

Université Bordeaux Segalen

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Année 2011

Thèse n°1874

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 21 décembre 2011

Par *Yann PEYTOUR*

Né le 27 décembre 1984 à Firminy

**Les cellules CD34<sup>+</sup> du sang périphérique en condition d'homéostasie**

Elution à partir de filtres de leucoréduction

Etude de l'effet des basses concentrations d'oxygène (0,1%) sur la biologie des  
cellules souches hématopoïétiques

**Membres du Jury**

Pr. Serge Alziari	Président
Pr. Jorge Domenech	Rapporteur
Pr. Luc Douay	Rapporteur
Pr. Lido Calorini	Examineur
Pr. Paola Chiarugi	Examineur
Pr. Maria Ziche	Examineur
Pr. Vincent Praloran	Directeur de thèse
Pr. Dello Sbarba	Co-Directeur de thèse

*Ce manuscrit est dédié aux gens que j'aime :*

*A Julie*

*A ma Mère*

*A mon Père*

*A mes Frères*

*A mes amis et à ma famille*

*D'ici et d'ailleurs*

# Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord les membres du jury de ma thèse :

Monsieur le **Professeur Serge Alziari** qui me fait l'honneur de présider ce jury. L'intérêt porté à mon parcours durant ces 6 ans et à ma future insertion professionnelle a toujours été un honneur pour moi. Ce manuscrit est également le fruit de votre implication passionnée dans le devenir des ingénieurs clermontois en quête de Recherche...

Monsieur le **Professeur Jorge Domenech** pour avoir accepté de juger ce travail de thèse en qualité de rapporteur.

Monsieur le **Professeur Luc Douay** pour avoir accepté la lourde tâche d'évaluer ce travail de thèse en tant que rapporteur.

Il Signor **Professore Persio Dello Sbarba**, che ha co-diretto la mia cotutella di tesi, per la sua partecipazione a questa commissione, per l'accoglienza nel suo laboratorio, la sua pazienza, la sua disponibilità nel trattamento dei miei risultati e per il suo interessamento nella nostra integrazione (a Julie e a me) nella vita italiana. Grazie anche per avermi permesso di sopravvivere all'"inferno italiano"!

Il Signor **Professore Lido Calorini**, la Signora **Professore Paola Chiarugi** e la Signora **Professore Maria Ziche** per avere accettato di partecipare a questa commissione in qualità di esaminatori.

Ces remerciements s'adressent plus particulièrement à Monsieur le **Professeur Vincent Praloran**, qui a dirigé mes travaux de thèse pendant ces 3 ans. Merci tout d'abord de m'avoir permis d'intégrer votre équipe dès mon stage de Master, de m'avoir encouragé à poursuivre en thèse et enfin de me donner la possibilité de rester (encore quelques mois de plus) au sein du laboratoire. Merci pour votre soutien inconditionnel pendant toutes ces années, votre humanité, votre patience et pour votre implication quotidienne dans mes travaux, notamment durant la rédaction de ce manuscrit. Votre esprit critique lors de nos discussions - professionnelles ou non - m'aura également permis d'affiner mes capacités d'analyse. Merci « Prof » !

Ces remerciements s'adressent également à toutes les personnes de l'UMR 5164. Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à **Hélène Bœuf** pour son intérêt porté à l'ensemble de mes travaux, mais également pour sa disponibilité et son esprit critique concernant mon avenir professionnel. Je tiens à remercier **Pierre Thiébaud**, ainsi que l'ensemble des membres de son équipe, pour les discussions scientifiques lors de mes présentations orales et pour m'avoir permis de découvrir

*l'énigme du « Mostro di Firenze ». Je remercie également **Vincent Pitard** pour son aide et ses connaissances en matière de cytométrie en flux, Merci à **Véro** et **François** pour leur sympathie, nos nombreuses discussions (parfois scientifiques !) et leur soutien moral durant ces 3 années, difficiles quelques fois. Merci à **Richard**, pour nos séances de papotages régulières hors des locaux de l'unité et à **Aurélié** pour son franc-parler et sa bonne humeur quotidienne.*

*Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères à **Annie** qui a su tout au long de ces années me sortir des embûches administratives ! Merci de m'avoir toujours soutenu moralement et professionnellement et merci également pour ta patience et ta gentillesse (quelques fois émoussées c'est vrai, mais toujours pour de bonnes raisons...).*

*Un énorme merci à **Sandrine**, la note joviale du laboratoire, pour sa joie de vivre, son enthousiasme, son oreille attentive, ses mimiques et son rire communicatif... suivi du petit claquement de main qui va bien ! Que dire concernant l'ovni nommé **Xavier**, tant les qualificatifs en matière de singularité sont désuets pour décrire le personnage ? Merci pour ton humour et pour cette touche de folie si particulière que toi seul possède, mais également pour ta « capacité d'observation » hors-pair depuis nos box du L2 !*

*Je tiens également à remercier **Julien** pour ses visites toujours bienvenues, pour nos débats littéraires, sportifs et pour nos débriefings de week-ends ! Une pensée à tous les autres thésards du laboratoire (anciens et actuels) : **Karine**, **Claire**, **Mat**, **Marie-Emmanuelle**, **Marianne**, **Aurore** et **Clément**, à qui je souhaite sincèrement de réussir et, je croise les doigts, pour certains on tient le bon bout ! Un clin d'œil également à **Madelein** qui a eu la lourde tâche d'être sous ma coupe durant son séjour en France !*

*Je tiens à remercier chaleureusement tous les membres de l'Etablissement Français du Sang qui ont collaboré à ces travaux. Je voudrais tout d'abord remercier **Marija Vlaski** pour son aide lors de mes travaux, mais surtout lui présenter mes plus sincères excuses concernant le changement de jury des deniers instants, j'espère vraiment que cela n'interférera pas dans nos relations. Je tiens à exprimer toute ma gratitude à **Zoran Ivanovic** qui a fortement contribué à la signature d'un contrat de travail au sein de l'EFS, me permettant de poursuivre mes travaux dès novembre et également pour la qualité de ses remarques lors des discussions de mes résultats. J'aimerais remercier tout particulièrement **Philippe Brunet** pour son aide sans faille et ses compétences en qualité de greffes intra-fémorales et ce, même à des heures « inattendues ».*

*Merci également pour ton soutien et l'apport scientifique à mes travaux. Un  
merci sincère à **Jean** pour nos*

échanges concernant la mise au point de la technique des filtres, ainsi qu'à **Corinne Hamsany** qui m'a quotidiennement fourni les filtres de leucoréduction.

Je tiens à remercier toute l'équipe de cytométrie en flux de l'hôpital Haut-Lévêque, **Alex, Marie, Manon**, ainsi que **Francis Lacombe** pour leur aide, leur professionnalisme et leur très grande disponibilité lors des travaux sur la différenciation.

J'aimerais remercier tous les membres du Dipartimento di Patologia e Oncologia Sperimentali de Florence pour leur accueil et leur gentillesse. Plus particulièrement, j'aimerais adresser mes amitiés à **Elisabetta, Michele, Daniele** et **Ina** qui ont su me mettre en confiance, me faire prendre conscience de la qualité de mon italien et pour leur aide dans mes travaux, leur joie de vivre et leurs conseils en matière de tourisme florentin.

Un grand merci également à **Catherine Ceyrac** pour sa gentillesse et sa disponibilité concernant les modalités administratives diverses en lien avec la thèse, ainsi qu'à **Dominique Franchini** pour son implication et sa patience lors de l'élaboration de la convention de co-tutelle de thèse et à **Olivier Fontan** pour son sens de l'écoute et son intérêt porté à l'obtention de ma bourse de mobilité.

Je tiens à remercier le **CNRS** d'avoir financé mes trois ans de thèse et accordé le renouvellement de ma bourse d'étude, ainsi que l'**EFS** pour son aide au développement de nos projets. Je remercie également l'**Université de Bordeaux Segalen** pour m'avoir permis de bénéficier d'une bourse de mobilité, ainsi que la **Ligue Nationale contre le Cancer** et l'**Association Laurette Fugain** pour leurs financements respectifs.

Je souhaite à présent remercier tout particulièrement deux personnes sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est : **Arnaud Villacreces** et **Amélie Guitart**. Ne pensez pas que je ne pense à vous qu'en dernier, car vous êtes au contraire tout pile entre le travail et la famille. Je vous avais promis une page entière dans mes remerciements de Master mais j'ai peur qu'une fois encore cela ne soit pas suffisant pour vous dire à quel point cela fut un réel plaisir de travailler à vos côtés (et maintenant carrément en tant que chef pour certains...). Merci pour tout, pour les rires, les ras-le-bol, les moments de pression et de dépression (dans le bon sens du terme bien sûr), pour les déménagements, les travaux et je zappe des milliers de choses. Merci également pour votre aide et votre soutien, votre bonne humeur, vos chansons et votre inconditionnel amour

*de Toulouse (bien que là..., enfin passons). Pour reprendre Bref, j'ai entendu une chanson pourrie : je croise un gars un matin il m'dit « tu connais la chanson de Elmer le requin*

marteau ? », je lui dis « Non », il m'chante la chanson, je lui dis « Non je vois pas », il m'dit « Attends je te montre ça sur YouTube », je lui dis « Euh..., non je vois toujours pas », il m'regarde de haut, il m'dit « Tu crains ». Bref le gars chante ça à tue-tête pendant presque une semaine, m'envoie le lien par mail, me raconte l'histoire du groupe et la philosophie de l'histoire qui, à la base, parle quand même d'un requin qui s'est fait pousser des pieds, il arrive même à trouver un collègue qui connaît lui aussi Elmer le requin... et là, rebelote, nouveau visionnage sur YouTube, version en canon de Elmer, version sifflée, version a capella et version chœurs de Moscou. A la fin, je pète un câble. Pour finir, je me réveille un matin, plus de déo, mais un tatouage de Elmer sur la fesse... Bref, j'ai entendu une chanson pourrie. No comment ! Merci pour tout et bonne route à vous deux.

J'aimerais à présent remercier ma famille pour leur soutien incommensurable durant toutes les étapes de mon cursus scolaire qui prend fin bientôt ! Merci à mes parents, **Annie** et **Jean-Pierre**, pour leur amour, leur présence, leurs séjours dans mes différentes maisons, leur soutien et leur écoute dans les moments parfois (très) difficiles, pour l'estime qu'ils ont de moi et de mon travail et enfin pour leur patience, leur aide en tout genre, leur envie de nous avoir toujours auprès d'eux et pour toutes les autres choses que j'oublie certainement et dont je les prie de m'excuser. Je vous aime et vous remercie encore ! Merci à mes frères **Ced** et **Kami**, merci pour notre complicité malgré la distance, merci de m'accepter tel que je suis (et souvent je sais pas comment vous faites), merci pour nos souvenirs d'enfance et pour tous ceux qu'on a encore à s'inventer, pour nos week-ends, nos bastons, pour vos visites et pour notre complicité qui fait qu'on se sent nous-mêmes ensemble et aussi, malgré tout, pour votre humour (parfois si faible...). Merci à vous deux, à **Fabienne** et à **Laly** qui vous accompagnent et que j'embrasse. Je vous aime et vous souhaite bonheur et réussite dans tous les domaines ! Merci à **Christophe**, **Christine** et **Emeline**, que j'aimerais voir plus souvent et qui savent que je pense à eux. Merci pour votre gentillesse, votre sympathie et votre joie de vivre. Merci à **Gérard**, **Marie-France**, **Geo** et **Claire** pour votre amitié sincère, votre gentillesse et pour votre accueil chaleureux. Une pensée toute particulière à **Franck**, **Sarah**, **Noam** et **Yoni**, pour votre si belle manière d'aimer la vie, pour avoir repris contact malgré les années, pour ces belles soirées passées et futures, pour ce que vous êtes et pour les deux petits bouts de chou à qui vous avez donné naissance. Un clin d'œil tendre à **Azida**, à la famille **Garnon & co** et à **Clairette & Riri** qui, je le sais, suivent ma progression.

Ces remerciements s'adressent tout particulièrement à une personne qui a beaucoup compté pour moi pendant cette thèse et qui compte chaque jour toujours plus à mes yeux. A toi **Julie**, à ta tendresse, ta force, ta volonté, à ta rage de vivre et à ton amour des choses et de ton travail. A notre amour, nos envies, nos rêves et nos projets, à tous nos moments rien qu'à nous, à notre complicité, à tous ces moments inoubliables, à notre PACS romain, à notre superbe séjour Florentin, à nos différentes escapades dans des coins plus magnifiques les uns que les autres et à toutes les futures excursions à venir. Merci mon « tichat », cette thèse est aussi la tienne ! Merci de m'avoir soutenu, poussé, supporté aussi, durant ces longues périodes de travail et de m'avoir redonné l'envie d'aimer la vie. Merci d'avoir participé à la correction assidue de cette thèse et de m'avoir suivi dans ce périple italien. Je t'aime. De tout mon amour de toutes mes envies de futur avec toi, de tous nos désirs de construire la vie tous les deux. Merci pour tout ! Merci également à **ma belle famille**, pour vos visites, votre gentillesse, votre accueil et l'intérêt porté à mon avancée.

J'aimerais à présent remercier tous mes amis pour les merveilleux moments passés durant ces 3 années. Merci aux Bordelais tout d'abord. Un grand merci tout particulier à **Fab** et **Faf** pour m'avoir supporté en tant que squatteur, puis colocataire pendant près de deux ans... Ma vie de thésard n'aurait jamais été aussi belle sans nos retrouvailles des vendredis et samedis soir, nos chansons, nos chorégraphies, nos parties de console, nos virées plage, nos parties barbeuc', nos discussions éclectiques (parfois trop tardives selon Fafette...) et j'en passe tellement. Merci de ne m'avoir jamais jugé, merci pour nos délires et pour tous nos moments que peu de gens comprennent mais qui nous rapprochent tant. Vous êtes mon petit bol d'air frais et une de mes plus belles rencontres sur Bordeaux. Plein de belles choses à vous, notamment pour le mariage en mai prochain, on est pas sûr de pouvoir être là, j'ai compété de piscine... Aux futures retrouvailles et aux futurs projets de construction. Merci encore mes ptis, ma perte exponentielle de neurones je vous la dois aussi ! Un merci tout particulier à mon pti **Max**, qui me comprend mieux que tout le monde pour être passé par la case « thèse », pour son excentricité, son rire, ses idées débiles et sa motivation toujours trop débordante et pour avoir fait de nos vendredis soirs à la coloc (la notre ou la tienne) des moments irréels et inexplicables, même maintenant. Déçu de ne plus te compter parmi mes « voisins », mais en tout cas plein de réussite et d'amour pour ta nouvelle vie parisienne. Hâte de te recroiser dans la région, je prends la chambre du milieu comme d'hab ! Un énorme merci à mon petit couple de

