptor chimera functions as a ligand-dependent negative regulator of self-renewal. *Genes Dev*. 1999;13:1847-1860.
52. Tipping AJ, Pina C, Castor A, et al. High GATA-2 expression inhibits human hematopoietic stem and progenitor cell function by effects on cell cycle. *Blood*. 2009;113:2661-2672.
53. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell*. 1996;84:321-330.
54. Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA. Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:3444-3449.
55. Ichikawa M, Asai T, Saito T, et al. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med*. 2004;10:299-304.
56. Ichikawa M, Goyama S, Asai T, et al. AML1/Runx1 negatively regulates quiescent hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *J Immunol*. 2008;180:4402-4408.
57. Tsuzuki S, Hong D, Gupta R, Matsuo K, Seto M, Enver T. Isoform-specific potentiation of stem and progenitor cell engraftment by AML1/RUNX1. *PLoS Med*. 2007;4:e172.
58. Perkins AS, Fishel R, Jenkins NA, Copeland NG. Evi-1, a murine zinc finger proto-oncogene, encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Mol Cell Biol*. 1991;11:2665-2674.
59. Goyama S, Yamamoto G, Shimabe M, et al. Evi-1 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and transformed leukemic cells. *Cell Stem Cell*. 2008;3:207-220.
60. Passegue E, Wagner EF, Weissman IL. JunB deficiency leads to a myeloproliferative disorder arising from hematopoietic stem cells. *Cell*. 2004;119:431-443.
61. Galan-Caridad JM, Harel S, Arenzana TL, et al. Zfx controls the self-renewal of embryonic and hematopoietic stem cells. *Cell*. 2007;129:345-357.

62. Hock H, Meade E, Medeiros S, et al. Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes Dev.* 2004;18:2336-2341.
63. Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science.* 2002;298:597-600.
64. Shojaei F, Trowbridge J, Gallacher L, et al. Hierarchical and ontogenic positions serve to define the molecular basis of human hematopoietic stem cell behavior. *Dev Cell.* 2005;8:651-663.
65. McCallum L, Irvine AE. CCN3--a key regulator of the hematopoietic compartment. *Blood Rev.* 2009;23:79-85.
66. Gupta R, Hong D, Iborra F, Sarno S, Enver T. NOV (CCN3) functions as a regulator of human hematopoietic stem or progenitor cells. *Science.* 2007;316:590-593.
67. Sandy AR, Maillard I. Notch signaling in the hematopoietic system. *Expert Opin Biol Ther.* 2009;9:1383-1398.
68. Kranc KR, Schepers H, Rodrigues NP, et al. Cited2 is an essential regulator of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2009;5:659-665.
69. Park IK, Qian D, Kiel M, et al. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature.* 2003;423:302-305.
70. Lessard J, Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature.* 2003;423:255-260.
71. Argiropoulos B, Humphries RK. Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene.* 2007;26:6766-6776.
72. Magnusson M, Brun AC, Miyake N, et al. HOXA10 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and erythroid/megakaryocyte development. *Blood.* 2007;109:3687-3696.
73. Buske C, Feuring-Buske M, Antonchuk J, et al. Overexpression of HOXA10 perturbs human lymphomyelopoiesis in vitro and in vivo. *Blood.* 2001;97:2286-2292.
74. Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, et al. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:12223-12227.
75. Lawrence HJ, Christensen J, Fong S, et al. Loss of expression of the Hoxa-9 homeobox gene impairs the proliferation and repopulating ability of hematopoietic stem cells. *Blood.* 2005;106:3988-3994.
76. Thorsteinsdottir U, Mamo A, Kroon E, et al. Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood.* 2002;99:121-129.
77. Hu YL, Passegue E, Fong S, Largman C, Lawrence HJ. Evidence that the Pim1 kinase gene is a direct target of HOXA9. *Blood.* 2007;109:4732-4738.
78. Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ, et al. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev.* 1995;9:1753-1765.
79. Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation. *Exp Hematol.* 2001;29:1125-1134.
80. Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell.* 2002;109:39-45.
81. Amsellem S, Pflumio F, Bardin D, et al. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nat Med.* 2003;9:1423-1427.
82. Buske C, Feuring-Buske M, Abramovich C, et al. Deregulated expression of HOXB4 enhances the primitive growth activity of human hematopoietic cells. *Blood.* 2002;100:862-868.

83. Brun AC, Bjornsson JM, Magnusson M, et al. Hoxb4-deficient mice undergo normal hematopoietic development but exhibit a mild proliferation defect in hematopoietic stem cells. *Blood*. 2004;103:4126-4133.
84. Kirito K, Fox N, Kaushansky K. Thrombopoietin stimulates Hoxb4 expression: an explanation for the favorable effects of TPO on hematopoietic stem cells. *Blood*. 2003;102:3172-3178.
85. Reya T, Duncan AW, Ailles L, et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003;423:409-414.
86. Darnell JE, Jr. STATs and gene regulation. *Science*. 1997;277:1630-1635.
87. Lacronique V, Boureux A, Valle VD, et al. A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science*. 1997;278:1309-1312.
88. Griesinger F, Hennig H, Hillmer F, et al. A BCR-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11.2) translocation in a patient with a clinically typical chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;44:329-333.
89. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434:1144-1148.
90. Chung YJ, Park BB, Kang YJ, Kim TM, Eaves CJ, Oh IH. Unique effects of Stat3 on the early phase of hematopoietic stem cell regeneration. *Blood*. 2006;108:1208-1215.
91. Wierenga AT, Schepers H, Moore MA, Vellenga E, Schuringa JJ. STAT5-induced self-renewal and impaired myelopoiesis of human hematopoietic stem/progenitor cells involves down-modulation of C/EBPalpha. *Blood*. 2006;107:4326-4333.
92. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131:861-872.
93. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol*. 2008;26:1276-1284.
94. Kim JB, Greber B, Arauzo-Bravo MJ, et al. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature*. 2009;461:649-643.
95. Giorgetti A, Montserrat N, Aasen T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell*. 2009;5:353-357.
96. Haase A, Olmer R, Schwanke K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell*. 2009;5:434-441.
97. Takenaka C, Nishishita N, Takada N, Jakt LM, Kawamata S. Effective generation of iPS cells from CD34+ cord blood cells by inhibition of p53. *Exp Hematol*;38:154-162.
98. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318:1917-1920.
99. Raya A, Rodriguez-Piza I, Guenechea G, et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2009;460:53-59.
100. Cho HJ, Lee CS, Kwon YW, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation. *Blood*;116:386-395.
101. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008;132:631-644.
102. Rhodes J, Hagen A, Hsu K, et al. Interplay of pu.1 and gata1 determines myeloerythroid progenitor cell fate in zebrafish. *Dev Cell*. 2005;8:97-108.
103. Starck J, Cohet N, Gonnet C, et al. Functional cross-antagonism between transcription factors FLI-1 and EKLf. *Mol Cell Biol*. 2003;23:1390-1402.
104. Dahl R, Iyer SR, Owens KS, Cuylear DD, Simon MC. The transcriptional repressor GFI-1 antagonizes PU.1 activity through protein-protein interaction. *J Biol Chem*. 2007;282:6473-6483.

105. Nutt SL, Kee BL. The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity*. 2007;26:715-725.
106. Robb L. Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene*. 2007;26:6715-6723.
107. Dybedal I, Bryder D, Fossum A, Rusten LS, Jacobsen SE. Tumor necrosis factor (TNF)-mediated activation of the p55 TNF receptor negatively regulates maintenance of cycling reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood*. 2001;98:1782-1791.
108. Scandura JM, Boccuni P, Massague J, Nimer SD. Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:15231-15236.
109. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294:862-864.
110. Vasilatou D, Papageorgiou S, Pappa V, Papageorgiou E, Dervenoulas J. The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Eur J Haematol*;84:1-16.
111. Georgantas RW, 3rd, Hildreth R, Morisot S, et al. CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:2750-2755.
112. Liao R, Sun J, Zhang L, et al. MicroRNAs play a role in the development of human hematopoietic stem cells. *J Cell Biochem*. 2008;104:805-817.
113. Felli N, Fontana L, Pelosi E, et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:18081-18086.
114. Dore LC, Amigo JD, Dos Santos CO, et al. A GATA-1-regulated microRNA locus essential for erythropoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:3333-3338.
115. Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, et al. MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:5078-5083.
116. Fontana L, Pelosi E, Greco P, et al. MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopoiesis through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. *Nat Cell Biol*. 2007;9:775-787.
117. Fontana L, Fiori ME, Albini S, et al. Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM. *PLoS One*. 2008;3:e2236.
118. Zhou B, Wang S, Mayr C, Bartel DP, Lodish HF. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:7080-7085.
119. Xiao C, Calado DP, Galler G, et al. MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell*. 2007;131:146-159.
120. Thai TH, Calado DP, Casola S, et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science*. 2007;316:604-608.
121. Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, et al. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:7024-7029.
122. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:118-130.
123. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*. 1983;301:527-530.
124. Kamel-Reid S, Dick JE. Engraftment of immune-deficient mice with human hematopoietic stem cells. *Science*. 1988;242:1706-1709.
125. Lapidot T, Pflumio F, Doedens M, Murdoch B, Williams DE, Dick JE. Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science*. 1992;255:1137-1141.

126. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol.* 1995;154:180-191.
127. Greiner DL, Shultz LD, Yates J, et al. Improved engraftment of human spleen cells in NOD/LtSz-scid/scid mice as compared with C.B-17-scid/scid mice. *Am J Pathol.* 1995;146:888-902.
128. Pflumio F, Izac B, Katz A, Shultz LD, Vainchenker W, Coulombel L. Phenotype and function of human hematopoietic cells engrafting immune-deficient CB17-severe combined immunodeficiency mice and nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice after transplantation of human cord blood mononuclear cells. *Blood.* 1996;88:3731-3740.
129. Cashman J, Bockhold K, Hogge DE, Eaves AC, Eaves CJ. Sustained proliferation, multi-lineage differentiation and maintenance of primitive human haemopoietic cells in NOD/SCID mice transplanted with human cord blood. *Br J Haematol.* 1997;98:1026-1036.
130. Hogan CJ, Shpall EJ, McNiece I, Keller G. Multilineage engraftment in NOD/LtSz-scid/scid mice from mobilized human CD34+ peripheral blood progenitor cells. *Biol Blood Marrow Transplant.* 1997;3:236-246.
131. Yoshino H, Ueda T, Kawahata M, et al. Natural killer cell depletion by anti-asialo GM1 antiserum treatment enhances human hematopoietic stem cell engraftment in NOD/Shi-scid mice. *Bone Marrow Transplant.* 2000;26:1211-1216.
132. Shultz LD, Banuelos SJ, Leif J, et al. Regulation of human short-term repopulating cell (STRC) engraftment in NOD/SCID mice by host CD122+ cells. *Exp Hematol.* 2003;31:551-558.
133. Christianson SW, Greiner DL, Hesselton RA, et al. Enhanced human CD4+ T cell engraftment in beta2-microglobulin-deficient NOD-scid mice. *J Immunol.* 1997;158:3578-3586.
134. Kollet O, Peled A, Byk T, et al. beta2 microglobulin-deficient (B2m(null)) NOD/SCID mice are excellent recipients for studying human stem cell function. *Blood.* 2000;95:3102-3105.
135. Glimm H, Eisterer W, Lee K, et al. Previously undetected human hematopoietic cell populations with short-term repopulating activity selectively engraft NOD/SCID-beta2 microglobulin-null mice. *J Clin Invest.* 2001;107:199-206.
136. Shultz LD, Lang PA, Christianson SW, et al. NOD/LtSz-Rag1null mice: an immunodeficient and radioresistant model for engraftment of human hematolymphoid cells, HIV infection, and adoptive transfer of NOD mouse diabetogenic T cells. *J Immunol.* 2000;164:2496-2507.
137. Shultz LD, Banuelos S, Lyons B, et al. NOD/LtSz-Rag1nullPfpnull mice: a new model system with increased levels of human peripheral leukocyte and hematopoietic stem-cell engraftment. *Transplantation.* 2003;76:1036-1042.
138. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood.* 2002;100:3175-3182.
139. Traggiai E, Chicha L, Mazzucchelli L, et al. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science.* 2004;304:104-107.
140. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol.* 2005;174:6477-6489.
141. Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. *Blood.* 2005;106:1565-1573.
142. Sugamura K, Asao H, Kondo M, et al. The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:179-205.

143. Guenechea G, Segovia JC, Albella B, et al. Delayed engraftment of nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice transplanted with ex vivo-expanded human CD34(+) cord blood cells. *Blood*. 1999;93:1097-1105.
144. Mazurier F, Doedens M, Gan OI, Dick JE. Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. *Nat Med*. 2003;9:959-963.
145. Robert-Richard E, Ged C, Ortet J, et al. Human cell engraftment after busulfan or irradiation conditioning of NOD/SCID mice. *Haematologica*. 2006;91:1384.
146. Bonnet D, Bhatia M, Wang JC, Kapp U, Dick JE. Cytokine treatment or accessory cells are required to initiate engraftment of purified primitive human hematopoietic cells transplanted at limiting doses into NOD/SCID mice. *Bone Marrow Transplant*. 1999;23:203-209.
147. Hao QL, Thiemann FT, Petersen D, Smogorzewska EM, Crooks GM. Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population. *Blood*. 1996;88:3306-3313.
148. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol*. 1984;133:157-165.
149. Drew E, Huettner CS, Tenen DG, McNagny KM. CD34 expression by mast cells: of mice and men. *Blood*. 2005;106:1885-1887.
150. Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:12240-12244.
151. Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M. Human bone marrow CD34- cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells. *Exp Hematol*. 1998;26:353-360.
152. Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med*. 1998;4:1038-1045.
153. Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Zeng H, Ogawa M. Reversible expression of CD34 by adult human bone marrow long-term engrafting hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 2003;31:406-412.
154. Brunet De La Grange P, Barthe C, Lippert E, et al. Oxygen concentration influences mRNA processing and expression of the cd34 gene. *J Cell Biochem*. 2006;97:135-144.
155. Dorrell C, Gan OI, Pereira DS, Hawley RG, Dick JE. Expansion of human cord blood CD34(+)CD38(-) cells in ex vivo culture during retroviral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency: dissociation of SRC phenotype and function. *Blood*. 2000;95:102-110.
156. Tajima F, Deguchi T, Laver JH, Zeng H, Ogawa M. Reciprocal expression of CD38 and CD34 by adult murine hematopoietic stem cells. *Blood*. 2001;97:2618-2624.
157. Kobari L, Giarratana MC, Pflumio F, Izac B, Coulombel L, Douay L. CD133+ cell selection is an alternative to CD34+ cell selection for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *J Hematother Stem Cell Res*. 2001;10:273-281.
158. Giebel B, Corbeil D, Beckmann J, et al. Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2004;104:2332-2338.
159. Ferrandina G, Petrillo M, Bonanno G, Scambia G. Targeting CD133 antigen in cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2009;13:823-837.
160. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:2804-2808.

161. Peault B, Weissman IL, Buckle AM, Tsukamoto A, Baum C. Thy-1-expressing CD34+ human cells express multiple hematopoietic potentialities in vitro and in SCID-hu mice. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1993;35:91-93.
162. Sharma S, Gurudutta GU, Satija NK, et al. Stem cell c-KIT and HOXB4 genes: critical roles and mechanisms in self-renewal, proliferation, and differentiation. *Stem Cells Dev.* 2006;15:755-778.
163. Moore MA. Converging pathways in leukemogenesis and stem cell self-renewal. *Exp Hematol.* 2005;33:719-737.
164. Sharma Y, Astle CM, Harrison DE. Heterozygous kit mutants with little or no apparent anemia exhibit large defects in overall hematopoietic stem cell function. *Exp Hematol.* 2007;35:214-220.
165. Colvin M, Russo JE, Hilton J, Dulik DM, Fenselau C. Enzymatic mechanisms of resistance to alkylating agents in tumor cells and normal tissues. *Adv Enzyme Regul.* 1988;27:211-221.
166. Christ O, Lucke K, Imren S, et al. Improved purification of hematopoietic stem cells based on their elevated aldehyde dehydrogenase activity. *Haematologica.* 2007;92:1165-1172.
167. Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol.* 1977;91:335-344.
168. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell.* 2008;132:598-611.
169. Xie Y, Yin T, Wiegraebe W, et al. Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature.* 2009;457:97-101.
170. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest.* 2006;116:1195-1201.
171. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 2005;121:1109-1121.
172. Deguchi K, Yagi H, Inada M, Yoshizaki K, Kishimoto T, Komori T. Excessive extramedullary hematopoiesis in Cbfa1-deficient mice with a congenital lack of bone marrow. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;255:352-359.
173. Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood.* 2005;105:2631-2639.
174. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 2003;425:841-846.
175. Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 2003;425:836-841.
176. Nilsson SK, Johnston HM, Whitty GA, et al. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 2005;106:1232-1239.
177. Visnjic D, Kalajzic I, Gronowicz G, et al. Conditional ablation of the osteoblast lineage in Col2.3deltatk transgenic mice. *J Bone Miner Res.* 2001;16:2222-2231.
178. Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J, Aguila HL. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood.* 2004;103:3258-3264.
179. Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, et al. Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone.* 1999;25:517-523.
180. Jung Y, Song J, Shiozawa Y, et al. Hematopoietic stem cells regulate mesenchymal stromal cell induction into osteoblasts thereby participating in the formation of the stem cell niche. *Stem Cells.* 2008;26:2042-2051.
181. Lo Celso C, Fleming HE, Wu JW, et al. Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature.* 2009;457:92-96.

182. Li W, Johnson SA, Shelley WC, et al. Primary endothelial cells isolated from the yolk sac and para-aortic splanchnopleura support the expansion of adult marrow stem cells in vitro. *Blood*. 2003;102:4345-4353.
183. Li W, Johnson SA, Shelley WC, Yoder MC. Hematopoietic stem cell repopulating ability can be maintained in vitro by some primary endothelial cells. *Exp Hematol*. 2004;32:1226-1237.
184. Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med*. 2004;10:64-71.
185. Batard P, Monier MN, Fortunel N, et al. TGF-(beta)1 maintains hematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle and induces CD34 antigen up-modulation. *J Cell Sci*. 2000;113 (Pt 3):383-390.
186. Garbe A, Spyridonidis A, Mobest D, Schmoor C, Mertelsmann R, Henschler R. Transforming growth factor-beta 1 delays formation of granulocyte-macrophage colony-forming cells, but spares more primitive progenitors during ex vivo expansion of CD34+ haemopoietic progenitor cells. *Br J Haematol*. 1997;99:951-958.
187. Sitnicka E, Ruscetti FW, Priestley GV, Wolf NS, Bartelmez SH. Transforming growth factor beta 1 directly and reversibly inhibits the initial cell divisions of long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood*. 1996;88:82-88.
188. Hatzfeld J, Li ML, Brown EL, et al. Release of early human hematopoietic progenitors from quiescence by antisense transforming growth factor beta 1 or Rb oligonucleotides. *J Exp Med*. 1991;174:925-929.
189. Soma T, Yu JM, Dunbar CE. Maintenance of murine long-term repopulating stem cells in ex vivo culture is affected by modulation of transforming growth factor-beta but not macrophage inflammatory protein-1 alpha activities. *Blood*. 1996;87:4561-4567.
190. Dubois CM, Ruscetti FW, Palaszynski EW, Falk LA, Oppenheim JJ, Keller JR. Transforming growth factor beta is a potent inhibitor of interleukin 1 (IL-1) receptor expression: proposed mechanism of inhibition of IL-1 action. *J Exp Med*. 1990;172:737-744.
191. Dubois CM, Ruscetti FW, Stankova J, Keller JR. Transforming growth factor-beta regulates c-kit message stability and cell-surface protein expression in hematopoietic progenitors. *Blood*. 1994;83:3138-3145.
192. Dao MA, Taylor N, Nolte JA. Reduction in levels of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(kip-1) coupled with transforming growth factor beta neutralization induces cell-cycle entry and increases retroviral transduction of primitive human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:13006-13011.
193. Ducos K, Panterne B, Fortunel N, Hatzfeld A, Monier MN, Hatzfeld J. p21(cip1) mRNA is controlled by endogenous transforming growth factor-beta1 in quiescent human hematopoietic stem/progenitor cells. *J Cell Physiol*. 2000;184:80-85.
194. He W, Dorn DC, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Moore MA, Massague J. Hematopoiesis controlled by distinct TIF1gamma and Smad4 branches of the TGFbeta pathway. *Cell*. 2006;125:929-941.
195. Basu S, Broxmeyer HE. Transforming growth factor-{beta}1 modulates responses of CD34+ cord blood cells to stromal cell-derived factor-1/CXCL12. *Blood*. 2005;106:485-493.
196. Larsson J, Blank U, Helgadóttir H, et al. TGF-beta signaling-deficient hematopoietic stem cells have normal self-renewal and regenerative ability in vivo despite increased proliferative capacity in vitro. *Blood*. 2003;102:3129-3135.
197. Larsson J, Blank U, Klintman J, Magnusson M, Karlsson S. Quiescence of hematopoietic stem cells and maintenance of the stem cell pool is not dependent on TGF-beta signaling in vivo. *Exp Hematol*. 2005;33:592-596.