Manceaux **Mike** et **Tania** pour leur venue sur Bordeaux, pour nos soirées poker, pour ta patience Tania (des fois il en faut beaucoup c'est vrai), pour votre amitié et votre sincérité et pour nous avoir offert le premier petit (custard...) bordelais, **Ethan**, a qui je souhaite un avenir plein d'émerveillement. Merci **Mike** pour tous les moments partagés dans nos 9 m<sup>2</sup> clermontois respectifs, pour ton humour, ton sens de l'écoute et ta manière unique de danser. Merci pour tous nos délires et pour toutes mes victoires à PES qui me manquent autant les uns que les autres. Merci pour notre belle amitié même si j'y fais défaut quelques fois et je m'en excuse... Plein de belles choses à vous 3. Merci aussi aux bordelais pour nos sessions surf, malgré l'année peu prolifique ! Un merci à **Mat'** (quoique...), pas bordelais mais pas loin, pour être si chiant, si bruyant (de nuit comme de jour), si casse-c... tout le temps et pour être, on l'espère (c'est ça le pire), peut-être un futur voisin. Plein de belles choses à toi et à **Oxana** et félicitations pour novembre prochain ! Un clin d'œil à **Tit'Fanny** et **Florian**, mari et femme depuis peu et que le peu de temps libre m'empêche de voir aussi souvent que j'aimerais. Un autre clin d'œil à ceux qui deviennent petit à petit plus que des relations : **Ju'**, **Vaness**, **Barbara**, **Annick**, **Aurélie**, **Céline** et **Fréd(éric)**. Merci à présent aux Lyonnais, les mots vont manquer pour décrire la bizarrerie de nos week-ends. Merci à **Ricard** pour nos suivis téléphoniques réguliers (quoique difficiles en ce moment), pour ses venues toujours spectaculaires à Bordeaux, pour nos soirées à la coloc (clermontoise, lyonnaise ou bordelaise), pour ta venue en Italie, avec **Alice**, que j'embrasse également ! Merci de m'avoir supporté, de m'avoir sauvé la vie à plusieurs reprises dans tous les coins du monde, désolé pour les plans foireux et les incidents divers et variés lors des trajets de fin de soirée. Merci pour notre amitié qui tient malgré la distance et que j'ai hâte de raviver dès la fin de cette thèse. Hye coquine, vous êtes un grand monsieur (au moins 1,95-96, okay je sors...). Merci à mon autre petit couple préféré **Daweed** et **JJ**, mes deux charlots de Lyonnais, pour nos délires depuis la coloc de Clermont, pour vos venues toujours attendues et redoutées, pour tous les finves et les ions, pour les aliens (sisi ils existent, ils griffent même...) pour avoir été trop souvent pétés comme des amplis ou des raquettes, pour toutes nos chutes, nos si belles envolées Goldman et pour toutes les futures retrouvailles (viendez vivre sur Bordeaux, ça évitera la route...). Merci d'être si ingérables (Mr Sale aime ça !). Merci au troisième couple de Lyonnais **Fanfan** et **Katia**, j'ai l'impression que ça fait des années qu'on a pas eu l'occasion de se voir, je sais même plus à combien vous roulez. Félicitation pour l'achat de l'appart (mais à quand une crémaillère, on s'occupe de ramener la griiigne). Merci à

toutes les soirées lyonnaises, clermontoises et bordelaises (par contre ça fait du au moins 956 à 2 ou 3 pour moi concernant le déplacement). Une pensée à mon **Pierrot** qui me manque vraiment sincèrement depuis le temps et à toi **Marion** pour vos venues bordelaises. Merci **Pierrot** pour les grands moments de visite et d'errance (on se fait un ti croissant au fromage ?), pour tout ce qu'on a pu partager durant ces années, pour ta connerie, pour ta capacité à gérer la quiche soudaine et tes connaissances si variées. Merci pour les coups de fil lors des nuits difficiles et désolé pour celui qu'on n'arrive pas à se passer en ce moment...

Un énorme merci à mes deux GB préférés **GroCed** et **Grolio**. Merci pour tous nos moments prises de tête en projets, nos nuits geek, nos retrouvailles qui vont devoir bientôt être remises au goût du jour. Merci **Groced** pour notre virée Wageningenoise et tout ce qui va avec, pour ta venue remarquée à Bordeaux (no comment !), pour notre amitié et nos coups de fil qui s'espacent (il faut faire un truc là....). J'ai toujours été fier de compter parmi tes amis et sache que tu me manques. Plein de réussite à toi pour l'avenir et courage pour cette période de rédaction que tu affrontes toi aussi. Merci **Grolio** pour ta folie, ta bonne humeur inconditionnelle et ta volonté de toujours chercher à garder le contact, pour ça je te remercie mille fois. Merci de toujours t'intéresser à ce que je deviens, tu me manques aussi ma c...! Félicitation à toi et à **Amandine** pour votre maison et le bonheur qui vous attend d'ici peu.

Merci également à tous les **Custards** que je n'ai pas vu depuis longtemps, une pensée à ma fillote **Chacha**, mon fillot **Sansan**, à **Angèle** (qui m'a zappé lors de sa venue sur Bordeaux...), à tous ceux qui ont fait partie des moments irracontables dans la coloc clermontoise de Sansan et **Cricri**, à **Yannou**, **Aurél'** et tout les autres. Un coucou à **Jo**, **Vivi**, **Damien**, **Ed'**, **Pascal**, **Florianne**, **Ben-J**, **Chauss**, **Mélissa**, **Mirko** & **Anna**.

Merci à notre **Mousse** qui a participé de manière inactive et bruyante à la rédaction de ce manuscrit, à **Dexter**, notre touche de frisson visuel et enfin à toutes les **cellules CD34<sup>+</sup>** que j'ai eu l'occasion de côtoyer durant ces 3 ans et demi.

Merci enfin à toutes les personnes qui ont, ou non, participé de près, ou de loin, à cette thèse et dont j'ai oublié de citer le nom (je sais qu'il y en a, mille excuses en tout cas).

Bonne lecture...

# *Sommaire*

<b>Tables des Figures et Tableaux</b>	p.13
<b>Abréviations</b>	p.16
<b>Avant-propos - Situation générale de l'étude</b>	p.19
<b>Introduction</b>	p.24
<b>I- Les cellules souches hématopoïétiques</b>	p.25
<b>I.1- Notion de cellules souches</b>	p.25
I.1.1- Caractéristiques fondamentales	p.25
I.1.2- Potentiel de différenciation	p.25
I.1.3- Cas particulier des cellules souches adultes	p.26
<i>I.1.3.a- Historique de la découverte</i>	p.26
<i>I.1.3.b- Hétérogénéité tissu-dépendante</i>	p.27
<b>I.2- L'hématopoïèse</b>	p.28
I.2.1- Présentation générale	p.28
I.2.2- Ontogenèse du tissu hématopoïétique	p.29
I.2.3- Organisation du tissu hématopoïétique	p.30
<i>I.2.3.a- Les CSH</i>	p.30
<i>I.2.3.b- Les progéniteurs</i>	p.32
<i>I.2.3.c- Les précurseurs</i>	p.33
<i>I.2.3.d- Les cellules matures</i>	p.33
I.2.4- Identification des CSH	p.34
<i>I.2.4.a- Caractéristiques phénotypiques des CSH</i>	p.34
<i>I.2.4.b- Caractéristiques fonctionnelles des CSH</i>	p.35
<i>I.2.4.c- Tests fonctionnels</i>	p.37
- Tests <i>in vivo</i> de reconstitution hématopoïétique à long terme	p.37
- Tests <i>in vitro</i>	p.40
<b>II- Régulation des CSH adultes normales</b>	p.42
<b>II.1- Le microenvironnement médullaire</b>	p.43
II.1.1- Concept de « niche »	p.43
II.1.2- Diversité des niches hématopoïétiques	p.44
<b>II.2- Régulation des CSH par le microenvironnement</b>	p.45
II.2.1- Facteurs d'adhésion et de recrutement au sein de la niche	p.45
II.2.2- Les voies de signalisation dans la niche	p.47
II.2.3- Importance des facteurs solubles	p.50
<i>II.2.3.a- Les facteurs régulant positivement l'hématopoïèse</i>	p.51
<i>II.2.3.b- Les facteurs régulant négativement l'hématopoïèse</i>	p.52
<i>II.2.3.c- Combinaisons cytokiniques et expansion ex vivo des CSH</i>	p.52

<b>II.3- Mécanismes intracellulaires impliqués dans la régulation des CSH</b>	p.54
II.3.1- Facteurs de transcription et voies de transduction du signal	p.54
II.3.2- Importance du cycle cellulaire	p.55
II.3.2.a- <i>Présentation générale</i>	p.55
II.3.2.b- <i>Régulation des CSH par contrôle du cycle cellulaire</i>	p.56
II.3.3- Rôle des microARN	p.56
<b>III- Importance de l'oxygène dans l'hématopoïèse</b>	p.58
<b>III.1- Concentrations physiologiques d'O<sub>2</sub></b>	p.59
III.1.1- Notion d'hypoxie ou de normoxie <i>in situ</i>	p.59
III.1.2- Distribution de l'O <sub>2</sub> dans l'organisme	p.60
III.1.2.a- <i>Concentration tissu-dépendante</i>	p.60
III.1.2.b- <i>Gradient d'O<sub>2</sub> et compartiments hématopoïétiques</i>	p.60
<b>III.2- Adaptation et réponse aux basses concentrations d'O<sub>2</sub></b>	p.61
III.2.1- Présentation des facteurs de transcription HIF	p.61
III.2.1.a- <i>Expression des sous-unités du HIF</i>	p.61
III.2.1.b- <i>Structure des sous-unités</i>	p.62
III.2.1.c- <i>Cibles potentielles et voies de signalisation dépendantes de HIF</i>	p.63
III.2.2- Régulation des facteurs de transcription HIF	p.63
III.2.2.a- <i>Régulation dépendante de l'O<sub>2</sub></i>	p.63
III.2.2.b- <i>Régulation indépendante de l'O<sub>2</sub></i>	p.65
III.2.3- Les autres acteurs de l'adaptation aux faibles concentrations d'O <sub>2</sub>	p.66
<b>III.3- CSH et basses concentrations d'O<sub>2</sub></b>	p.67
III.3.1- Influence des faibles concentrations d'O <sub>2</sub> sur les cultures de CSH	p.67
III.3.2- Importance des cytokines lors de cultures à faible concentration d'O <sub>2</sub>	p.69
III.3.3- Mécanismes d'adaptation des CSH aux faibles concentrations d'O <sub>2</sub>	p.70
III.3.3.a- <i>Métabolisme glycolytique et oxydatif</i>	p.71
III.3.3.b- <i>Régulation des ROS</i>	p.71
III.3.3.c- <i>Maintien de la quiescence</i>	p.72
<b>Résultats</b>	p.73
I- Optimisation d'une technique de purification de cellules CD34 <sup>+</sup> humaines	p.74
<b>I.1- Contexte des travaux</b>	p.74
<b>I.2. Mise en place de l'étude</b>	p.75

<b>I.3. Résultats et conclusions</b>	p.77
<b>I.4. L'article</b>	p.78
<b>II- Influence des basses concentrations d'O<sub>2</sub> et des conditions de culture sur la quiescence, le maintien et l'expansion des CSH adultes normales</b>	p.90
<b>II.1- Contexte des travaux</b>	p.90
<b>II.2. Mise en place de l'étude</b>	p.91
<b>II.3. Résultats et conclusions</b>	p.92
<b>II.4. Travaux complémentaires</b>	p.94
<b>II.5. Présentation du manuscrit</b>	p.96
<b>III- Etude de l'effet des basses concentrations d'O<sub>2</sub> sur la quiescence d'une lignée cellulaire de leucémie myéloïde chronique (K562)</b>	p.122
<b>III.1- Contexte et objectifs des travaux</b>	p.122
<b>III.2. Matériels et méthodes</b>	p.125
<b>III.3. Résultats</b>	p.126
<b>III.4. Discussions et perspectives</b>	p.128
<b>Réflexion et perspectives</b>	p.130
<b>Références bibliographiques</b>	p.136
<b>Annexes</b>	p.156
Annexe 1 - Facteurs de transcription et régulation des CSH	p.157
Annexe 2 - Sélection de conditions cytokiniques permettant le maintien et l'amplification des populations hématopoïétiques primitives lors de cultures à 0,1% d'O <sub>2</sub>	p.160

*Table des Figures  
et Tableaux*

## Table des Figures

<b>Figure 1</b> : Potentiels de différenciation des cellules souches	p.26
<b>Figure 2</b> : Hétérogénéité des cellules souches adultes dans l'homéostasie et la réparation tissulaire	p.27
<b>Figure 3</b> : Ontogenèse de l'hématopoïèse humaine	p.29
<b>Figure 4</b> : Représentation schématique des compartiments hématopoïétiques	p.30
<b>Figure 5</b> : Modèles de division et d'engagement en différenciation des CSH	p.31
<b>Figure 6</b> : Modèles d'engagement des MPP	p.32
<b>Figure 7</b> : Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules hématopoïétiques primitives humaines	p.34
<b>Figure 8</b> : Hiérarchie des CSH et des progéniteurs en fonction des méthodes de détection utilisées	p.37
<b>Figure 9</b> : Modèles possibles pour la niche hématopoïétique	p.44
<b>Figure 10</b> : Interactions impliquées dans l'adhésion et le recrutement des CSH au sein de la niche ostéoblastique	p.45
<b>Figure 11</b> : Mécanismes moléculaires des voies de signalisation TGF- $\beta$ /BMP et Wnt/ $\beta$ -caténine et leurs implications dans la biologie des CSH	p.48
<b>Figure 12</b> : Mécanismes moléculaires des voies de signalisation Hedgehog et Notch et leurs implications dans la biologie des CSH	p.49
<b>Figure 13</b> : Production des facteurs de croissance hématopoïétiques	p.50
<b>Figure 14</b> : Régulation par les facteurs de croissance et cytokines de certaines étapes cibles de l'hématopoïèse	p.51
<b>Figure 15</b> : Principaux facteurs de transcription régulant l'hématopoïèse	p.54
<b>Figure 16</b> : Phases du cycle cellulaire et principales stratégies de régulation	p.55
<b>Figure 17</b> : Biogenèse des microARN et mécanismes d'action	p.56
<b>Figure 18</b> : Régulation de l'hématopoïèse humaine par les microARN	p.57
<b>Figure 19</b> : Concentration d'O <sub>2</sub> dans les principaux organes du corps humain	p.60
<b>Figure 20</b> : Localisation des compartiments hématopoïétiques dans la moelle osseuse en fonction du gradient d'O <sub>2</sub>	p.61
<b>Figure 21</b> : Homologies de séquences des sous-unités de HIF et liaison à l'ADN	p.62
<b>Figure 22</b> : Principaux gènes cibles de HIF-1 et fonctions biologiques associées	p.63
<b>Figure 23</b> : Régulation de HIF-1 $\alpha$ via les PHD et FIH-1	p.64
<b>Figure 24</b> : Principaux facteurs de transcription impliqués dans la réponse aux faibles concentrations d'O <sub>2</sub>	p.66
<b>Figure 25</b> : Influence de la concentration en O <sub>2</sub> <i>in vitro</i> sur les différents compartiments hématopoïétiques humains	p.69
<b>Figure 26</b> : Croissance de la lignée cellulaire K562 à 0,1% d'O <sub>2</sub> en fonction de la concentration initiale d'implantation	p.126

- Figure 27** : Evolution des quantités de cellules K562 dans les phases du cycle cellulaire lors de culture à 0,1% d'O<sub>2</sub> p.127
- Figure 28** : Evolution des quantités protéiques de BCR/Abl, Abl et pCrkl en fonction de la durée d'incubation des cellules K562 à 0,1% d'O<sub>2</sub> p.128

### **Table des Tableaux**

- Tableau 1** : Applications cliniques de l'expansion *ex vivo* des cellules hématopoïétiques humaines p.52
- Tableau 2** : Exemples de combinaisons cytokiniques utilisées pour l'expansion *ex vivo* de cellules hématopoïétiques humaines p.53

# *Abréviations*

**5-FU** : 5-FluoroUracile

**AGM** : Aorte-Gonade-Mésonéphros

**ALDH** : Aldéhyde DésHydrogénase

**AM** : Activité Mitochondriale

**AML1** : Acute Myeloid Leukemia 1

**Ang-1** : Angiopoïétine-1

**ARD-1** : ARrest Defective-1

**ARNm** : ARN messenger

**ARNT** : Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator

**BCR-Abl** : breakpoint cluster region-abelson murine leukemia viral oncogene

**BFU** : Burst Forming Unit

**BFU-E** : BFU-Erythroïde

**bHLH** : basic Helix-Loop-Helix

**BMP** : Bone Morphogenic Protein

**CaR** : Calcium-sensing Receptor

**CB** : Cord Blood

**CD** : Clusters of Differentiation

**CDK** : Cyclin Dependent Kinase

**CDKI** : CDK Inhibitor

**CFC** : Colony Forming Cell

**CFU** : Colony Forming Unit

**CFU-E** : CFU Erythroïde

**CFU-G** : CFU Granulocytaire

**CFU-GM** : CFU Granulo-Macrophagique

**CFU-M** : CFU Macrophagique

**CFU-MK** : CFU-Mégakaryocytaire

**CFU-S** : Colony Forming-Spleen Unit

**CGR** : Concentré de Globules Rouges

**Cip** : Cyclin dependant kinase Interacting Protein

**CLP** : Progéniteur Lymphoïde Commun

**CMP** : Progéniteur Myéloïde Commun

**CMV** : Cytomégalovirus

**CRC** : Culture Repopulating Cell

**CSH** : Cellule Souche Hématopoïétique

**CSM** : Cellule Souche Mésoenchymateuse

**CSL** : Cellule Souche Leucémique

**CSSP-H** : Cellule Souche de Sang Périphérique en situation d'Homéostasie

**C-TAD** : C-Terminal Activating Domain

**Dhh** : Desert Hedgehog

**ECM** : Matrice ExtraCellulaire

**EFS** : Etablissement Français du Sang

**EPAS** : Endothelial PAS protein

**EPO** : Erythropoïétine

**FGF** : Fibroblast Growth Factor

**FIH** : Factor Inhibiting HIF

**Flt3-L** : Fms-Like Tyrosine kinase 3-ligand

**Fox** : Forkhead box

**Fzd** : Frizzled

**G-CSF** : Granulocyte-Colony Stimulating Factor

**Gfi-1** : Growth Factor Independant 1

**Gli** : Glioblastome

**GluT-1** : Glucose Transporter-1

**GM-CSF** : Granulocyte and Macrophage-Colony Stimulating Factor

**GMP** : Progéniteur Granulo-Macrophagique

**Gpx1** : Gluthation peroxydase 1

**HD** : High Density

**Hh** : Hedgehog

**HIF** : Hypoxia Inducible Factor

**HIM** : Hematopoietic Inductive Microenvironment

**HRE** : Hypoxia Response Element

**Ihh** : Indian Hedgehog

**IL-** : Interleukin-

**IM** : Imatinib Métylate

**ITK** : Inhibiteurs de Tyrosine Kinase

**JAK** : Kinase JAnus

**Kip** : Kinase Inhibitory Protein

**LC<sub>1</sub>** : Culture Liquide Primaire

**LC<sub>2</sub>** : Culture Liquide Secondaire

**LD** : Low Density

**LDHA** : Lactate DéHydrogénase A

**LMC** : Leucémie Myéloïde Chronique

**LMPP** : Lymphoid-Primed Multipotent Progenitor

**LRF** : Filtre de LeucoRéduction

**LT-SRC** : Long-Term-SRC

**LTC-IC** : Long Term Culture-Initiating Cell

**LTRA** : Long-Term Repopulating Ability

**MAPK** : Mitogen-Activated Protein Kinase

**MEP** : Progéniteur érythro-mégakaryocytaire

**MGDF** : Megakaryocyte Growth and Development Factor

**Mib-** : Mindbomb

**Mip-1 $\alpha$**  : Macrophage inhibitory protein-1 $\alpha$

**miR** : microARN  
**MMR** : Maladie Minimale Résiduelle  
**MO** : Moelle Osseuse  
**MPP** : Progéniteur multipotent  
**MRA** : Marrow Repopulating Ability  
  
**NECD** : Notch ExtraCellular Domain  
**Neur-** : Neuralized  
**NICD** : Notch IntraCellular Domain  
**NO** : Nitric Oxyde  
**NOD** : Non Obese Diabetic  
**NOG** : NOD/SCID/IL-2R $\gamma^{\text{null}}$   
**N-TAD** : N-Terminal Activating Domain  
  
**O<sub>2</sub>** : Oxygène  
**ODDD** : Oxygen-Dependent Degradation Domain  
**OPN** : Ostéopontine  
  
**PAS** : Per-ARNT-Sim  
**PDGF** : Platelet-Derived Growth Factor  
**PGK** : PhosphoGlycerate Kinase  
**PF4** : Platelet Factor 4  
**PHD** : Prolyl-Hydroxylase  
**PI3K** : Phosphatidylinositol 3-Kinase  
**Pré-CFC** : Pré-Colony Forming Cell  
**Ptch1** : Patched1  
**Pten** : Phosphatase and Tension homolog deleted on chromosome tEN  
**PTH** : Hormone parathyroïde  
**pVHL** : protéine von-Hippel-Lindau  
  
**Rb** : protéine du Rétinoblastome  
**Rho123** : Rhodamine 123  
**ROS** : Reactive Oxygen Species  
**Runx1** : Runt-related transcription factor 1  
  
**SCF** : Stem Cell Factor  
**SCL** : Stem Cell Leukemia  
**SCID** : Severe Combined ImmunoDeficiency  
**SDF-1** : Stromal Derived Factor-1  
**Shh** : Sonic Hedgehog  
**Smo** : Smoothened  
**SNO** : Spindle-shaped N-cadherin<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> Osteoblastic  
**SOD1** : Super Oxyde Dismutase 1  
**SP** : Side Population  
**SRC** : SCID Repopulating Cell  
**ST-SRC** : Short-Term-SRC  
**STAT** : Signal Transducers and Activators of Transcription  
  
**SUMO** : Small Ubiquitin-related Modifier  
**Tel/Etv6** : Translocation Ets Leukemia / Ets variant gene 6  
**TGF- $\beta$**  : Transforming Growth Factor- $\beta$   
**TNF- $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$   
**TPO** : Thrombopoïétine  
  
**VLA** : Very Late Antigen  
  
**Wnt** : Wingless Integrase

# *Avant-propos*

*Situation générale de l'étude*

Ce travail de thèse s'insère dans une thématique générale d'étude des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les CSH, donnant naissance aux cellules sanguines matures, sont actuellement les cellules souches adultes multipotentes les mieux décrites et les plus caractérisées chez les mammifères. Comme toutes les cellules souches elles peuvent soit s'auto-renouveler, c'est-à-dire donner naissance à au moins une cellule fille présentant le même potentiel souche, soit produire des cellules matures hautement spécialisées. Leur potentiel de reconstitution hématopoïétique fait des CSH humaines une population cellulaire indispensable au développement de protocoles de recherche et à l'élaboration de thérapies (cellulaires et/ou géniques) et de greffes hématologiques. L'utilisation des CSH est limitée et parfois difficile du fait de leur très faible nombre en condition d'homéostasie. Un des enjeux actuels est d'amplifier ces cellules, sans induire leur différenciation, afin de préserver un potentiel souche indispensable à la reconstitution d'une hématopoïèse normale.

### **Contexte des travaux**

De nombreuses études tentent de caractériser et de reproduire le microenvironnement complexe des niches hématopoïétiques, afin de comprendre comment les paramètres qui le composent interviennent dans les processus d'auto-renouvellement, d'engagement ou de survie des CSH, mais également pour les reproduire *in vitro* dans des buts thérapeutiques. Dans cette optique, notre équipe s'intéresse depuis plusieurs années à un des paramètres importants dans le processus de maintien et d'amplification des CSH : la disponibilité en oxygène ( $O_2$ ) dans les cultures. En effet, les CSH les plus primitives sont localisées, en condition d'homéostasie, dans les niches hématopoïétiques où la concentration en  $O_2$  est beaucoup plus basse que la concentration d' $O_2$  atmosphérique. Une des conséquences principales de ce phénomène est de maintenir les cellules les plus primitives dans un état dit « quiescent », caractérisé par une très faible activité métabolique et un arrêt du cycle cellulaire dans une phase particulière, la phase  $G_0$ .

Actuellement, trois sources principales de CSH adultes normales sont utilisées en recherche clinique : la moëlle osseuse, le sang placentaire et le sang circulant de patients ou de donneurs sains soumis à un traitement pharmacologique induisant une migration des cellules souches et des progéniteurs de la moëlle osseuse vers le sang périphérique. Cependant, la disponibilité limitée de ces sources, les faibles quantités de CSH obtenues et les contraintes techniques et médicales de leur recueil représentent encore parfois un obstacle réel à leur utilisation thérapeutique. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à des cellules peu étudiées dans la littérature, mais présentant des fonctionnalités similaires : les CSH présentes dans le sang périphérique de donneurs sains, n'ayant été soumises au préalable à aucune mobilisation.

### **Objectifs de l'étude**

Ce travail vise trois objectifs à long terme :

- 1- Pallier aux difficultés d'approvisionnement en CSH adultes normales : le nombre de CSH présentes dans le sang périphérique en condition d'homéostasie étant plus faible encore que dans les trois sources précédemment citées, nous avons d'abord cherché à élaborer et à optimiser un protocole, simple et rapide, de récupération et de purification des CSH à partir de filtres de leucoréduction (« leukoreduction filters », LRF), qui représentent une source possible et abondante de CSH.
- 2- Développer des conditions de culture permettant la conservation *ex vivo*, sans congélation, de CSH humaines normales afin de pallier aux problèmes actuels de stockage de ces cellules par cryo-préservation.
- 3- Améliorer les techniques d'allo- et d'autogreffe à partir d'un unique échantillon cellulaire. Nous avons ainsi cherché à comprendre comment les basses concentrations d'O<sub>2</sub> et certaines combinaisons de cytokines interviennent dans le maintien des cellules les plus primitives.

### **Description des travaux**

La première phase a consisté en l'élaboration d'un protocole de récupération et de purification de CSH à partir des LRF. Les rendements et les taux de pureté de cellules - isolées sur la base de l'expression d'un antigène spécifique, le CD34 - nous ont permis de poursuivre nos travaux. Leur caractérisation a montré qu'elles présentaient les mêmes propriétés fonctionnelles et phénotypiques que celles issues des sources précédemment citées. Ces cellules représentent donc un bon modèle d'étude en recherche fondamentale et surtout une cible potentielle pour des travaux de recherche clinique à but thérapeutique. Les LRF, quotidiennement éliminés par les Etablissement Français du Sang (EFS) après la préparation de concentrés érythrocytaires, pourraient ainsi représenter une solution aux facteurs limitants d'approvisionnement et de récupération de CSH adultes normales.

La seconde phase a nécessité la réalisation de cultures cellulaires à 0,1% d'O<sub>2</sub>, concentration proche de celle observée dans les niches de la moelle osseuse. Afin d'établir des conditions permettant un maintien optimal des cellules primitives, différents ajouts cytokiniques ont été testés afin d'évaluer leur influence sur les mécanismes de survie. Des tests fonctionnels et phénotypiques nous ont permis de caractériser une population ne se divisant pas ou faiblement, ne s'engageant pas dans le processus de différenciation et conservant une capacité souche.

### **Organisation du manuscrit**

Les notions de cellules souches, d'hématopoïèse, de cellules souches hématopoïétiques ainsi que leur identification antigénique et fonctionnelle, seront présentées dans la première partie de l'introduction. Une deuxième partie sera consacrée aux régulations intrinsèques et extrinsèques des CSH et notamment à l'importance du microenvironnement médullaire. La dernière partie de l'introduction traitera du rôle des basses concentrations d'O<sub>2</sub>, de

leurs mécanismes d'action jusqu'à leur influence sur les cellules hématopoïétiques les plus primitives, ainsi que de l'importance du métabolisme oxydatif et énergétique.

Dans la section suivante, je présenterai et discuterai les résultats des trois projets complémentaires de ma thèse : tout d'abord, ceux concernant le développement et l'optimisation de la technique de purification de cellules CD34<sup>+</sup> à partir des LRF, sous la forme d'un article technique publié dans *Transfusion* en 2010 ; puis, les résultats liés à l'influence des basses concentrations en O<sub>2</sub> sur les populations primitives normales, sous la forme d'un manuscrit en préparation ; enfin, les résultats des travaux réalisés à Florence (Italie), dans le cadre d'un stage de 6 mois au sein du Dipartimento di Patologia e Oncologia Sperimentali, traitant de la quiescence des cellules souches leucémiques (CSL) abordée sur une lignée leucémique humaine, la K562.

Pour finir, une réflexion générale reprendra les résultats majeurs de ces travaux, replacera les données obtenues dans le contexte scientifique actuel, relatif à l'expansion des CSH humaines et aux conditions de culture à basse concentration d'O<sub>2</sub> et présentera les perspectives sélectionnées par notre équipe concernant la poursuite de ces travaux.

# *Introduction*



# **I- Les cellules souches hématopoïétiques**

## **I.1- Notion de cellules souches**

### **I.1.1- Caractéristiques fondamentales**

Les cellules souches sont définies par trois caractéristiques spécifiques qui les différencient des autres cellules de l'organisme. Elles présentent 1- une capacité à s'auto-renouveler, c'est-à-dire à donner naissance à au moins une cellule fille présentant ce même potentiel souche, 2- une capacité à se différencier, afin de produire différents types cellulaires hautement spécialisés et 3- une capacité fonctionnelle à reconstituer un tissu *in vivo* (Siminovitch, 1963). La balance entre ces deux processus d'auto-renouvellement et d'engagement doit être strictement régulée afin d'éviter toute variation aberrante, en terme de croissance cellulaire et/ou tissulaire (Simons, 2011).

### **I.1.2- Potentiel de différenciation**

Les cellules souches possèdent une capacité à se différencier particulière selon leur degré d'engagement (**Figure 1**). Il est ainsi possible de définir schématiquement quatre catégories de cellules en fonction de leur potentiel de différenciation :

- les cellules souches **totipotentes**, assurant le développement de l'organisme dans sa totalité. Ces cellules sont capables de se différencier dans tous les types cellulaires de l'organisme, y compris les tissus extra-embryonnaires indispensables au développement de l'embryon. Cette capacité est restreinte à l'ovule fécondé et aux cellules issues des premières divisions de cet œuf jusqu'au quatrième jour (morula de 8 à 32 cellules) (Denker, 2006 ; Seydoux, 2006).