198. Letterio JJ, Geiser AG, Kulkarni AB, et al. Autoimmunity associated with TGF-beta1-deficiency in mice is dependent on MHC class II antigen expression. *J Clin Invest.* 1996;98:2109-2119.
199. Bhatia M, Bonnet D, Wu D, et al. Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 1999;189:1139-1148.
200. Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, et al. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol.* 2001;2:172-180.
201. Hutton JF, Rozenkov V, Khor FS, D'Andrea RJ, Lewis ID. Bone morphogenetic protein 4 contributes to the maintenance of primitive cord blood hematopoietic progenitors in an ex vivo stroma-noncontact co-culture system. *Stem Cells Dev.* 2006;15:805-813.
202. Goldman DC, Bailey AS, Pfaffle DL, Al Masri A, Christian JL, Fleming WH. BMP4 regulates the hematopoietic stem cell niche. *Blood.* 2009;114:4393-4401.
203. Chadwick K, Shojaei F, Gallacher L, Bhatia M. Smad7 alters cell fate decisions of human hematopoietic repopulating cells. *Blood.* 2005;105:1905-1915.
204. Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell.* 2004;118:149-161.
205. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell.* 1996;87:1161-1169.
206. Gomei Y, Nakamura Y, Yoshihara H, et al. Functional differences between two Tie2 ligands, angiopoietin-1 and -2, in regulation of adult bone marrow hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*;38:82-89.
207. Hosokawa K, Arai F, Yoshihara H, et al. Knockdown of N-cadherin suppresses the long-term engraftment of hematopoietic stem cells. *Blood*;116:554-563.
208. Wilson A, Murphy MJ, Oskarsson T, et al. c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev.* 2004;18:2747-2763.
209. Nakamura Y, Yahata T, Muguruma Y, et al. Angiopoietin-1 supports induction of hematopoietic activity in human CD34- bone marrow cells. *Exp Hematol.* 2007;35:1872-1883.
210. Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell.* 2007;1:685-697.
211. Uhmman A, Dittmann K, Nitzki F, et al. The Hedgehog receptor Patched controls lymphoid lineage commitment. *Blood.* 2007;110:1814-1823.
212. Trowbridge JJ, Scott MP, Bhatia M. Hedgehog modulates cell cycle regulators in stem cells to control hematopoietic regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:14134-14139.
213. Cobas M, Wilson A, Ernst B, et al. Beta-catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis. *J Exp Med.* 2004;199:221-229.
214. Kim JA, Kang YJ, Park G, et al. Identification of a stroma-mediated Wnt/beta-catenin signal promoting self-renewal of hematopoietic stem cells in the stem cell niche. *Stem Cells.* 2009;27:1318-1329.
215. Duncan AW, Rattis FM, DiMascio LN, et al. Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol.* 2005;6:314-322.
216. Nemeth MJ, Mak KK, Yang Y, Bodine DM. beta-Catenin expression in the bone marrow microenvironment is required for long-term maintenance of primitive hematopoietic cells. *Stem Cells.* 2009;27:1109-1119.
217. Nemeth MJ, Bodine DM. Regulation of hematopoiesis and the hematopoietic stem cell niche by Wnt signaling pathways. *Cell Res.* 2007;17:746-758.
218. Chiba S. Notch signaling in stem cell systems. *Stem Cells.* 2006;24:2437-2447.

219. Suzuki T, Yokoyama Y, Kumano K, et al. Highly efficient ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells using Delta1-Fc chimeric protein. *Stem Cells*. 2006;24:2456-2465.
220. de Haan G, Weersing E, Dontje B, et al. In vitro generation of long-term repopulating hematopoietic stem cells by fibroblast growth factor-1. *Dev Cell*. 2003;4:241-251.
221. Yeoh JS, van Os R, Weersing E, et al. Fibroblast growth factor-1 and -2 preserve long-term repopulating ability of hematopoietic stem cells in serum-free cultures. *Stem Cells*. 2006;24:1564-1572.
222. Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, Rafii S. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda)*. 2005;20:349-356.
223. To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood*. 1997;89:2233-2258.
224. Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Williams B, Winkler IG, Simmons PJ. Mobilization by either cyclophosphamide or granulocyte colony-stimulating factor transforms the bone marrow into a highly proteolytic environment. *Exp Hematol*. 2002;30:440-449.
225. Levesque JP, Liu F, Simmons PJ, et al. Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice. *Blood*. 2004;104:65-72.
226. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood*. 2005;106:1901-1910.
227. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:93-106.
228. Ben-Shoshan J, Schwartz S, Luboshits G, et al. Constitutive expression of HIF-1alpha and HIF-2alpha in bone marrow stromal cells differentially promotes their proangiogenic properties. *Stem Cells*. 2008;26:2634-2643.
229. Fang HY, Hughes R, Murdoch C, et al. Hypoxia-inducible factors 1 and 2 are important transcriptional effectors in primary macrophages experiencing hypoxia. *Blood*. 2009;114:844-859.
230. Liu YL, Yu JM, Song XR, Wang XW, Xing LG, Gao BB. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 and metastasis by hypoxia-inducible factor in non small cell lung cancer cell lines. *Cancer Biol Ther*. 2006;5:1320-1326.
231. Cottler-Fox MH, Lapidot T, Petit I, et al. Stem cell mobilization. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003:419-437.
232. Hattori K, Heissig B, Tashiro K, et al. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*. 2001;97:3354-3360.
233. Kahn J, Byk T, Jansson-Sjostrand L, et al. Overexpression of CXCR4 on human CD34+ progenitors increases their proliferation, migration, and NOD/SCID repopulation. *Blood*. 2004;103:2942-2949.
234. Lapidot T, Kollet O. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia*. 2002;16:1992-2003.
235. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006;25:977-988.
236. Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:5431-5436.
237. Levesque JP, Winkler IG, Hendy J, et al. Hematopoietic progenitor cell mobilization results in hypoxia with increased hypoxia-inducible transcription factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor A in bone marrow. *Stem Cells*. 2007;25:1954-1965.

238. Kubota Y, Takubo K, Suda T. Bone marrow long label-retaining cells reside in the sinusoidal hypoxic niche. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;366:335-339.
239. Ito K, Hirao A, Arai F, et al. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med.* 2006;12:446-451.
240. Haddad JJ, Olver RE, Land SC. Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIF-1alpha and NF-kappa B redox sensitivity. Evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem.* 2000;275:21130-21139.
241. Chen H, Shi H. A reducing environment stabilizes HIF-2alpha in SH-SY5Y cells under hypoxic conditions. *FEBS Lett.* 2008;582:3899-3902.
242. Arai F, Suda T. Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1106:41-53.
243. Cipolleschi MG, Dello Sbarba P, Olivotto M. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood.* 1993;82:2031-2037.
244. Wild JM, Fichele S, Woodhouse N, Paley MN, Kasuboski L, van Beek EJ. 3D volume-localized pO₂ measurement in the human lung with ³He MRI. *Magn Reson Med.* 2005;53:1055-1064.
245. Johnson PC, Vandegriff K, Tsai AG, Intaglietta M. Effect of acute hypoxia on microcirculatory and tissue oxygen levels in rat cremaster muscle. *J Appl Physiol.* 2005;98:1177-1184.
246. McKinley BA, Butler BD. Comparison of skeletal muscle PO₂, PCO₂, and pH with gastric tonometric P(CO₂) and pH in hemorrhagic shock. *Crit Care Med.* 1999;27:1869-1877.
247. Saltzman DJ, Toth A, Tsai AG, Intaglietta M, Johnson PC. Oxygen tension distribution in postcapillary venules in resting skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H1980-1985.
248. Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J.* 2001;81:685-696.
249. Tondevold E, Eriksen J, Jansen E. Observations on long bone medullary pressure in relation to mean arterial blood pressure in the anaesthetized dog. *Acta Orthop Scand.* 1979;50:527-531.
250. Hemphill JC, 3rd, Smith WS, Sonne DC, Morabito D, Manley GT. Relationship between brain tissue oxygen tension and CT perfusion: feasibility and initial results. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2005;26:1095-1100.
251. Braun RD, Lanzen JL, Snyder SA, Dewhirst MW. Comparison of tumor and normal tissue oxygen tension measurements using OxyLite or microelectrodes in rodents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:H2533-2544.
252. Mik EG, van Leeuwen TG, Raat NJ, Ince C. Quantitative determination of localized tissue oxygen concentration in vivo by two-photon excitation phosphorescence lifetime measurements. *J Appl Physiol.* 2004;97:1962-1969.
253. O'Connor PM, Anderson WP, Kett MM, Evans RG. Simultaneous measurement of pO₂ and perfusion in the rabbit kidney in vivo. *Adv Exp Med Biol.* 2007;599:93-99.
254. Buerk DG, Shonat RD, Riva CE, Cranstoun SD. O₂ gradients and countercurrent exchange in the cat vitreous humor near retinal arterioles and venules. *Microvasc Res.* 1993;45:134-148.
255. Yu DY, Cringle SJ. Retinal degeneration and local oxygen metabolism. *Exp Eye Res.* 2005;80:745-751.
256. Roy S, Khanna S, Bickerstaff AA, et al. Oxygen sensing by primary cardiac fibroblasts: a key role of p21(Waf1/Cip1/Sdi1). *Circ Res.* 2003;92:264-271.
257. Jungermann K, Kietzmann T. Role of oxygen in the zonation of carbohydrate metabolism and gene expression in liver. *Kidney Int.* 1997;51:402-412.