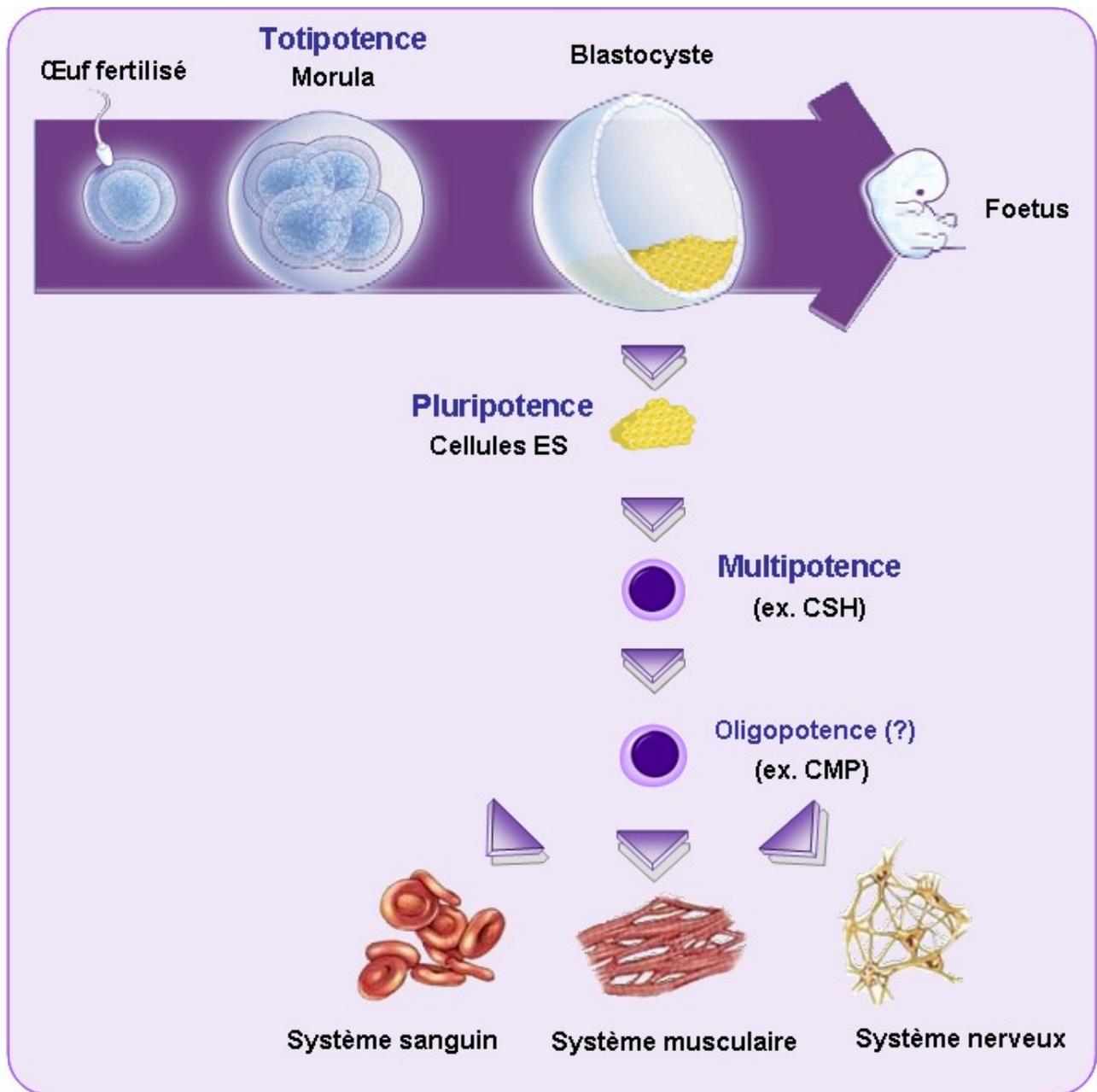


Figure 1 : Potentiels de différenciation des cellules souches

Les cellules totipotentes, issues d'un ovule fécondé, sont les seules capables de donner naissance à un individu complet. Les cellules pluripotentes, capables de générer tous les tissus de cet individu, donnent par divisions successives les cellules multipotentes (exemple des CSH), à l'origine de plusieurs types cellulaires d'un même tissu. L'hypothèse de l'existence de cellules oligopotentes (exemple des CMP) est également figurée.

- Les cellules souches embryonnaires, communément appelées cellules ES (Embryonic Stem cells), issues de la masse interne du blastocyste et capables de générer tous les tissus d'un individu y compris les cellules germinales (Evans, 1981 ; Thomson, 1998). Elles acquièrent progressivement des spécificités tissulaires et limitent leur potentiel de prolifération et leur diversité de différenciation. Elles ne peuvent cependant pas être à l'origine d'un organisme entier, par perte de leur capacité d'organisation des régions embryonnaires, et sont dites **pluripotentes**.

- Les cellules souches **multipotentes**, trouvées chez l'embryon, le fœtus et l'adulte, sont engagées vers un type tissulaire spécifique et sont à l'origine de plusieurs types cellulaires distincts (Shantly, 2006). Elles peuvent reconstituer à long terme un tissu normal et complet et sont spécialisées dans le maintien de l'intégrité tissulaire. C'est notamment le cas des cellules souches hématopoïétiques (CSH).

- Selon certains, il existerait des cellules souches dites **oligopotentes** à l'origine de types cellulaires plus restreints encore. Ces cellules, représentées par certains progéniteurs dont les potentialités ne sont pas encore totalement limitées, pourraient reconstituer un tissu normal, mais uniquement à court terme. Les progéniteurs myéloïdes communs (CMP), retrouvés lors de la différenciation hématopoïétique, appartiendraient à cette classe de cellules.

### **I.1.3- Cas particulier des cellules souches adultes**

#### *I.1.3.a- Historique de la découverte*

Les recherches sur les cellules souches adultes ont débuté dans les années 1950, lorsque des chercheurs ont mis en évidence, dans le sang périphérique, des cellules hématopoïétiques multipotentes capables de reconstituer une hématopoïèse normale (Brecher, 1951).

Quelques années plus tard, Till et McCulloch introduisent la notion de **CSH**. Ils la présentent comme une cellule très primitive à l'origine de n'importe quelle cellule

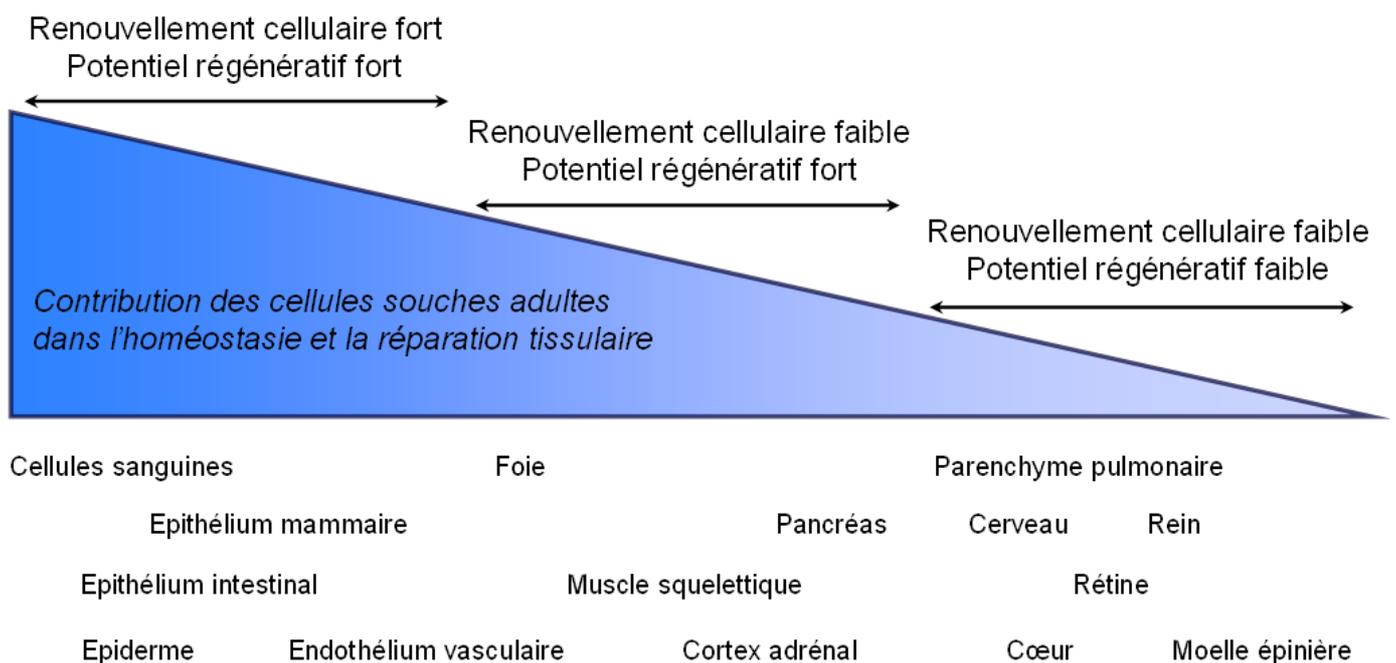


Figure 2 : Hétérogénéité des cellules souches adultes dans l'homéostasie et la réparation tissulaire

Les tissus peuvent être classés en trois catégories : les tissus à fort renouvellement cellulaire (sang, peau, intestin), présentant un large compartiment de cellules souches et possédant un potentiel régénératif fort ; les tissus à renouvellement cellulaire faible, mais à haut potentiel régénératif et les tissus à faible renouvellement cellulaire et faible potentiel régénératif, présentant des cellules souches capables de réparation limitée uniquement.

Adapté d'après Rando, 2006.

hématopoïétique (McCulloch, 1960 ; Till, 1961). Lors de leurs travaux, ils observent la formation de nodules spléniques au bout de 10 jours, suite à l'injection de cellules de moelle osseuse de souris saines à des souris irradiées de manière létale. Ces nodules nommés alors « Colony Forming Unit-Spleen » (CFU-S), ont révélé après examen histologique être composés de cellules hématopoïétiques différenciées ou en cours de différenciation et de même origine clonale (Becker, 1963). Des travaux plus tardifs ont cependant révélé que les CFU-S correspondaient, non pas à des CSH, mais plutôt à des progéniteurs primitifs (Siminovitch, 1963 ; Till, 1964 ; Metcalf, 1970).

Ultérieurement, des cellules souches ont été découvertes pour les autres tissus de l'organisme, dont certaines, telles que les cellules souches mésenchymateuses (CSM), sont capables de régénérer plusieurs types tissulaires chez l'adulte (Friedenstein, 1974).

### *1.1.3.b- Hétérogénéité tissu-dépendante*

Les cellules souches adultes assurent l'homéostasie des tissus. En effet, elles permettent de conserver un nombre constant de cellules différenciées en réponse à un besoin physiologique (renouvellement des cellules mortes, réponse à un stimulus exogène) ou à une agression tissulaire. Les cellules souches sont donc capables de générer des cellules de morphologie et de fonctions très variées tout en conservant une capacité à proliférer. Elles forment une entité hétérogène et, selon les cas, elles ne présentent pas le même potentiel de différenciation et de régénération tissulaire (Rando, 2006) (**Figure 2**).

Les cellules souches adultes, malgré leur rareté et leur difficulté à être purifiées, restent des cellules facilement récupérables en comparaison avec les autres types de cellules souches. Ainsi, seules les stratégies thérapeutiques de transplantation utilisant les cellules souches adultes sont développées actuellement et notamment celles utilisant les CSH ou les CSM.

## **I.2. L'hématopoïèse**

### **I.2.1. Présentation générale**

L'hématopoïèse - du grec *haímatos* «du sang» et *poiésis* «création» - caractérise l'ensemble des mécanismes de divisions multiples et de différenciations progressives qui concourent, tout au long de la vie d'un individu, à la production continue et régulée des cellules sanguines matures fonctionnelles : les érythrocytes (hématies ou globules rouges), les plaquettes et les leucocytes (globules blancs). Le système hématopoïétique permet ainsi de générer des cellules qui donneront naissance à toutes les lignées de cellules sanguines (Akashi, 2000 ; Orkin, 2000). Schématiquement, les cellules sanguines sont classées en deux catégories : les **cellules lymphoïdes** (lymphocytes B, T et natural killer) et les **cellules myéloïdes** (érythrocytes, mégacaryocytes, granulocytes et lymphocytes) (Akashi, 2000 ; Kondo, 2000).

Les cellules matures du sang présentent une **durée de vie limitée** : une production continue tout au long de la vie de l'individu est donc essentielle. L'hématopoïèse assure ainsi une production quantitativement très importante, estimée à  $10^{12}$  cellules par jour - à savoir  $2 \cdot 10^{11}$  érythrocytes,  $4 \cdot 10^{11}$  plaquettes et  $10^{10}$  leucocytes. Cette production est étroitement régulée de manière à maintenir constant le nombre de cellules sanguines en condition d'homéostasie et afin de répondre à des variations quantitativement importantes lors d'agressions extérieures (chimiothérapie, hémorragie, infection). Cette régulation repose sur des mécanismes fins et complexes qui seront abordés dans la prochaine section. Des dysfonctionnements de l'hématopoïèse conduisent au développement de pathologies avec chute du nombre de cellules sanguines (anémie, agranulocytose, aplasie médullaire) ou production excessive dérégulée de celles-ci (leucémie, lymphome).

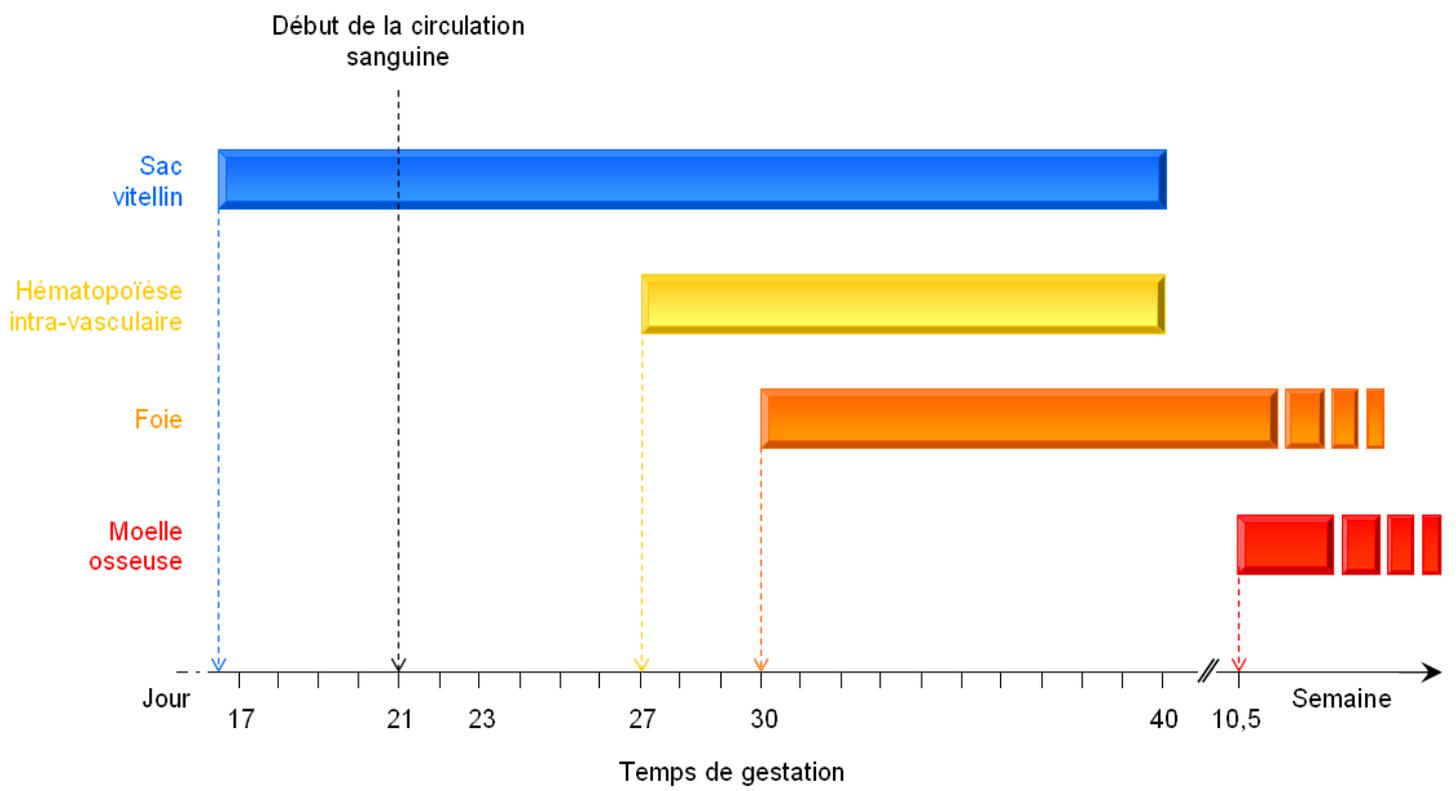


Figure 3 : Ontogenèse de l'hématopoïèse humaine

### **I.2.2. Ontogenèse du tissu hématopoïétique**

Contrairement à Aristote qui, dans son traité « Partie des animaux » (350 av JC), avait anticipé la présence des cellules à l'origine de l'hématopoïèse dans le cœur, l'organe hématopoïétique majeur pendant toute la vie adulte est la moelle osseuse. Cependant, durant les premiers stades du développement des vertébrés, les sites anatomiques où se déroule l'hématopoïèse ne sont pas fixes (Auerbach, 1996 ; Zon, 1995).

Les premières cellules sanguines observées chez l'embryon sont des **érythrocytes primitifs**, retrouvés dans le mésoderme ventral extra-embryonnaire du sac vitellin (Moore, 1970). Ils sont à l'origine de l'hématopoïèse primitive ou embryonnaire. Retrouvés associés aux premières cellules vasculaires, les érythrocytes primitifs sont regroupés sous forme d'îlots sanguins (Orkin, 2000). La formation de ces cellules sanguines embryonnaires coïncidant de manière spatiale et temporelle avec la vasculogenèse, ainsi que l'existence de certains marqueurs communs entre ces cellules, ont fait naître l'hypothèse de l'existence d'un progéniteur primitif commun : l'hémangioblaste (Pardanaud, 1989 ; Jaffredo, 1998 ; Pardanaud, 1999). Durant l'embryogenèse humaine, cette hématopoïèse primitive siège dans le sac vitellin à partir du 16<sup>ème</sup> jour jusqu'à la 6<sup>ème</sup> semaine de gestation (Tavian, 2005) (**Figure 3**). Les érythrocytes primitifs, circulant dans l'embryon, approvisionnent en oxygène les tissus en développement (Marshall, 2001) et disparaissent au cours des stades suivants de l'embryogenèse (Tavian, 2001). Une étude récente met cependant en évidence la persistance de ces cellules plus de 12 mois après la naissance et leur capacité à générer une descendance significative dans le sang périphérique (Samokhvalov, 2007). Ces résultats font ainsi de l'origine des CSH retrouvées chez l'adulte un sujet controversé.

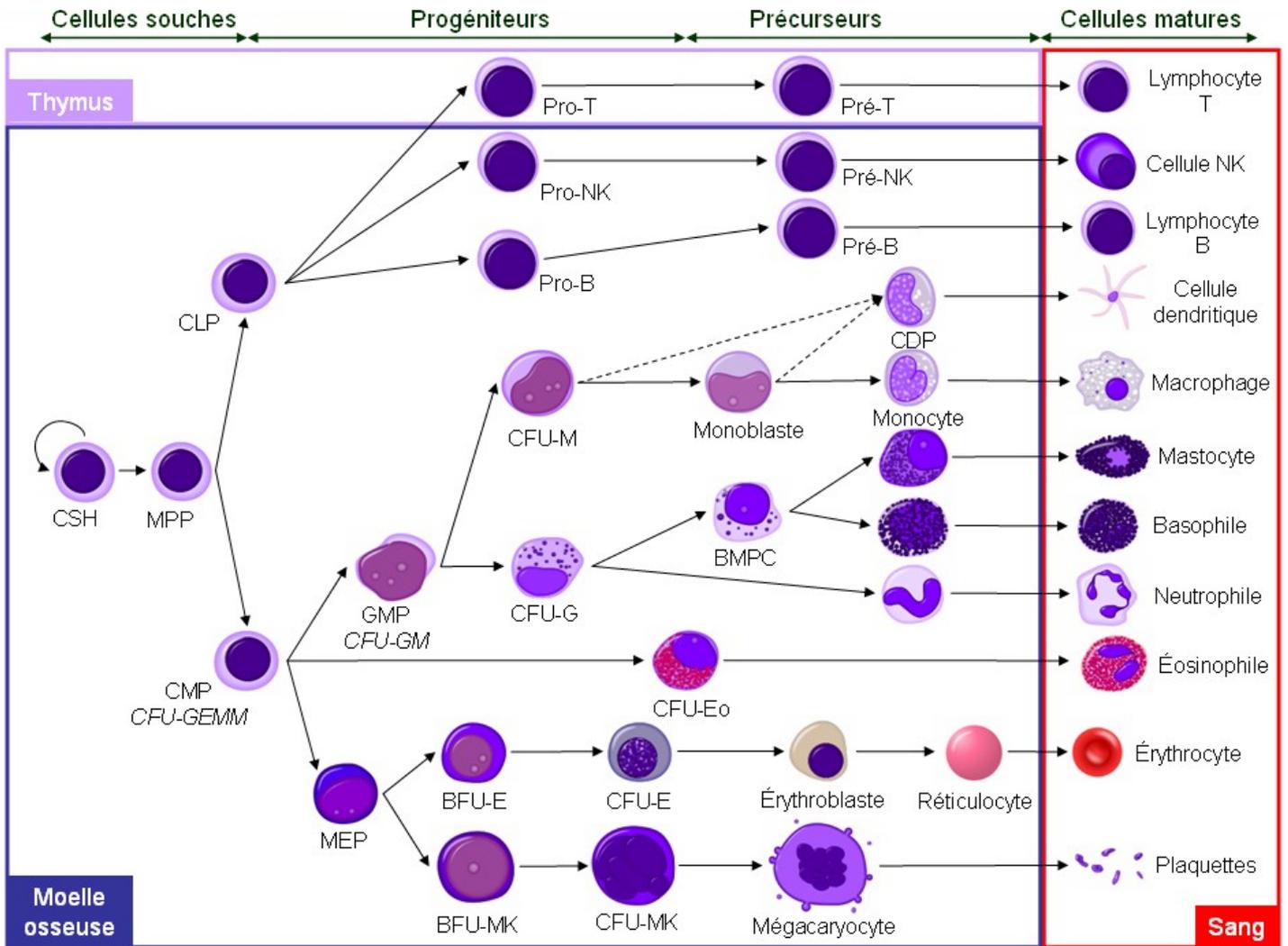


Figure 4 : Représentation schématique des compartiments hématopoïétiques

**CSH** : Cellule souche hématopoïétique ; **MPP** : Progéniteur multipotent ; **CLP** : Progéniteur lymphoïde commun ; **CMP** : Progéniteur myéloïde commun ; **MEP** : Progéniteur érythro-mégacaryocytaire ; **GMP** : Progéniteur granulo-macrophagique ; **BMPC** : Progéniteur basophile-mastocytaire ; **CDP** : Progéniteur dendritique commun.

Indépendamment de cette hématopoïèse primitive, une seconde vague hématopoïétique, d'origine intra-embryonnaire cette fois, émerge au niveau de la **région aorte-gonade-mésonéphros** (AGM) dès le 27<sup>ème</sup> jour de gestation. Elle est à l'origine de l'hématopoïèse définitive ou adulte (Godin, 1993 ; Medvinsky, 1993 ; Dzierzak, 1995 ; Tavian, 1999). Les CSH dérivées de l'AGM sont les premières CSH multipotentes définitives. Elles migrent vers le foie fœtal à partir du 30<sup>ème</sup> jour de gestation, puis dans la moelle osseuse (Tavian, 2005), qui devient le site hématopoïétique définitif : d'abord dans tous les os de l'organisme, pour se restreindre finalement aux os plats (sternum, côtes, vertèbres, os iliaques et sacrum), vers l'âge de 5 ans.

### **I.2.3. Organisation du tissu hématopoïétique**

De façon schématique, les cellules du système hématopoïétique peuvent être séparées en **quatre compartiments** au sein d'un système hiérarchisé complexe et pyramidal (**Figure 4**). Ces compartiments hétérogènes renferment un continuum de cellules en cours de maturation. La transition entre les CSH très immatures et les cellules matures circulantes se fait par des processus progressifs d'engagement vers une voie unique de différenciation. Tout au long de ces étapes, la cellule acquiert de façon irréversible des caractéristiques spécifiques de sa lignée et perd, en fin de différenciation, sa capacité de prolifération.

#### *I.2.3.a- Les CSH*

Chez l'adulte, les CSH sont principalement localisées dans la moelle osseuse, où elles ne représentent que 0,005 à 0,01% de la population cellulaire totale (Sutherland, 1990). Elles sont aussi retrouvées dans le sang périphérique (Brecher, 1951 ; Kessinger, 1986), à une concentration d'environ 0,001% de la population cellulaire totale.

Ces cellules multipotentes, non identifiables morphologiquement, sont donc très minoritaires physiologiquement. Les CSH sont les seules cellules capables de régénérer,

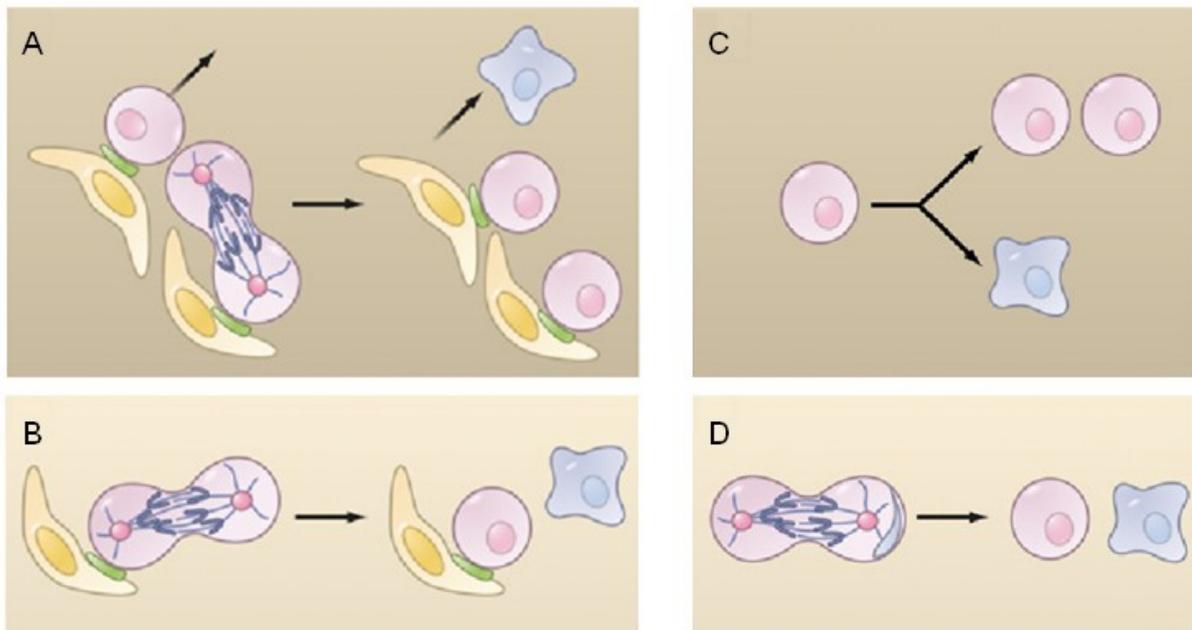


Figure 5 : Modèles de division et d'engagement en différenciation des CSH

**A** : Théorie stochastique, **B** : Théorie déterministe, **C** : Théorie des divisions asymétriques, **D** : Théorie des divisions symétriques.

D'après Simons, 2011.

*in vivo* et à long terme, l'ensemble des lignées lymphoïdes et myéloïdes lors de greffes primaires et secondaires. Cette caractéristique fonctionnelle définit au sens strict les CSH.

Le maintien d'un nombre constant de CSH est indispensable au maintien d'une hématopoïèse normale tout au long de la vie d'un individu. Ce réservoir est régulé par **trois équilibres fondamentaux** entre : survie ou apoptose, prolifération ou quiescence, différenciation ou auto-renouvellement. Des travaux ont en effet montré que la majorité des CSH est hors du cycle cellulaire, dans une phase caractéristique appelée  $G_0$  ou phase de **quiescence** et présente un état de prolifération lente ou « low cycling » (Orford, 2008) . Cet état de dormance les protège des agressions extérieures : radiations, agents chimiothérapeutiques (Lerner, 1990 ; Mauch, 1995). Le maintien de leur intégrité génomique est également préservé par un nombre limité de divisions, une forte activité télomérase et des systèmes de réparations de l'ADN hautement spécialisés (Morrison, 1996). Plusieurs théories existent quant à l'équilibre entre auto-renouvellement et engagement en différenciation des CSH (Simons, 2011) (**Figure 5**) :

- La théorie stochastique selon laquelle la différenciation hématopoïétique se fait de manière aléatoire et autonome, le microenvironnement agissant en aval sur la sélection (Bailey, 1964 ; Ogawa, 1993).

- La théorie déterministe, selon laquelle la différenciation hématopoïétique est contrôlée par le microenvironnement des CSH, aussi bien par des facteurs anatomiques (interactions avec d'autres types cellulaires ou avec la matrice extracellulaire) qu'humoraux (facteurs de croissance) (Van Zant, 1979 ; Daniel, 1989).

- la théorie des divisions asymétriques, selon laquelle une cellule mère après division donne naissance à une CSH et à une cellule engagée en différenciation.

- La théorie des divisions symétriques, selon laquelle deux cellules filles ont le même devenir : rester CSH ou s'engager.

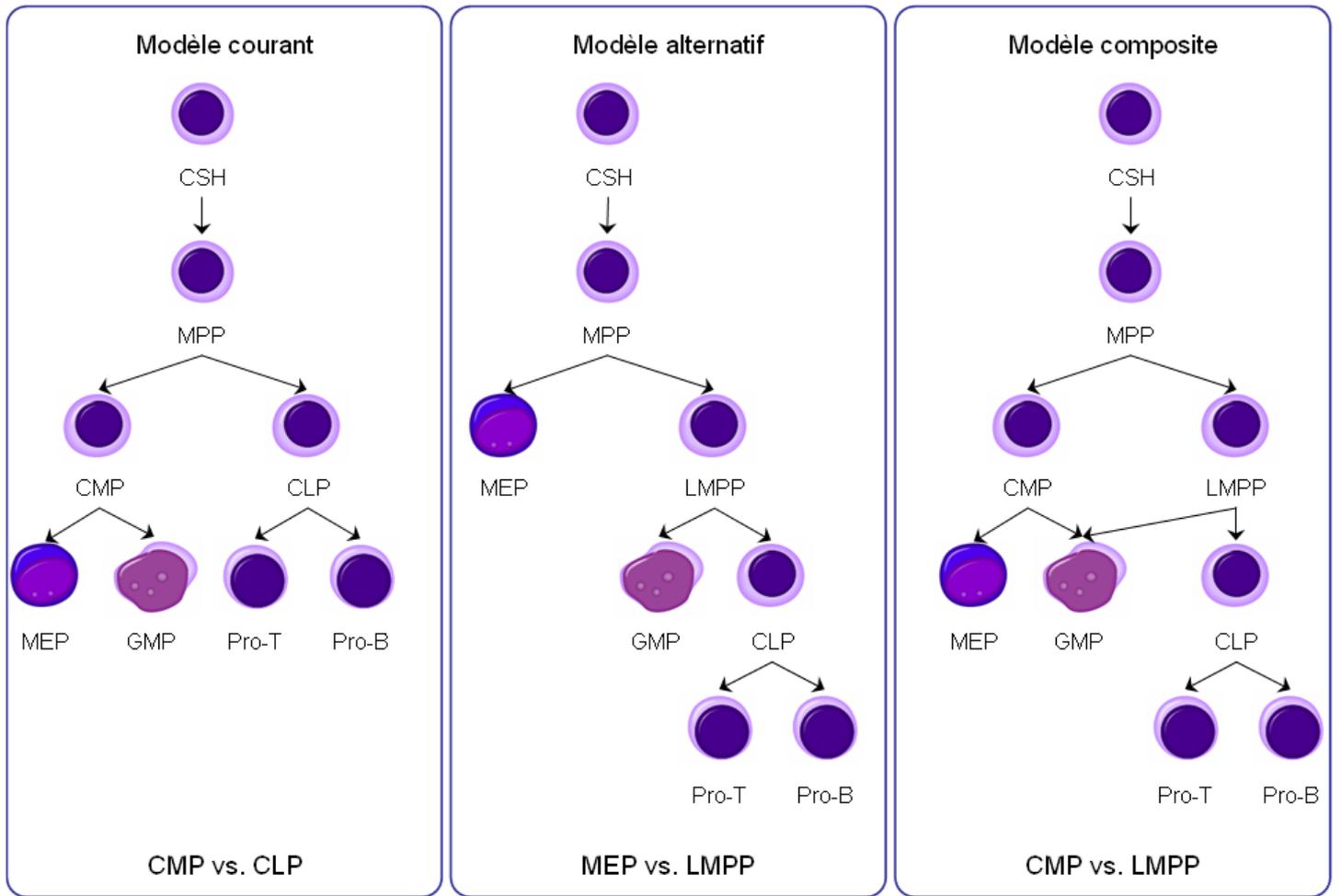


Figure 6 : Modèles d'engagement des MPP

Physiologiquement, il est probable que certains éléments de chaque théorie soient associés ; notamment l'existence de divisions asymétriques « déterminées » pour les CSH au sein de zones spécifiques de la moelle osseuse.