258. Cipolleschi MG, Rovida E, Ivanovic Z, Praloran V, Olivotto M, Dello Sbarba P. The expansion of murine bone marrow cells preincubated in hypoxia as an in vitro indicator of their marrow-repopulating ability. *Leukemia*. 2000;14:735-739.
259. Ivanovic Z, Bartolozzi B, Bernabei PA, et al. Incubation of murine bone marrow cells in hypoxia ensures the maintenance of marrow-repopulating ability together with the expansion of committed progenitors. *Br J Haematol*. 2000;108:424-429.
260. Ivanovic Z, Belloc F, Faucher JL, Cipolleschi MG, Praloran V, Dello Sbarba P. Hypoxia maintains and interleukin-3 reduces the pre-colony-forming cell potential of dividing CD34(+) murine bone marrow cells. *Exp Hematol*. 2002;30:67-73.
261. Harrison JS, Rameshwar P, Chang V, Bandari P. Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. *Blood*. 2002;99:394.
262. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med*. 2001;7:345-350.
263. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med*. 2002;8:S62-67.
264. Maltepe E, Simon MC. Oxygen, genes, and development: an analysis of the role of hypoxic gene regulation during murine vascular development. *J Mol Med*. 1998;76:391-401.
265. Morriss GM, New DA. Effect of oxygen concentration on morphogenesis of cranial neural folds and neural crest in cultured rat embryos. *J Embryol Exp Morphol*. 1979;54:17-35.
266. Zagorska A, Dulak J. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochim Pol*. 2004;51:563-585.
267. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:5510-5514.
268. Makino Y, Cao R, Svensson K, et al. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*. 2001;414:550-554.
269. Maynard MA, Evans AJ, Shi W, Kim WY, Liu FF, Ohh M. Dominant-negative HIF-3 alpha 4 suppresses VHL-null renal cell carcinoma progression. *Cell Cycle*. 2007;6:2810-2816.
270. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*. 1996;16:4604-4613.
271. Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:4304-4308.
272. Wang GL, Semenza GL. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood*. 1993;82:3610-3615.
273. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*;29:625-634.
274. Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev*. 1997;11:72-82.
275. Saito T, Fukai A, Mabuchi A, et al. Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2alpha during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat Med*;16:678-686.
276. Tamiya H, Ikeda T, Jeong JH, et al. Analysis of the Runx2 promoter in osseous and non-osseous cells and identification of HIF2A as a potent transcription activator. *Gene*. 2008;416:53-60.
277. Srinivas V, Bohensky J, Zahm AM, Shapiro IM. Autophagy in mineralizing tissues: microenvironmental perspectives. *Cell Cycle*. 2009;8:391-393.
278. Mole DR, Blancher C, Copley RR, et al. Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem*. 2009;284:16767-16775.

279. Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Lofstedt T, et al. Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell*. 2006;10:413-423.
280. Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. *Mol Cells*;29:435-442.
281. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, et al. Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev*. 1998;12:149-162.
282. Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J*. 1998;17:3005-3015.
283. Scortegagna M, Ding K, Oktay Y, et al. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*^{-/-} mice. *Nat Genet*. 2003;35:331-340.
284. Covello KL, Simon MC, Keith B. Targeted replacement of hypoxia-inducible factor-1alpha by a hypoxia-inducible factor-2alpha knock-in allele promotes tumor growth. *Cancer Res*. 2005;65:2277-2286.
285. Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:4273-4278.
286. Flamme I, Frohlich T, von Reutern M, Kappel A, Damert A, Risau W. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev*. 1997;63:51-60.
287. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol*. 2003;23:9361-9374.
288. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev*. 2002;16:1466-1471.
289. Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev*. 2001;15:2675-2686.
290. Koivunen P, Hirsila M, Gunzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J. Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J Biol Chem*. 2004;279:9899-9904.
291. Park SK, Dadak AM, Haase VH, Fontana L, Giaccia AJ, Johnson RS. Hypoxia-induced gene expression occurs solely through the action of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha): role of cytoplasmic trapping of HIF-2alpha. *Mol Cell Biol*. 2003;23:4959-4971.
292. Hu CJ, Sataur A, Wang L, Chen H, Simon MC. The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha. *Mol Biol Cell*. 2007;18:4528-4542.
293. Raval RR, Lau KW, Tran MG, et al. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol*. 2005;25:5675-5686.
294. Covello KL, Kehler J, Yu H, et al. HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev*. 2006;20:557-570.
295. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, et al. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*. 2001;107:43-54.
296. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. 2001;294:1337-1340.

297. Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, et al. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*. 2004;279:38458-38465.
298. Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *Embo J*. 2003;22:4082-4090.
299. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999;399:271-275.
300. Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem*. 1996;271:32253-32259.
301. Uchida T, Rossignol F, Matthay MA, et al. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. *J Biol Chem*. 2004;279:14871-14878.
302. Luo W, Zhong J, Chang R, Hu H, Pandey A, Semenza GL. Hsp70 and CHIP selectively mediate ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha but Not HIF-2alpha. *J Biol Chem*;285:3651-3663.
303. Katschinski DM, Le L, Schindler SG, Thomas T, Voss AK, Wenger RH. Interaction of the PAS B domain with HSP90 accelerates hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization. *Cell Physiol Biochem*. 2004;14:351-360.
304. Liu YV, Baek JH, Zhang H, Diez R, Cole RN, Semenza GL. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. *Mol Cell*. 2007;25:207-217.
305. Koh MY, Darnay BG, Powis G. Hypoxia-associated factor, a novel E3-ubiquitin ligase, binds and ubiquitinates hypoxia-inducible factor 1alpha, leading to its oxygen-independent degradation. *Mol Cell Biol*. 2008;28:7081-7095.
306. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, et al. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell*. 2002;111:709-720.
307. Withington SL, Scott AN, Saunders DN, et al. Loss of Cited2 affects trophoblast formation and vascularization of the mouse placenta. *Dev Biol*. 2006;294:67-82.
308. Zimmer M, Ebert BL, Neil C, et al. Small-molecule inhibitors of HIF-2a translation link its 5'UTR iron-responsive element to oxygen sensing. *Mol Cell*. 2008;32:838-848.
309. Chen L, Endler A, Shibasaki F. Hypoxia and angiogenesis: regulation of hypoxia-inducible factors via novel binding factors. *Exp Mol Med*. 2009;41:849-857.
310. Chen L, Uchida K, Endler A, Shibasaki F. Mammalian tumor suppressor Int6 specifically targets hypoxia inducible factor 2 alpha for degradation by hypoxia- and pVHL-independent regulation. *J Biol Chem*. 2007;282:12707-12716.
311. Chen L, Endler A, Uchida K, et al. Int6/eIF3e silencing promotes functional blood vessel outgrowth and enhances wound healing by upregulating hypoxia-induced factor 2alpha expression. *Circulation*;122:910-919.
312. Gradin K, Takasaki C, Fujii-Kuriyama Y, Sogawa K. The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *J Biol Chem*. 2002;277:23508-23514.
313. Lancaster DE, McNeill LA, McDonough MA, et al. Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. *Biochem J*. 2004;383:429-437.
314. Berra E, Milanini J, Richard DE, et al. Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochem Pharmacol*. 2000;60:1171-1178.