### *1.2.3.b- Les progéniteurs*

Le compartiment des progéniteurs hématopoïétiques est issu de la prolifération et de la différenciation des CSH. Egaleme nt non identifiables morphologiquement, les progéniteurs ont perdu la capacité de s'auto-renouveler et possèdent une forte capacité de différenciation.

On distingue plusieurs types de progéniteurs : des progéniteurs multipotents immatures (**MPP**) possédant une capacité de prolifération accrue et des progéniteurs plus matures, lymphoïdes (**CLP**) ou myéloïdes (**CMP**), présentant un potentiel de prolifération limité. Les CLP donneront par différenciation des progéniteurs B, T et NK. De la même manière, les CMP donneront soit des progéniteurs érythroïdes (**BFU-E**, puis **CFU-E**), soit des progéniteurs granulo-macrophagiques (**CFU-GM**) eux-mêmes à l'origine des progéniteurs granuleux (**CFU-G**) et macrophagiques (**CFU-M**) (Akashi, 2000). Ces progéniteurs tardifs sont engagés vers un seul type cellulaire.

Récemment, le modèle courant de hiérarchie hématopoïétique, consistant en une dichotomie des CMP et CLP, a été remis en cause par la découverte d'un progéniteur nommé LMPP (Lymphoid-Primed Multipotent Progenitor) (Adolfsson, 2005). Il pourrait donner naissance aux cellules lymphoïdes monocytaires et granulocytaires, mais ne présenterait pas de potentiel d'engagement vers les cellules érythroïdes et mégacaryocytaires. Sa découverte a permis d'établir plusieurs modèles d'engagement (**Figure 6**). Là encore, ces théories basées essentiellement sur des travaux *in vitro* ne reflètent probablement que partiellement la réalité.

*1.2.3.c- Les précurseurs*

Contrairement aux CSH et aux progéniteurs, les précurseurs sont identifiables morphologiquement sur myélogramme ou coupes de biopsie ostéo-médullaire. Ils sont irréversiblement engagés dans une seule lignée cellulaire et présentent une capacité proliférative limitée à quelques divisions. Les étapes de maturation des précurseurs s'accompagnent de modifications morphologiques communes à tous les lignages (diminution de la taille cellulaire et du rapport nucléo-cytoplasmique, condensation de la chromatine) ou spécifiques de l'un d'eux. Les cellules acquièrent également l'équipement biochimique et métabolique, membranaire et cytoplasmique leur permettant d'assurer leurs fonctions propres (Wheater, 2001).

*1.2.3.d- Les cellules matures*

Egalement identifiables morphologiquement, ces cellules passent dans le sang par un phénomène de transmigration endothéliale et certaines migrent encore jusqu'à certains tissus spécifiques. Les cellules matures, incapables de se diviser et présentant une durée de vie limitée, possèdent chacune une fonction spécifique : les érythrocytes assurent le transport des gaz du sang, les polynucléaires (neutrophiles, éosinophiles, basophiles, monocytes/macrophages) entrent en jeu dans la réponse immunitaire non spécifique, les lymphocytes (B, T, NK) interviennent dans l'immunité acquise et les plaquettes régulent l'hémostase.

Les cellules des différents compartiments sont soumises à une régulation complexe qui détermine leur devenir (prolifération/différenciation) et le choix de la voie d'engagement. Une alternative est la mort cellulaire, ou apoptose, qui constitue aussi un mode de régulation. Le micro-environnement des cellules joue, à chaque étape de leur différenciation, un rôle majeur dans ce choix. Toutes les étapes initiales communes de différenciation se déroulent dans la moelle osseuse, mais certains progéniteurs migrent relativement tôt dans des organes périphériques afin de poursuivre leur différenciation.

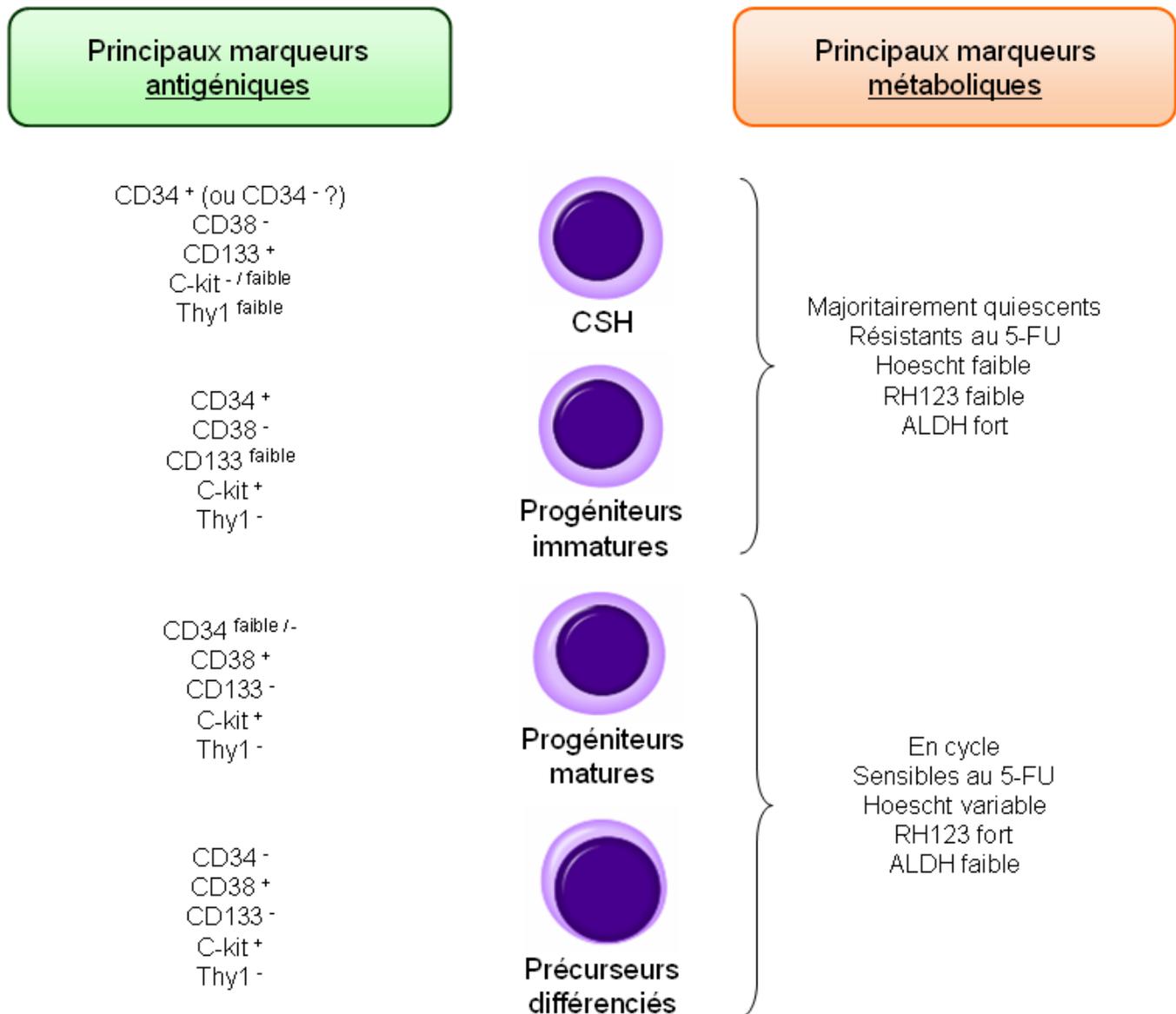


Figure 7 : Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules hématopoïétiques primitives humaines

#### **I.2.4. Identification des CSH**

Aucun marqueur membranaire spécifique des CSH n'a été identifié à ce jour. Les CSH appartiennent à des populations hématopoïétiques primitives définies soit phénotypiquement par la présence et/ou l'absence de certains marqueurs, soit fonctionnellement par leurs propriétés métaboliques. Malgré un possible enrichissement important en CSH, une purification homogène de ces cellules demeure actuellement impossible. Leur identification ne peut se faire qu'*a posteriori* par des tests fonctionnels d'analyse de leur descendance.

##### *I.2.4.a- Caractéristiques phénotypiques des CSH*

Les méthodes d'isolement des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques reposent majoritairement sur la détection d'antigènes de surface via des anticorps monoclonaux couplés soit à des billes magnétiques (séparation sur colonnes immuno-magnétiques), soit à des molécules fluorescentes (séparation par cytométrie de flux et tri cellulaire). Ces techniques font intervenir des molécules présentes à la surface des cellules et nommées antigènes de différenciation (ou **CD** pour « Clusters of Differentiation »). Le modèle murin étant couramment utilisé pour l'étude de l'hématopoïèse, de nombreux marqueurs de surface ont notamment été décrits pour cette espèce. Bien que nombre d'entre eux soient communs avec les cellules humaines, de grandes différences existent. Dans ce chapitre seront traités uniquement les marqueurs membranaires humains les plus caractéristiques (**Figure 7**).

Le marqueur le plus couramment utilisé pour l'isolement de populations hématopoïétiques primitives humaines est le **CD34**. Découverte il y a plus de 25 ans (Civin, 1984), cette sialomucine membranaire semble être impliquée dans l'adhérence des cellules primitives (Drew, 2005). Elle est exprimée sur les CSH mais également sur les progéniteurs hématopoïétiques (DiGiusto, 1994 ; Sutherland, 1989) et elle définit une population contenant des cellules capables de reconstituer une hématopoïèse normale chez un receveur

irradié de manière létale (Berenson, 1988). Les populations de cellules CD34<sup>+</sup> représentent une population enrichie en CSH ; cependant, ce marqueur seul est insuffisant à les isoler de manière homogène. Certaines études suggèrent l'existence, chez l'homme, d'une population de cellules souches CD34<sup>-</sup> à l'origine des cellules CD34<sup>+</sup> (Bhatia, 1998 ; Zanjani, 1998 ; Engelhardt, 2002). L'expression du CD34 pourrait être réversible dans les CSH humaines : des cellules CD34<sup>+</sup> ont été décrites comme capables de générer *in vivo* des cellules CD34<sup>-</sup>, elles-mêmes capables de générer des cellules CD34<sup>+</sup> après une greffe secondaire (Dao, 2003).

A ce premier antigène peut être associé l'antigène **CD38**. Etant considéré comme un marqueur de différenciation, les CSH sont retrouvées dans la population CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> (Bhatia, 1997a ; Novelli 1998 ; Ishikawa, 2003). Tout comme le CD34, l'expression du CD38 est réversible et dépend de l'état d'activation des cellules. A ces deux marqueurs principaux s'ajoutent également le **CD133** (ou AC133), exprimé sur les cellules hématopoïétiques primitives humaines et disparaissant lors de la différenciation (Yin, 1997), le **CD90** (ou Thy1) et le **CD117** (ou c-kit), tous deux exprimés faiblement par les cellules primitives.

Les marqueurs phénotypiques ne donnent finalement qu'un reflet de la population de CSH réellement présente et les données montrent bien la difficulté actuelle à identifier *ex vivo* les CSH, en partie du fait de la variabilité partielle d'expression des antigènes membranaires et de l'influence des conditions environnementales. Bien que l'utilisation couplée de plusieurs marqueurs et l'étude de nouvelles combinaisons possibles permettent d'augmenter l'enrichissement en cellules souches, elles en éliminent en parallèle un faible pourcentage.

#### *1.2.4.b- Caractéristiques fonctionnelles des CSH*

Les CSH sont essentiellement **quiescentes** : 85 à 90% des CSH de la moelle osseuse sont en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Fleming, 1993 ; Yamaguchi, 1998), ainsi que la quasi-totalité des CSH présentes dans le sang périphérique après mobilisation (Uchida, 1997). Des drogues

cytotoxiques, comme le **5-FU** (5-Fluoro-Uracile), permettent la déplétion des cellules en cycle et l'enrichissement en cellules primitives : les cellules résistantes au 5-FU représentent ainsi une population de CSH et de progéniteurs très immatures (Berardi, 1995).

Une autre caractéristique des populations hématopoïétiques primitives concerne la présence de pompes à efflux transmembranaires leur conférant la capacité d'expulser certains colorants vitaux. Cette caractéristique peut être utilisée pour révéler ces populations. Les cellules excluant le colorant vital **Hoechst 33342**, un marqueur fluorescent se liant à l'ADN et à l'ARN, représentent une population cellulaire distincte appelée « Side Population » (**SP**). La corrélation de cette population avec les marqueurs phénotypiques est variable : dans la moelle osseuse, la population SP contient majoritairement des cellules CD34<sup>-</sup>, alors que dans le sang de cordon la population SP contient à la fois des cellules CD34<sup>+</sup> et CD34<sup>-</sup> (Cheung, 2006). La Rhodamine 123 (**Rho123**), un deuxième colorant vital se fixant spécifiquement à la membrane des mitochondries, peut être utilisé. Les populations enrichies en CSH, pauvres en mitochondries, présentent des taux faibles de Rho123 (Rho123<sup>faible</sup>) (Bertoncello, 1985 ; Ploemacher, 1988 ; Ratajczak, 1998).

D'autres marqueurs métaboliques peuvent également être utilisés pour isoler des populations hématopoïétiques primitives : l'expression d'une enzyme spécifique, l'aldéhyde déshydrogénase (**ALDH**), présente dans les CSH et les progéniteurs (Sharkis, 1997), corrèle avec le potentiel de reconstitution hématopoïétique (Hess, 2004).

De la même manière que pour les marqueurs phénotypiques, aucune de ces caractéristiques métaboliques ou fonctionnelles ne permet actuellement d'isoler une population homogène de CSH. En parallèle de ces différents marqueurs, des tests fonctionnels ont été développés et sont couramment employés pour caractériser les populations hématopoïétiques immatures.

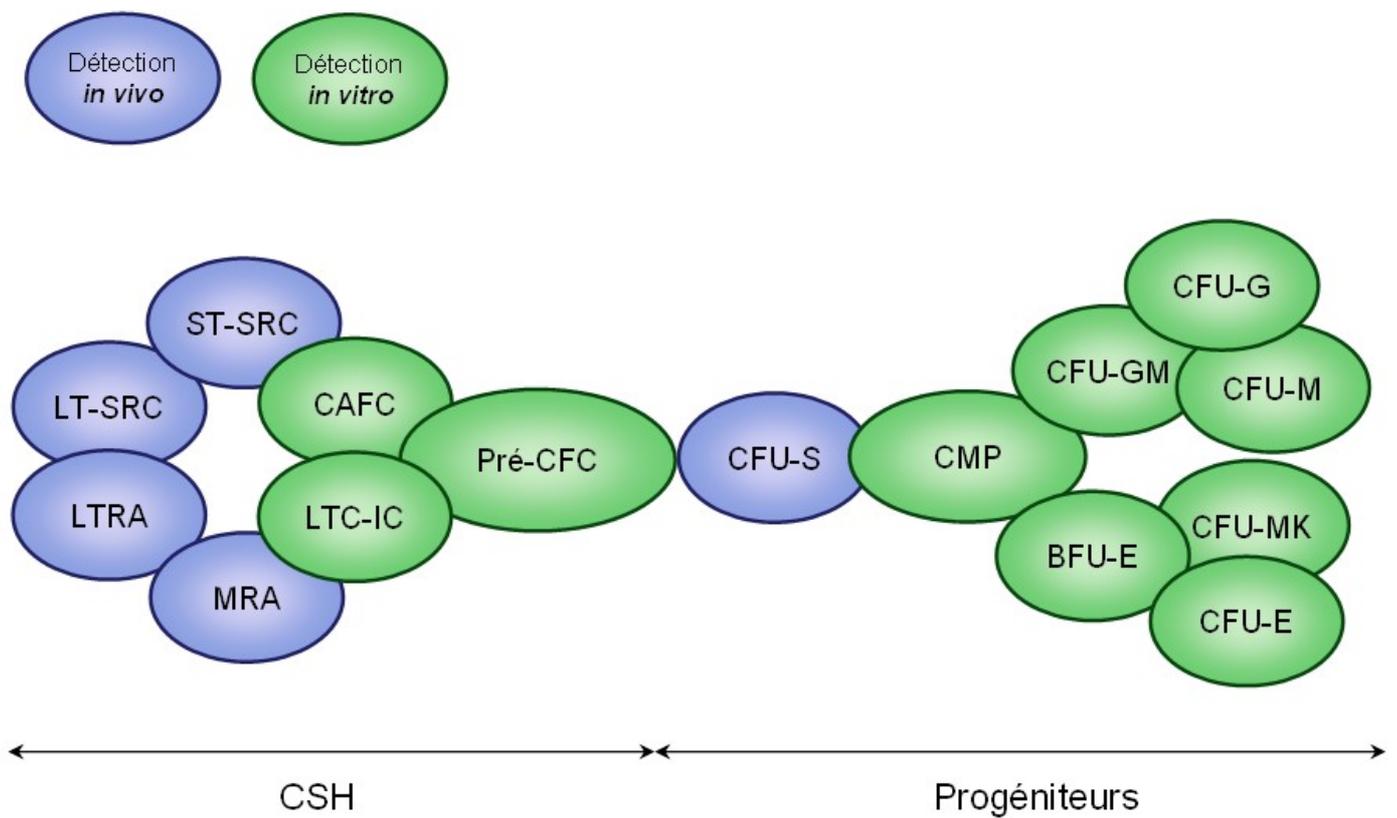


Figure 8 : Hiérarchie des CSH et des progéniteurs en fonction des méthodes de détection utilisées

Adapté d'après Brunet de la Grange, 2004 et Guitart, 2009.

*1.2.4.c- Tests fonctionnels*

Ces tests, spécifiques des cellules hématopoïétiques primitives, évaluent leurs propriétés de prolifération et de pluripotence. Bien que lourds à réaliser, ils permettent d'estimer la fréquence de ces cellules dans différentes fractions cellulaires et reposent sur l'étude *a posteriori* de leur descendance, suite à leur prolifération et à leur différenciation. Deux approches sont envisagées : une approche *in vitro*, reposant sur la culture des cellules en milieu liquide ou semi-solide et une approche *in vivo*, basée sur la capacité des cellules à reconstituer une hématopoïèse normale après injection à des animaux irradiés ou conditionnés via des traitements myélosuppressifs. Une hiérarchie des différentes sous-populations de CSH et de progéniteurs a pu ainsi être établie sur la base de ces tests fonctionnels (**Figure 8**). Bien qu'ils permettent de révéler et de quantifier indirectement les CSH, ces tests ne permettent pas une identification individuelle de ces cellules dans une population donnée, même restreinte.

**- Tests *in vivo* de reconstitution hématopoïétique à long terme**

Ces tests sont basés sur l'injection de cellules d'intérêt dans un modèle animal receveur, majoritairement murin. Ce sont les tests les plus adéquats pour l'analyse qualitative et quantitative du potentiel de prolifération et de différenciation des CSH. Ils permettent également d'étudier la migration des cellules hématopoïétiques et reposent sur l'évaluation de la production de cellules matures pendant une période relativement longue. Pour cela, les animaux sont préalablement irradiés ou conditionnés à l'aide de myélosuppresseurs, de manière létale ou sub-létale. Ceci permet de faciliter l'analyse de la capacité des cellules injectées à reconstituer une hématopoïèse normale chez le receveur. Deux modèles de transplantation sont essentiellement utilisés : le modèle syngénique (souris/souris principalement) et le modèle xénogénique (homme/souris).

Les **tests syngéniques** sont les premiers à avoir été développés. Ils reposent sur l'injection de cellules de moelle osseuse de souris à d'autres souris irradiées de même génotype. Les prélèvements des rates des animaux receveurs après 10 à 12 jours permettent de quantifier les nodules, ou colonies, visibles à la surface de l'organe. Chaque colonie, composée d'un ou plusieurs types cellulaires, est issue d'une unique cellule spécifique provenant de la moelle osseuse du donneur et est appelée **CFU-S** (Till, 1961). Ces cellules représentent une population hétérogène composée de cellules ayant un potentiel d'auto-renouvellement limité et de cellules plus primitives capables d'auto-renouvellement prolongé (Till, 1964 ; Ploemacher, 1989). D'autres tests, basés sur des greffes chimériques, utilisent des souris ne différant que par l'expression d'un haplotype de l'antigène CD45. Ils permettent de révéler des cellules présentant soit un potentiel **MRA** (pour « Marrow Repopulating Ability ») capables de reconstituer une hématopoïèse normale chez un premier receveur, soit un potentiel **LTRA** (pour « Long-Term Repopulating Ability ») et capables de reconstituer une hématopoïèse normale lors de greffes secondaires chez un nouveau receveur (Morrison, 1994). Ces deux populations se distinguent donc par un auto-renouvellement limité (MRA) ou prolongé (LTRA).

Les **tests xénogéniques** sont basés sur l'utilisation d'animaux immunodéficients capables de tolérer la greffe de cellules hématopoïétiques humaines sans rejet et ont fortement facilité l'étude expérimentale des CSH humaines. Le modèle murin **NOD/SCID** (pour « Non Obese Diabetic / Severe Combined ImmunoDeficiency ») est le modèle le plus couramment utilisé (Shultz, 1995). L'environnement médullaire de ces souris est adapté à la reconstitution myéloïde et lymphoïde B humaines (Pflumio, 1996). Cependant, le développement de cellules lymphoïdes T humaines est absent chez ces souris, du fait d'une activité résiduelle des cellules NK murines. De nouvelles souches, présentant des activités NK abolies et issues de souris de fond génétique NOD/SCID, ont donc été établies par invalidation de

gènes supplémentaires. Le modèle le plus caractéristique est le modèle de souris NOD/SCID/IL-2R $\gamma$ <sup>null</sup> ou **NOG** (Ito, 2002). Il permet une meilleure prise de greffe des cellules humaines et présente une durée de vie plus longue.

Concernant le protocole de transplantation, il nécessite l'injection de cellules hématopoïétiques humaines dans la circulation sanguine (intraveineuse) ou directement dans le fémur des animaux receveurs. Ceux-ci doivent préalablement être conditionnés de manière sub-létale, afin de réduire la cellularité médullaire et de faciliter l'implantation des cellules humaines. La prise de greffe est évaluée sur la proportion de cellules humaines détectées dans la moelle, le sang ou la rate des animaux (chimérisme), au minimum 6 à 7 semaines post-greffe (Lapidot, 1992). Il est généralement admis que les cellules injectées sont capables de reconstituer une hématopoïèse normale lorsque 0,1 à 1% des cellules isolées de la moelle osseuse des animaux receveurs sont d'origine humaine. Cette proportion peut varier jusqu'à 80%. Les cellules humaines sont identifiées sur la base de l'antigène CD45 humain et la propriété de multipotence, au sein de cette population, peut également être évaluée par analyse de marqueurs spécifiques des lignages hématopoïétiques capables de se différencier chez les animaux receveurs.

Les cellules humaines à l'origine d'une hématopoïèse lympho-myéloïde, après injection à des animaux receveurs immunodéficients, sont appelées **SRC** (pour « SCID Repopulating Cells »). Leur fréquence a été évaluée, par des tests de reconstitution en dilution limite, à 1 pour 10<sup>6</sup> cellules mononuclées, à 1 pour 10<sup>3</sup> cellules CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> de sang de cordon (Conneally, 1997), à 1 pour 3.10<sup>6</sup> cellules mononuclées de moelle osseuse et à 1 pour 6.10<sup>6</sup> cellules mononuclées après mobilisation (Wang, 1997). Des sous-populations présentant des potentiels de greffe différents sont retrouvées dans la population globale de cellules CD34<sup>+</sup> : les **ST-SRC** (pour « Short-Term-SRC »), capables de reconstituer une hématopoïèse pendant une durée limitée à quelques semaines et ne pouvant pas assurer une transplantation

secondaire (Hogan, 2002) et les **LT-SRC** (pour « Long-Term-SRC »), capables de reconstituer l'hématopoïèse d'un deuxième voire d'un troisième receveur (Guenechea, 2001).

Malgré les biais que ces tests *in vivo* introduisent (facteurs influençant la migration et la colonisation des niches hématopoïétiques, différenciation terminale incomplète, fiabilité de détection des cellules humaines), ils représentent actuellement les tests les plus performants et les seuls permettant de révéler la présence de CSH humaines.

### **- Tests *in vitro***

Ces tests consistent à favoriser la prolifération et la différenciation des cellules à identifier, jusqu'à un stade directement caractérisable. Le temps mis par ces cellules pour atteindre ce stade peut également renseigner sur leur primitivité.

Le premier test, réalisé dans un milieu semi-solide (généralement méthylcellulose), permet de révéler après culture des cellules capables de former des colonies ou **CFC** (pour « Colony Forming Cell »). Ces cellules correspondent à des progéniteurs (Bradley, 1966) et l'aspect de la colonie permet d'identifier la lignée hématopoïétique dans laquelle la cellule d'origine est engagée. Il est ainsi possible d'identifier différents progéniteurs : mégacaryocytaires (CFU-MK), BFU-E puis CFU-E, CFU-GM, ou encore CFU-G et CFU-M. Des colonies composées de plusieurs types cellulaires, issues de progéniteurs plus immatures (CMP), sont également identifiables. Le niveau de primitivité du progéniteur originel peut être évalué d'après les caractéristiques de la colonie : nombre de cellules, types cellulaires et temps de culture nécessaire. Une population en amont des CFC, appelée **pré-CFC**, peut être révélée par réalisation, en amont d'une étape de culture en milieu semi-solide, d'une étape de culture liquide favorisant leur prolifération avec différenciation en CFC.

Un second test permet de révéler une sous-population minoritaire de cellules possédant une capacité proliférative suffisante pour repeupler une culture liquide. Ces cellules, appelées

**CRC** (pour « Culture Repopulating Cell »), sont identifiées grâce à un système de cultures liquides en deux temps (Cipolleschi, 2000 ; Giuntoli, 2007) : une culture liquide primaire ( $LC_1$ ), permettant de comparer des conditions particulières, suivie d'une culture liquide secondaire ( $LC_2$ ), réalisée dans des conditions de culture identiques entre elles et permettant de révéler l'effet des traitements appliqués sur les CRC durant la  $LC_1$ . La primitivité des CRC peut être déterminée grâce aux cinétiques de repopulation au cours des  $LC_2$  successives.

Le dernier test, ou culture de Dexter, repose sur un système de culture à long terme de 5 semaines en milieu liquide en présence d'une couche de cellules nourricières (Dexter, 1977). Ce système a été adapté aux cellules hématopoïétiques humaines par utilisation de cellules stromales de moelle osseuse (Sutherland, 1989), puis de lignées stromales xénogéniques, essentiellement murines, dérivées de la moelle osseuse et du foie fœtal (Itoh, 1989 ; Sutherland, 1991 ; Moore, 1997). Ces cellules permettent de recréer un microenvironnement médullaire, via l'expression ou la sécrétion de facteurs de croissance, de cytokines et de molécules d'adhésion nécessaires à la survie et à la prolifération des cellules hématopoïétiques. La production de cellules clonogènes (CFC), à l'issue des 5 semaines de culture, reflète le nombre de progéniteurs **LTC-IC** (pour « Long Term Culture-Initiating Cell ») - population plus immature que les pré-CFC - initialement présents dans la suspension cellulaire. Une LTC-IC est définie par sa capacité à générer au moins un progéniteur CFC myéloïde, lymphoïde ou multipotent lors de la culture secondaire en milieu semi-solide, suite aux 5 semaines de co-culture.

## **II- Régulation des CSH adultes normales**

Afin de préserver intact le réservoir de CSH au sein de structures spécifiques du microenvironnement, de les maintenir quiescentes ou d'assurer leur engagement dans les lignages hématopoïétiques, différents facteurs sont indispensables et participent au maintien d'une hématopoïèse normale. Ces facteurs interviennent également plus tardivement au niveau des compartiments des progéniteurs et des précurseurs.

La littérature définit deux catégories de facteurs : des **facteurs extrinsèques**, présents dans le microenvironnement cellulaire (molécules d'adhésion ou d'ancrage, cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, hormones et molécules chimiques diverses) et des **facteurs intrinsèques**, capables de réguler l'hématopoïèse au niveau de la cellule elle-même (essentiellement des facteurs de transcription). Cette apparente dichotomie mérite cependant d'être nuancée. En effet, les facteurs extrinsèques témoignent de l'adaptation constante de l'hématopoïèse physiologique aux besoins de l'organisme, tandis que les facteurs intrinsèques correspondent probablement à une réponse indirecte, mal connue car complexe, aux diverses variations des facteurs environnementaux.

Les mécanismes de régulation des cellules hématopoïétiques seront ainsi présentés selon des niveaux hiérarchiques : tout d'abord les facteurs du microenvironnement intervenant dans la régulation de l'hématopoïèse, puis les mécanismes impliqués directement au niveau intracellulaire. Une première section sera consacrée à l'étude du microenvironnement des cellules hématopoïétiques les plus primitives qui, physiologiquement, sont retrouvées dans des zones spécialisées de la moelle osseuse communément appelées « niches hématopoïétiques ».

## **II.1- Le microenvironnement médullaire**

Chez l'homme adulte, l'unique site hématopoïétique est la moelle osseuse. Elle est constituée de moelle rouge et jaune, respectivement active et inactive sur le plan hématopoïétique (Kricun, 1985 ; Williams, 1995). Les cellules hématopoïétiques se développent ainsi dans un microenvironnement complexe composé, d'une part, des différentes **cellules du stroma médullaire** (Kierszenbaum, 2007) - fibroblastes, adipocytes, ostéoblastes, ostéoclastes, cellules réticulaires, macrophages, progéniteurs mésenchymateux et endothéliaux - et, d'autre part, des molécules issues de la matrice extracellulaire (**ECM**) - fibronectine, laminine, protéoglycanes - réparties au sein du tissu conjonctif constitué de fibres de collagène. La majorité des CSH réside dans ou près de l'endoste, surface interne de l'os à l'interface entre l'os et la moelle osseuse, au sein de structures spécifiques assurant leur maintien et leur différenciation en progéniteurs.