315. Conrad PW, Freeman TL, Beitner-Johnson D, Millhorn DE. EPAS1 trans-activation during hypoxia requires p42/p44 MAPK. *J Biol Chem.* 1999;274:33709-33713.
316. Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem.* 1999;274:32631-32637.
317. Sang N, Stiehl DP, Bohensky J, Leshchinsky I, Srinivas V, Caro J. MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J Biol Chem.* 2003;278:14013-14019.
318. Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, et al. Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem.* 2006;281:33095-33106.
319. Bae SH, Jeong JW, Park JA, et al. Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;324:394-400.
320. Carbia-Nagashima A, Gerez J, Perez-Castro C, et al. RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1alpha during hypoxia. *Cell.* 2007;131:309-323.
321. Berta MA, Mazure N, Hattab M, Pouyssegur J, Brahimi-Horn MC. SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1alpha reduces its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;360:646-652.
322. Cheng J, Kang X, Zhang S, Yeh ET. SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia. *Cell.* 2007;131:584-595.
323. van Hagen M, Overmeer RM, Abolvardi SS, Vertegaal AC. RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2alpha. *Nucleic Acids Res;*38:1922-1931.
324. Li F, Sonveaux P, Rabbani ZN, et al. Regulation of HIF-1alpha stability through S-nitrosylation. *Mol Cell.* 2007;26:63-74.
325. Yasinska IM, Sumbayev VV. S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1alpha protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett.* 2003;549:105-109.
326. Toschi A, Edelstein J, Rockwell P, Ohh M, Foster DA. HIF alpha expression in VHL-deficient renal cancer cells is dependent on phospholipase D. *Oncogene.* 2008;27:2746-2753.
327. Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, Flanigan A, Chen J. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science.* 2001;294:1942-1945.
328. Land SC, Tee AR. Hypoxia-inducible factor 1alpha is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *J Biol Chem.* 2007;282:20534-20543.
329. Toschi A, Lee E, Gadir N, Ohh M, Foster DA. Differential dependence of hypoxia-inducible factors 1 alpha and 2 alpha on mTORC1 and mTORC2. *J Biol Chem.* 2008;283:34495-34499.
330. Kondo K, Kim WY, Lechpammer M, Kaelin WG, Jr. Inhibition of HIF2alpha is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth. *PLoS Biol.* 2003;1:E83.
331. Toschi A, Lee E, Thompson S, et al. Phospholipase D-mTOR requirement for the Warburg effect in human cancer cells. *Cancer Lett.*
332. Nakayama K, Qi J, Ronai Z. The ubiquitin ligase Siah2 and the hypoxia response. *Mol Cancer Res.* 2009;7:443-451.
333. Kulisz A, Chen N, Chandel NS, Shao Z, Schumacker PT. Mitochondrial ROS initiate phosphorylation of p38 MAP kinase during hypoxia in cardiomyocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;282:L1324-1329.

334. Gradin K, McGuire J, Wenger RH, et al. Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Mol Cell Biol.* 1996;16:5221-5231.
335. Neckers L, Ivy SP. Heat shock protein 90. *Curr Opin Oncol.* 2003;15:419-424.
336. Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, Martinez A, Cuttitta F, Neckers LM. Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway. *J Biol Chem.* 2002;277:29936-29944.
337. Mabeesh NJ, Post DE, Willard MT, et al. Geldanamycin induces degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha protein via the proteasome pathway in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2002;62:2478-2482.
338. Kato H, Tamamizu-Kato S, Shibasaki F. Histone deacetylase 7 associates with hypoxia-inducible factor 1alpha and increases transcriptional activity. *J Biol Chem.* 2004;279:41966-41974.
339. Jung JE, Lee HG, Cho IH, et al. STAT3 is a potential modulator of HIF-1-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. *Faseb J.* 2005;19:1296-1298.
340. Jung JE, Kim HS, Lee CS, et al. STAT3 inhibits the degradation of HIF-1alpha by pVHL-mediated ubiquitination. *Exp Mol Med.* 2008;40:479-485.
341. Liu YV, Hubbi ME, Pan F, et al. Calcineurin promotes hypoxia-inducible factor 1alpha expression by dephosphorylating RACK1 and blocking RACK1 dimerization. *J Biol Chem.* 2007;282:37064-37073.
342. Dioum EM, Chen R, Alexander MS, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 2alpha signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1. *Science.* 2009;324:1289-1293.
343. Scortegagna M, Ding K, Zhang Q, et al. HIF-2alpha regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner. *Blood.* 2005;105:3133-3140.
344. Lim JH, Lee YM, Chun YS, Chen J, Kim JE, Park JW. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell.* 2005;18:864-878.
345. Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, O'Brien S, Tanaka H, Poellinger L. Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol.* 2000;20:402-415.
346. Ruas JL, Poellinger L, Pereira T. Role of CBP in regulating HIF-1-mediated activation of transcription. *J Cell Sci.* 2005;118:301-311.
347. Ziel KA, Campbell CC, Wilson GL, Gillespie MN. Ref-1/Ape is critical for formation of the hypoxia-inducible transcriptional complex on the hypoxic response element of the rat pulmonary artery endothelial cell VEGF gene. *Faseb J.* 2004;18:986-988.
348. Ziel KA, Grishko V, Campbell CC, Breit JF, Wilson GL, Gillespie MN. Oxidants in signal transduction: impact on DNA integrity and gene expression. *Faseb J.* 2005;19:387-394.
349. Wang F, Zhang R, Wu X, Hankinson O. Roles of coactivators in hypoxic induction of the erythropoietin gene. *PLoS One.* 2005;5:e10002.
350. Gray MJ, Zhang J, Ellis LM, et al. HIF-1alpha, STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas. *Oncogene.* 2005;24:3110-3120.
351. Sanchez-Elsner T, Ramirez JR, Sanz-Rodriguez F, Varela E, Bernabeu C, Botella LM. A cross-talk between hypoxia and TGF-beta orchestrates erythropoietin gene regulation through SP1 and Smads. *J Mol Biol.* 2004;336:9-24.
352. Koshiji M, To KK, Hammer S, et al. HIF-1alpha induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutSalpha expression. *Mol Cell.* 2005;17:793-803.
353. Bracken CP, Whitelaw ML, Peet DJ. Activity of hypoxia-inducible factor 2alpha is regulated by association with the NF-kappaB essential modulator. *J Biol Chem.* 2005;280:14240-14251.

354. Elvert G, Kappel A, Heidenreich R, et al. Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J Biol Chem*. 2003;278:7520-7530.
355. Koshiji M, Kageyama Y, Pete EA, Horikawa I, Barrett JC, Huang LE. HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *Embo J*. 2004;23:1949-1956.
356. Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA, Simon MC. HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell*. 2007;11:335-347.
357. To KK, Sedelnikova OA, Samons M, Bonner WM, Huang LE. The phosphorylation status of PAS-B distinguishes HIF-1alpha from HIF-2alpha in NBS1 repression. *Embo J*. 2006;25:4784-4794.
358. Pedersen M, Lofstedt T, Sun J, Holmquist-Mengelbier L, Pahlman S, Ronnstrand L. Stem cell factor induces HIF-1alpha at normoxia in hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;377:98-103.
359. Yoshida K, Kirito K, Yongzhen H, Ozawa K, Kaushansky K, Komatsu N. Thrombopoietin (TPO) regulates HIF-1alpha levels through generation of mitochondrial reactive oxygen species. *Int J Hematol*. 2008;88:43-51.
360. Qing G, Simon MC. Hypoxia inducible factor-2alpha: a critical mediator of aggressive tumor phenotypes. *Curr Opin Genet Dev*. 2009;19:60-66.
361. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407:249-257.
362. Gruber M, Simon MC. Hypoxia-inducible factors, hypoxia, and tumor angiogenesis. *Curr Opin Hematol*. 2006;13:169-174.
363. Hickey MM, Simon MC. Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors. *Curr Top Dev Biol*. 2006;76:217-257.
364. Bindra RS, Vasselli JR, Stearman R, Linehan WM, Klausner RD. VHL-mediated hypoxia regulation of cyclin D1 in renal carcinoma cells. *Cancer Res*. 2002;62:3014-3019.
365. Franovic A, Gunaratnam L, Smith K, Robert I, Patten D, Lee S. Translational up-regulation of the EGFR by tumor hypoxia provides a nonmutational explanation for its overexpression in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:13092-13097.
366. Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, et al. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol*. 2009;29:2570-2581.
367. Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res*. 1999;59:3915-3918.
368. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:721-732.
369. Zhang H, Gao P, Fukuda R, et al. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell*. 2007;11:407-420.
370. Parks SK, Chiche J, Pouyssegur J. pH control mechanisms of tumor survival and growth. *J Cell Physiol*.
371. Bertout JA, Majmundar AJ, Gordan JD, et al. HIF2alpha inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:14391-14396.
372. Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, et al. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*. 2006;440:1222-1226.
373. Krishnamachary B, Zagzag D, Nagasawa H, et al. Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFH1A, and ZFH1B. *Cancer Res*. 2006;66:2725-2731.

374. Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, Poellinger L, Lendahl U. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:6392-6397.
375. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, et al. Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nat Cell Biol*. 2008;10:295-305.
376. Gort EH, van Haaften G, Verlaan I, et al. The TWIST1 oncogene is a direct target of hypoxia-inducible factor-2 α . *Oncogene*. 2008;27:1501-1510.
377. Yang MH, Wu KJ. TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF-1): implications in metastasis and development. *Cell Cycle*. 2008;7:2090-2096.
378. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414:105-111.
379. Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, et al. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell*. 2005;9:617-628.
380. Holmquist L, Lofstedt T, Pahlman S. Effect of hypoxia on the tumor phenotype: the neuroblastoma and breast cancer models. *Adv Exp Med Biol*. 2006;587:179-193.
381. Mazumdar J, Dondeti V, Simon MC. Hypoxia-inducible factors in stem cells and cancer. *J Cell Mol Med*. 2009;13:4319-4328.
382. Pietras A, Hansford LM, Johnsson AS, et al. HIF-2 α maintains an undifferentiated state in neural crest-like human neuroblastoma tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:16805-16810.
383. Hickey MM, Richardson T, Wang T, et al. The von Hippel-Lindau Chuvash mutation promotes pulmonary hypertension and fibrosis in mice. *J Clin Invest*;120:827-839.
384. Gruber M, Hu CJ, Johnson RS, Brown EJ, Keith B, Simon MC. Acute postnatal ablation of Hif-2 α results in anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:2301-2306.
385. Furlow PW, Percy MJ, Sutherland S, et al. Erythrocytosis-associated Hif-2 α mutations demonstrate a critical role for residues C-terminal to the hydroxylacceptor proline. *J Biol Chem*. 2009.
386. Percy MJ, Furlow PW, Lucas GS, et al. A gain-of-function mutation in the HIF2A gene in familial erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2008;358:162-168.
387. van Wijk R, Sutherland S, Van Wesel AC, et al. Erythrocytosis associated with a novel missense mutation in the HIF2A gene. *Haematologica*;95:829-832.
388. Li Z, Bao S, Wu Q, et al. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell*. 2009;15:501-513.
389. Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, Quinones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*;7:150-161.
390. Danet GH, Pan Y, Luongo JL, Bonnet DA, Simon MC. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *J Clin Invest*. 2003;112:126-135.
391. Shima H, Takubo K, Iwasaki H, et al. Reconstitution activity of hypoxic cultured human cord blood CD34-positive cells in NOG mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;378:467-472.
392. Hermitte F, Brunet de la Grange P, Belloc F, Praloran V, Ivanovic Z. Very low O₂ concentration (0.1%) favors G₀ return of dividing CD34⁺ cells. *Stem Cells*. 2006;24:65-73.
393. Mazumdar J, O'Brien WT, Johnson RS, et al. O₂ regulates stem cells through Wnt/ β -catenin signalling. *Nat Cell Biol*.
394. Kaidi A, Williams AC, Paraskeva C. Interaction between β -catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia. *Nat Cell Biol*. 2007;9:210-217.
395. Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2009;5:237-241.

396. Forristal CE, Wright KL, Hanley NA, Oreffo RO, Houghton FD. Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reproduction*;139:85-97.
397. Moreno-Manzano V, Rodriguez-Jimenez FJ, Acena-Bonilla JL, et al. FM19G11, a new hypoxia-inducible factor (HIF) modulator, affects stem cell differentiation status. *J Biol Chem*;285:1333-1342.
398. Takubo K, Goda N, Yamada W, et al. Regulation of the HIF-1alpha Level Is Essential for Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell*;7:391-402.
399. Hisa T, Spence SE, Rachel RA, et al. Hematopoietic, angiogenic and eye defects in *Meis1* mutant animals. *Embo J*. 2004;23:450-459.
400. Bakker WJ, Harris IS, Mak TW. FOXO3a is activated in response to hypoxic stress and inhibits HIF1-induced apoptosis via regulation of CITED2. *Mol Cell*. 2007;28:941-953.
401. Hu CJ, Iyer S, Sataur A, Covello KL, Chodosh LA, Simon MC. Differential regulation of the transcriptional activities of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in stem cells. *Mol Cell Biol*. 2006;26:3514-3526.
402. Chavez JC, Baranova O, Lin J, Pichiule P. The transcriptional activator hypoxia inducible factor 2 (HIF-2/EPAS-1) regulates the oxygen-dependent expression of erythropoietin in cortical astrocytes. *J Neurosci*. 2006;26:9471-9481.
403. Eliasson P, Jonsson JI. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J Cell Physiol*;222:17-22.
404. Duan LJ, Zhang-Benoit Y, Fong GH. Endothelium-intrinsic requirement for Hif-2alpha during vascular development. *Circulation*. 2005;111:2227-2232.
405. Skuli N, Liu L, Runge A, et al. Endothelial deletion of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) alters vascular function and tumor angiogenesis. *Blood*. 2009;114:469-477.
406. Schreiber TD, Steidl C, Essl M, et al. The integrin alpha9beta1 on hematopoietic stem and progenitor cells: involvement in cell adhesion, proliferation and differentiation. *Haematologica*. 2009;94:1493-1501.
407. Manisterski M, Golan M, Amir S, Weisman Y, Mabeesh NJ. Hypoxia induces PTHrP gene transcription in human cancer cells through the HIF-2alpha. *Cell Cycle*;9.
408. Eliasson P, Rehn M, Hammar P, et al. 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 e302.
409. Hackenbeck T, Knaup KX, Schietke R, et al. HIF-1 or HIF-2 induction is sufficient to achieve cell cycle arrest in NIH3T3 mouse fibroblasts independent from hypoxia. *Cell Cycle*. 2009;8:1386-1395.
410. Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, et al. The stem cell marker *Bcrp/ABCG2* enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem*. 2004;279:24218-24225.
411. Martin CM, Ferdous A, Gallardo T, et al. Hypoxia-inducible factor-2alpha transactivates *Abcg2* and promotes cytoprotection in cardiac side population cells. *Circ Res*. 2008;102:1075-1081.
412. Oktay Y, Dioum E, Matsuzaki S, et al. Hypoxia-inducible factor 2alpha regulates expression of the mitochondrial aconitase chaperone protein frataxin. *J Biol Chem*. 2007;282:11750-11756.
413. Tormos KV, Chandel NS. Inter-connection between mitochondria and HIFs. *J Cell Mol Med*.
414. Adelman DM, Maltepe E, Simon MC. Multilineage embryonic hematopoiesis requires hypoxic ARNT activity. *Genes Dev*. 1999;13:2478-2483.

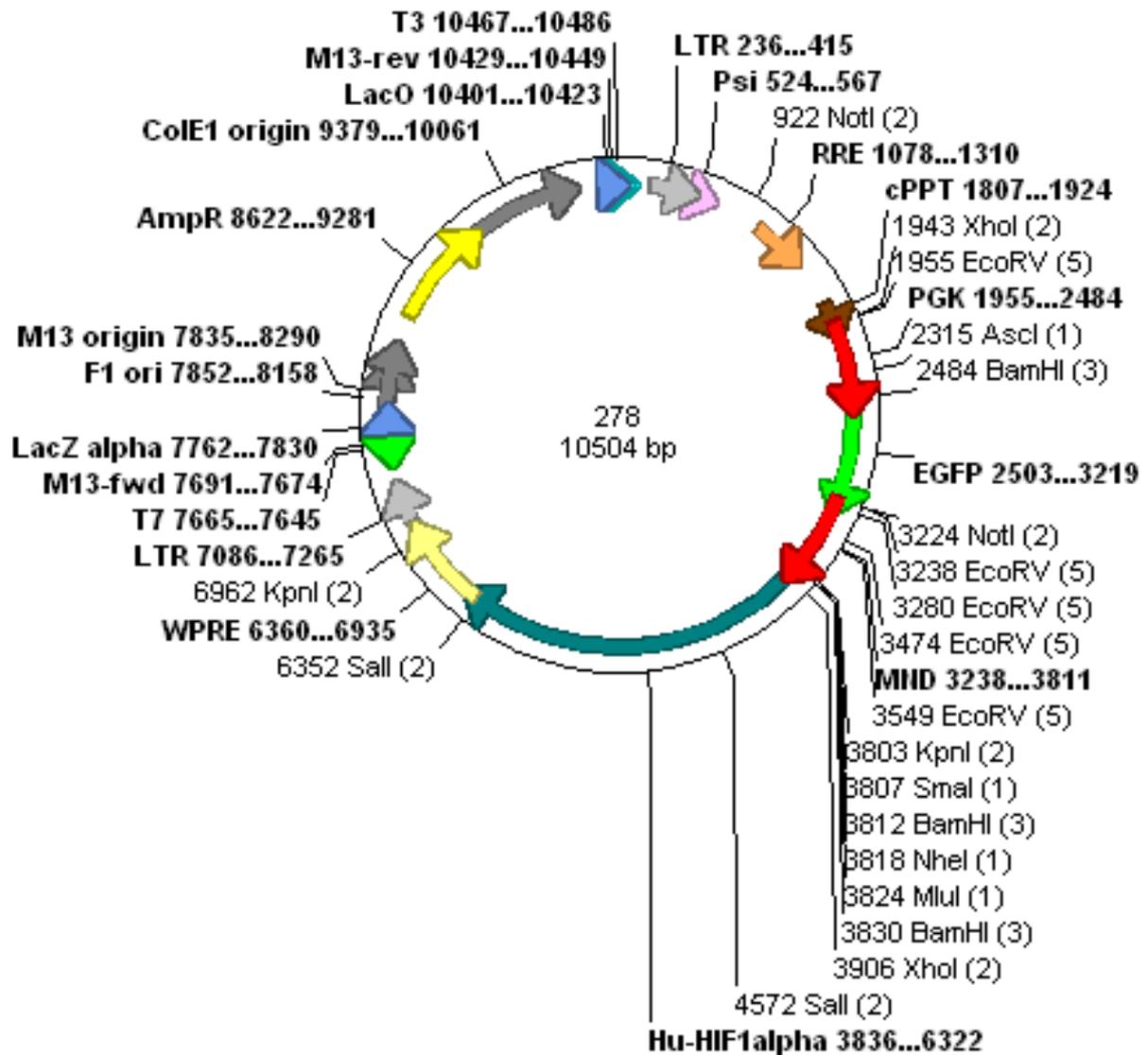
415. Scortegagna M, Morris MA, Oktay Y, Bennett M, Garcia JA. The HIF family member EPAS1/HIF-2alpha is required for normal hematopoiesis in mice. *Blood*. 2003;102:1634-1640.
416. Kietzmann T, Gorlach A. Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Semin Cell Dev Biol*. 2005;16:474-486.
417. Metzen E, Ratcliffe PJ. HIF hydroxylation and cellular oxygen sensing. *Biol Chem*. 2004;385:223-230.
418. Jiang H, Guo R, Powell-Coffman JA. The *Caenorhabditis elegans* hif-1 gene encodes a bHLH-PAS protein that is required for adaptation to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:7916-7921.
419. Shen RJ, Jiang XY, Pu JW, Zou SM. HIF-1alpha and -2alpha genes in a hypoxia-sensitive teleost species *Megalobrama amblycephala*: cDNA cloning, expression and different responses to hypoxia. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*;157:273-280.
420. Piccoli C, D'Aprile A, Ripoli M, et al. The hypoxia-inducible factor is stabilized in circulating hematopoietic stem cells under normoxic conditions. *FEBS Lett*. 2007;581:3111-3119.
421. Furlow PW, Percy MJ, Sutherland S, et al. Erythrocytosis-associated HIF-2alpha mutations demonstrate a critical role for residues C-terminal to the hydroxylacceptor proline. *J Biol Chem*. 2009;284:9050-9058.
422. Ladroue C, Carcenac R, Leporrier M, et al. PHD2 mutation and congenital erythrocytosis with paraganglioma. *N Engl J Med*. 2008;359:2685-2692.
423. Martini M, Teofili L, Cenci T, et al. A novel heterozygous HIF2AM535I mutation reinforces the role of oxygen sensing pathway disturbances in the pathogenesis of familial erythrocytosis. *Haematologica*. 2008;93:1068-1071.
424. Percy MJ, Zhao Q, Flores A, et al. A family with erythrocytosis establishes a role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:654-659.
425. Semenza GL. Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis. *Blood*. 2009;114:2015-2019.
426. Ang SO, Chen H, Hirota K, et al. Disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia. *Nat Genet*. 2002;32:614-621.
427. Hickey MM, Lam JC, Bezman NA, Rathmell WK, Simon MC. von Hippel-Lindau mutation in mice recapitulates Chuvash polycythemia via hypoxia-inducible factor-2alpha signaling and splenic erythropoiesis. *J Clin Invest*. 2007;117:3879-3889.
428. Yoon D, Pastore YD, Divoky V, et al. Hypoxia-inducible factor-1 deficiency results in dysregulated erythropoiesis signaling and iron homeostasis in mouse development. *J Biol Chem*. 2006;281:25703-25711.
429. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*. 2004;10:858-864.
430. Du R, Lu KV, Petritsch C, et al. HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell*. 2008;13:206-220.
431. Helbig G, Christopherson KW, 2nd, Bhat-Nakshatri P, et al. NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem*. 2003;278:21631-21638.
432. Schioppa T, Uranchimeg B, Saccani A, et al. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med*. 2003;198:1391-1402.
433. Kirito K, Fox N, Komatsu N, Kaushansky K. Thrombopoietin enhances expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in primitive hematopoietic cells through induction of HIF-1alpha. *Blood*. 2005;105:4258-4263.

434. Guenechea G, Gan OI, Inamitsu T, et al. Transduction of human CD34+ CD38- bone marrow and cord blood-derived SCID-repopulating cells with third-generation lentiviral vectors. *Mol Ther*. 2000;1:566-573.
435. Mazurier F, Gan OI, McKenzie JL, Doedens M, Dick JE. Lentivector-mediated clonal tracking reveals intrinsic heterogeneity in the human hematopoietic stem cell compartment and culture-induced stem cell impairment. *Blood*. 2004;103:545-552.
436. Kiel MJ, Morrison SJ. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:290-301.
437. Guitart AV, Hammoud M, Dello Sbarba P, Ivanovic Z, Praloran V. Slow-cycling/quiescence balance of hematopoietic stem cells is related to physiological gradient of oxygen. *Exp Hematol*;38:847-851.
438. Ivanovic Z, Hermitte F, Brunet de la Grange P, et al. Simultaneous maintenance of human cord blood SCID-repopulating cells and expansion of committed progenitors at low O₂ concentration (3%). *Stem Cells*. 2004;22:716-724.
439. Das B, Tsuchida R, Malkin D, Koren G, Baruchel S, Yeger H. Hypoxia enhances tumor stemness by increasing the invasive and tumorigenic side population fraction. *Stem Cells*. 2008;26:1818-1830.
440. Edsjo A, Holmquist L, Pahlman S. Neuroblastoma as an experimental model for neuronal differentiation and hypoxia-induced tumor cell dedifferentiation. *Semin Cancer Biol*. 2007;17:248-256.
441. Jogi A, Ora I, Nilsson H, et al. Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:7021-7026.
442. Bar EE, Lin A, Mahairaki V, Matsui W, Eberhart CG. Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres. *Am J Pathol*;177:1491-1502.
443. Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, et al. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain*;133:983-995.
444. Dao MA, Nolte JA. Cytokine and integrin stimulation synergize to promote higher levels of GATA-2, c-myb, and CD34 protein in primary human hematopoietic progenitors from bone marrow. *Blood*. 2007;109:2373-2379.
445. Jang YY, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*. 2007;110:3056-3063.
446. Ahmed F, Arseni N, Glimm H, Hiddemann W, Buske C, Feuring-Buske M. Constitutive expression of the ATP-binding cassette transporter ABCG2 enhances the growth potential of early human hematopoietic progenitors. *Stem Cells*. 2008;26:810-818.
447. Roberts AM, Watson IR, Evans AJ, Foster DA, Irwin MS, Ohh M. Suppression of hypoxia-inducible factor 2alpha restores p53 activity via Hdm2 and reverses chemoresistance of renal carcinoma cells. *Cancer Res*. 2009;69:9056-9064.
448. Chen Y, Haviernik P, Bunting KD, Yang YC. Cited2 is required for normal hematopoiesis in the murine fetal liver. *Blood*. 2007;110:2889-2898.

ANNEXES

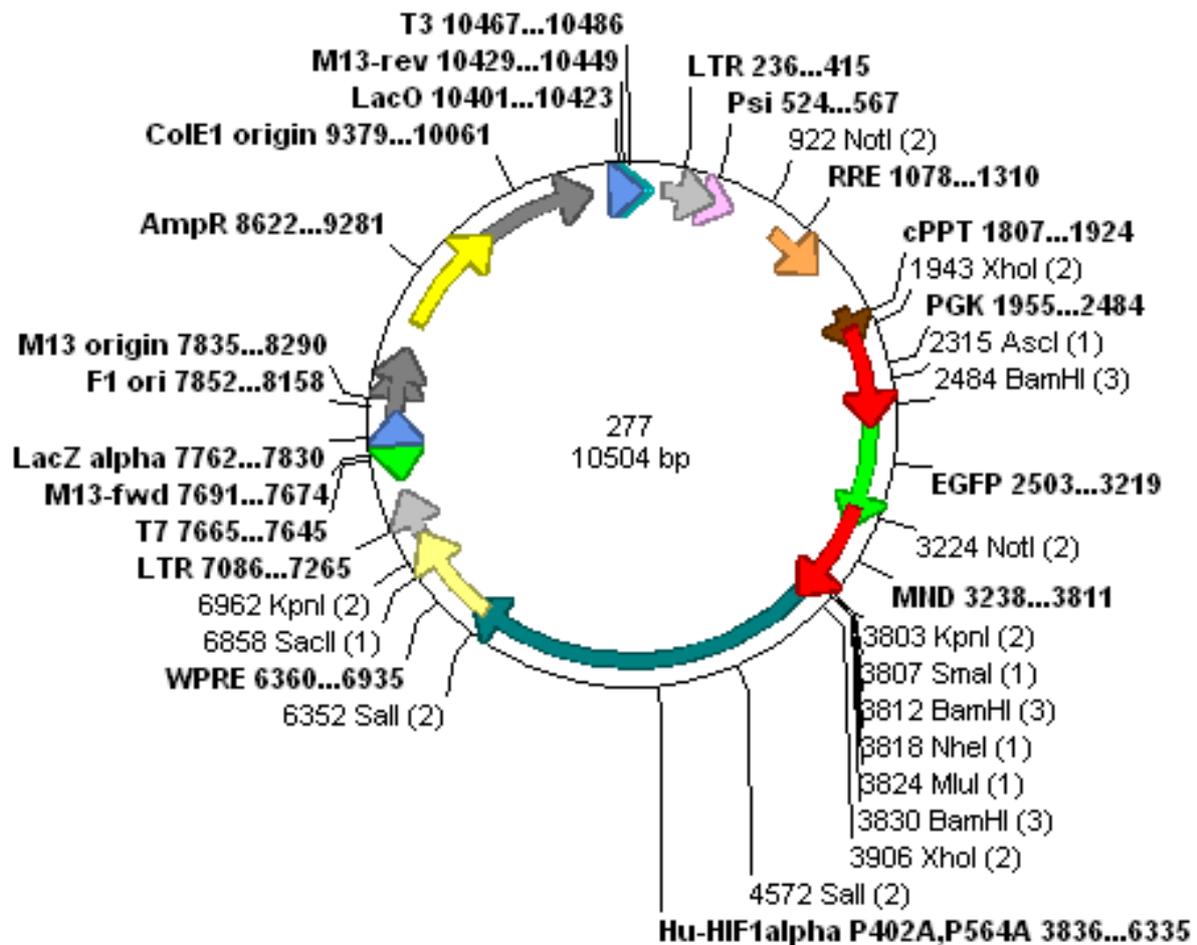
CARTES DES PLASMIDES

pRRLSIN-PGK-EGFP-MND-HA-HIF1alpha-WPRE (278)



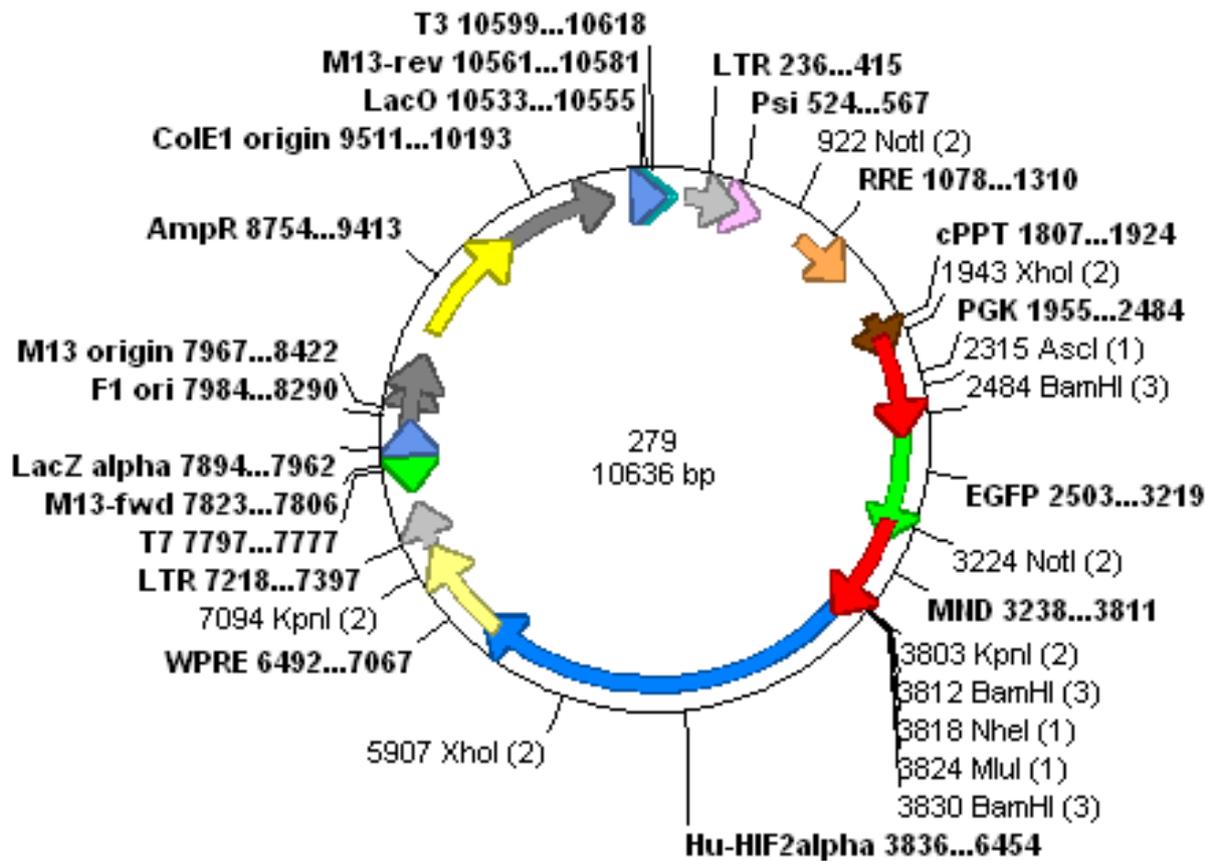
Plateforme Vectorologie IFR66
Clonage par Véronique Guyonnet Dupérat

pRRLSIN-PGK-EGFP-MND-HA-HIF1alpha-P402A/P564A-WPRE (277)



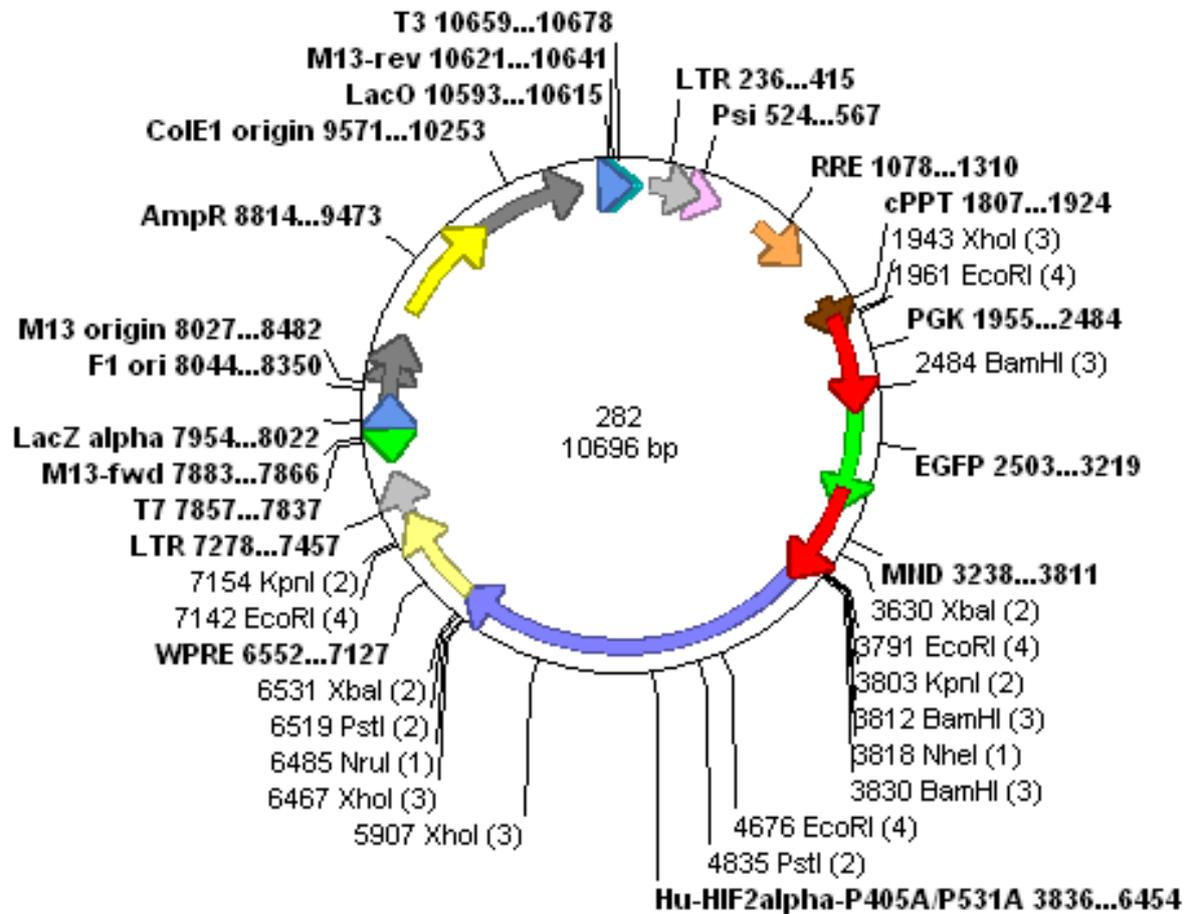
Plateforme Vectorologie IFR66
Clonage par Véronique Guyonnet Dupérat

pRRLSIN-PGK-EGFP-MND-HA-HIF2alpha-WPRE (279)



Plateforme Vectorologie IFR66
Clonage par Véronique Guyonnet Dupérat

pRRLSIN-PGK-EGFP-MND-HA-HIF2alpha-P405A/P531A-WPRE (282)



Plateforme Vectorologie IFR66
 Clonage par Véronique Guyonnet Dupérat

Communications Scientifiques
&
Prix

Communication scientifique

1/ Communication orale à des congrès internationaux (* = présentateur)

20/01/2010 Rouault K*, Lamrissi-Garcia I, de Verneuil H, Mazurier F “HIF-1a and -2a Knockdown Induced Deficiency in the Long-Term Reconstitution Ability of Human Haematopoietic Cells” **Hypoxia: Molecular Mechanisms of Oxygen Sensing and Response Pathways** Keystone Colorado, USA.

2/ Communication affichée à des congrès internationaux (* = présentateur)

20/01/2010 Rouault K*, Lamrissi-Garcia I, de Verneuil H, Mazurier F “HIF-1a and -2a Knockdown Induced Deficiency in the Long-Term Reconstitution Ability of Human Haematopoietic Cells” **Hypoxia: Molecular Mechanisms of Oxygen Sensing and Response Pathways** Keystone Colorado, USA.

3/ Communication orale à des colloques français (* = présentateur)

28/04/2010 Rouault K*, Lamrissi-Garcia I, de Verneuil H, Mazurier F “L’inactivation des facteurs de transcription HIF induit un défaut de reconstitution de la moelle osseuse par les Cellules Souches Hématopoïétiques Humaines.” **Journée Scientifique de l’Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé de Bordeaux..** Arcachon, France

02/12/2008 Rouault K*, Lamrissi-Garcia I, de Verneuil H, Mazurier F “Inactivation des facteurs de transcription HIF-1 et 2 dans les cellules souches hématopoïétiques humaines (CSH)” **Journée Scientifique de l’IFR66.** Talence, France

4/ Communication affichée à des colloques français (* = présentateur)

19/03/2010 Rouault K*, Lamrissi-Garcia I, de Verneuil H, Mazurier F “ HIF-1a and -2a Knockdown Induced Deficiency in the Long-Term Reconstitution Ability of Human Haematopoietic Cells” **Congrès Autour de la cellule souche.** Bordeaux, France.

01/12/2009 Rouault K*, Lamrissi-Garcia I, de Verneuil H, Mazurier F “Inactivation des facteurs de transcription HIF-1 α et HIF-2 α dans les cellules souches hématopoïétiques humaines (CSH)” **Journée Scientifique de l’IFR66.** Talence, France.

01/10/2009 Rouault K*, Lamrissi-Garcia I, de Verneuil H, Mazurier F “ Inactivation des facteurs de transcription HIF-1 α et HIF-2 α dans les cellules souches hématopoïétiques humaines (CSH)” **CHO 16ème congrès.** Giens, France.

23/06/2009 Rouault K*, Lamrissi-Garcia I, de Verneuil H, Mazurier F “Rôle de HIF dans la régulation des cellules souches hématopoïétiques (CSH)” **Journée des échanges Doctorants et post Doctorants, Doc’s 66 Meeting.** Talence, France.

08/04/2009 Rouault K*, Lamrissi-Garcia I, de Verneuil H, Mazurier F “Inactivation des facteurs de transcription HIF-1 et 2 dans les cellules souches hématopoïétiques humaines (CSH).” **Journée Scientifique de l’Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé de Bordeaux..** Arcachon, France

24/06/2008 Rouault K*, Lamrissi-Garcia I, de Verneuil H, Mazurier F “Rôle de HIF dans la régulation des cellules souches hématopoïétiques (CSH)” **Journée des échanges Doctorants et post Doctorants, Doc’s 66 Meeting**. Talence, France.

5/ Prix et bourses

- 01/11/2010 **Bourse de FIN de THESE de la FRM** pour une durée de 4 mois à partir du 01/11/2010.
- 19/03/2010 **1^{er} prix de la communication affichée** Congrès Autour de la cellule souche. Bordeaux, France.
- 20/01/2010 **Bourse de voyage** (Travel Grant) Hypoxia: Molecular Mechanisms of Oxygen Sensing and Response Pathways Keystone Colorado, USA.
- 01/12/2009 **2^{ème} prix de la communication affichée** Journée Scientifique de l’IFR66. Talence, France.