### **II.1.1- Concept de « niche »**

Dès la fin des années 1960, Trentin a montré que les cellules stromales possédaient un rôle actif dans la régulation de la différenciation des CSH (Wolf, 1968 ; Trentin, 1971). Il propose que ce mécanisme nécessite une interaction entre les deux types cellulaires et qualifie le stroma médullaire d'« hematopoietic inductive microenvironment » (**HIM**).

Le terme de niche hématopoïétique fut employé pour la première fois par Schofield (Schofield, 1978). Il propose, pour compléter la notion de HIM, l'existence d'une niche spécifique des CSH capable de contrôler leur engagement en différenciation et leur permettant de proliférer tout en maintenant leur potentiel souche. Une caractéristique essentielle de la niche hématopoïétique est donc de maintenir la majorité des CSH dans un état indifférencié (Scadden, 2006). Elle intervient également dans la prolifération des cellules moins primitives, afin de maintenir l'homéostasie tissulaire (Abkowitz, 2002).

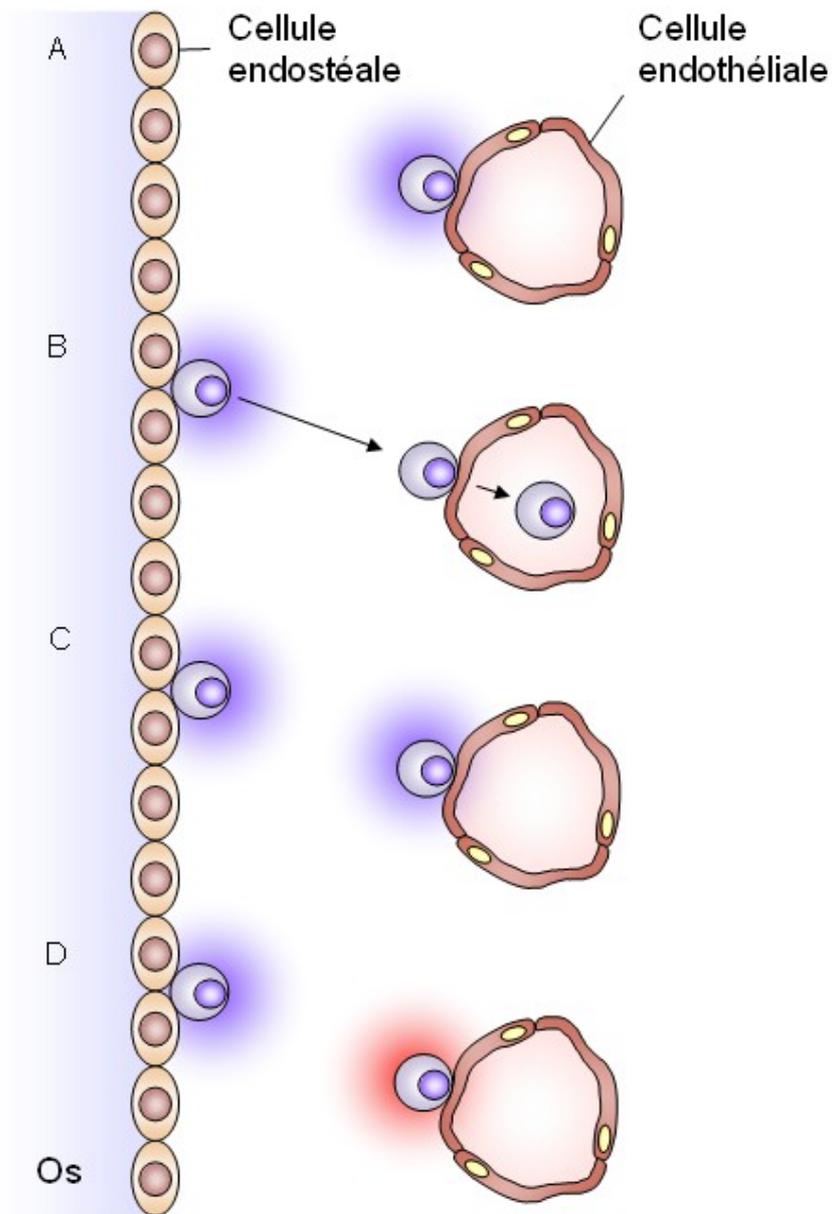


Figure 9 : Modèles possibles pour la niche hématopoïétique

**A-** Les CSH résident dans la niche vasculaire mais sont influencées par des facteurs solubles libérés par les cellules endostéales. **B-** Les CSH résident dans la niche ostéoblastique mais peuvent migrer vers l'environnement vasculaire. **C-** Les CSH résident dans deux niches endostéales et vasculaires, distinctes spatialement, mais présentant des similarités fonctionnelles. **D-** Les CSH résident dans deux niches endostéales et vasculaires, distinctes spatialement et fonctionnellement. Adapté d'après Kiel, 2008.

La dernière décennie a connu un important regain d'intérêt pour les niches - des CSH et des autres types cellulaires (Spradling 2001 ; Li 2005 ; Lemischka, 2003 ; Moore, 2006 ; Jones, 2008) - alimenté par l'attrait général acquis par la biologie de ces cellules et par la mise au point de nouvelles approches expérimentales *in vivo*. Ce regain d'intérêt est également nourri par la prise de conscience de l'importance de la notion de niche pour la médecine régénératrice (Bianco, 2011).

### **II.1.2 - Diversité des niches hématopoïétiques**

En 2003, deux études réalisées chez la souris ont démontré que les cellules ostéoblastiques ou endostéales étaient capables d'influencer la taille du réservoir de CSH, impliquant de ce fait les ostéoblastes comme un des composants indispensables de la niche hématopoïétique (Calvi, 2003 ; Zhang, 2003). Cependant, une étude indépendante a suggéré que les cellules endothéliales des sinusoides vasculaires de la moelle osseuse représentaient, de par leur proximité avec les CSH, l'unique niche hématopoïétique (Kiel, 2005). Actuellement, l'existence et/ou la coexistence d'une **niche ostéoblastique** (ou endostéale) et d'une **niche vasculaire** font débat. Plusieurs modèles sont ainsi proposés concernant l'existence de CSH au sein des niches ostéoblastiques et vasculaires (Kiel, 2008) (**Figure 9**). Un relatif consensus voudrait que la niche ostéoblastique soit spécialisée dans le maintien et la quiescence des CSH à long terme et qu'au contraire la niche vasculaire permette la mobilisation, la différenciation et la prolifération de celles-ci (Kopp, 2005).

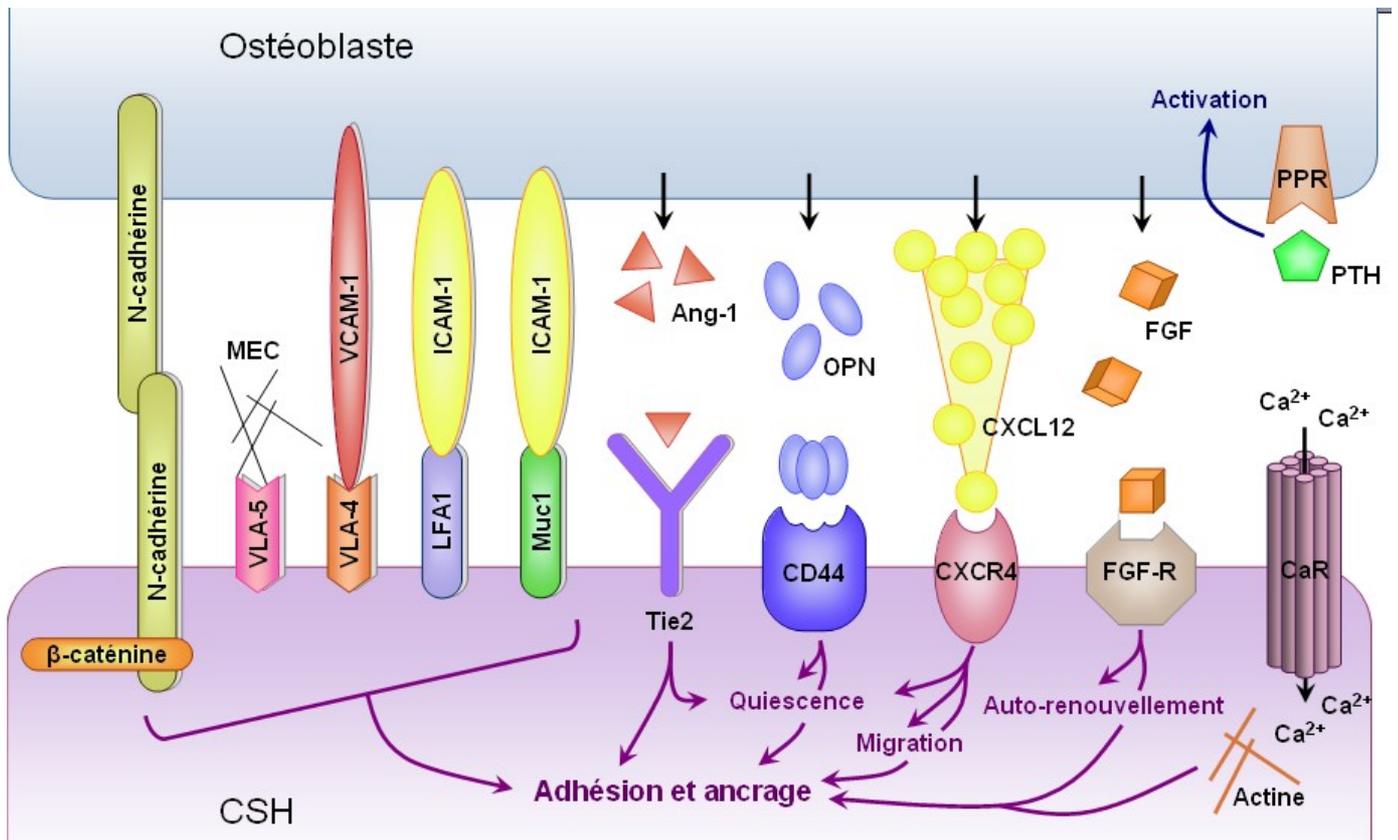


Figure 10 : Interactions impliquées dans l'adhésion et le recrutement des CSH au sein de la niche ostéoblastique

Parallèlement aux phénomènes d'adhésion et d'ancrage médiés par les différentes molécules présentées dans ce schéma, leurs implications complémentaires dans la biologie des CSH sont également citées. Bien que n'intervenant pas directement dans les phénomènes d'ancrage ou de libération des CSH, l'activation des ostéoblastes par la PTH, via son récepteur PPR, est elle aussi illustrée dans cette figure. VLA = Very Late Antigen.

Adapté d'après Rizo, 2006 et Graf, 2007.

## **II.2- Régulation des CSH par le microenvironnement**

Les CSH entretiennent un dialogue constant avec leurs niches par l'intermédiaire de contacts directs avec les cellules stromales et de facteurs diffusibles et environnementaux. Un certain nombre de molécules d'adhésion, de couples ligands/récepteurs et de voies de signalisation spécifiques sont impliqués dans les interactions entre ces cellules et les CSH (Jones, 2008 ; Lataillade, 2010). Les facteurs diffusibles sont, quant à eux, représentés par des hormones, des cytokines et des chimiokines.

### **II.2.1- Facteurs d'adhésion et de recrutement au sein de la niche**

Les interactions au sein de la niche hématopoïétique nécessitent des phénomènes d'adhésion et de recrutement faisant intervenir des protéines transmembranaires spécifiques, telles les N-cadhérines, les intégrines, la superfamille des immunoglobulines (V-CAM, I-CAM et N-CAM) et les molécules de l'ECM, ainsi que l'interaction de certains ligands avec leur récepteur (Tie2/Ang-1, OPN/CD44, CXCL12/CXCR4) (**Figure 10**). Cette section propose un aperçu des couples ligands/récepteurs et de leur influence directe dans l'adhésion et l'ancrage des CSH, mais également dans les phénomènes de régulation et de recrutement de ces cellules.

Certaines cellules ostéoblastiques expriment fortement la N-cadhérine à leur surface et sont nommées **SNO** (Spindle-shaped N-cadherin<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> Osteoblastic). Ces cellules, activées par l'hormone parathyroïde (PTH), jouent un rôle essentiel dans la régulation et la taille de la niche hématopoïétique (Zhang, 2003). Elles métabolisent les molécules constituant l'ECM, développent des interactions N-cadhérine/ $\beta$ -caténine ou intégrines avec les CSH et sécrètent des facteurs nécessaires à l'adhésion de celles-ci. Ces facteurs jouent également un rôle primordial dans le maintien des CSH en quiescence. Parmi ces facteurs sont retrouvés l'angiopoïétine-1 (Ang-1), l'ostéopontine (OPN) et la chimiokine CXCL12 :

- la liaison de l'**Ang-1** à son récepteur **Tie2** a été décrite comme jouant un rôle important dans l'adhésion des CSH et dans leur maintien en quiescence (Arai, 2004). L'Ang-1 augmente également l'expression des N-cadhérines à la surface des ostéoblastes, favorisant l'ancrage des CSH au sein de la niche hématopoïétique (Hosokawa, 2010).

- L'**OPN**, reconnue par les CSH via le récepteur **CD44**, agit comme un régulateur négatif de leur prolifération et assure leur localisation, dans un état quiescent, à la surface de l'endoste (Nilsson, 2005).

- Le **CXCL12** ou **SDF-1** (Stromal Derived Factor-1) est produit par les cellules stromales de la niche hématopoïétique et interagit avec le récepteur **CXCR4**, fortement exprimé à la surface des CSH primitives (Kopp, 2005). Cette chimiokine présente un rôle chimio-attractant pour les CSH et sa sécrétion régule leur migration et leur localisation au sein de la niche (Lapidot, 2001). Le CXCL12 intervient également dans la régulation du nombre de CSH présentes dans la circulation sanguine (Yin, 2006 ; Lyman, 1993). L'addition de CXCL12 *in vitro* inhibe l'entrée en cycle des cellules hématopoïétiques primitives et l'inactivation de son récepteur dans les CSH génère une prolifération excessive de celles-ci, impliquant un éventuel rôle du couple CXCR4/CXCL12 dans le maintien en quiescence des CSH (Nie, 2008). Cette notion est cependant controversée (Eaves, 2005 ; Sugiyama, 2006). Ce couple représente également un des éléments essentiels dans la régulation de deux phénomènes importants de l'hématopoïèse adulte, le **homing** et la **mobilisation** des CSH (Zou, 1998 ; Lataillade, 2004 ; Hicks, 2011 ; Sharma, 2011). Le *homing*, caractérisant la migration des CSH de la circulation sanguine vers le compartiment osseux après franchissement de la barrière endothéliale via l'expression de facteurs de croissance et de molécules d'adhésion tel le SDF-1, est un processus essentiel mis en jeu notamment lors des transplantations de moelle osseuse (Lapidot, 2005). Au contraire, le processus de mobilisation caractérise le franchissement de la barrière endothéliale par les CSH et les

progéniteurs dans le sens opposé (Hattori, 2001). La mobilisation des CSH vers le sang périphérique représente en clinique une source importante de cellules pour les protocoles de transplantation. Des injections de G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor), répétées pendant 5 jours, sont réalisées chez les patients et permettent d'abolir l'ancrage des CSH à leur microenvironnement, suite au clivage du SDF-1, notamment par des protéases synthétisées et sécrétées par les polynucléaires neutrophiles (To, 1997 ; Levesque, 2004).

- un dernier facteur exprimé par les cellules de la niche hématopoïétique, le **FGF** (Fibroblast Growth Factor) et notamment le FGF-4, intervient également dans l'adhésion et le maintien de l'auto-renouvellement des CSH (de Haan, 2003 ; Yeoh, 2006). Il a été proposé qu'en parallèle du SDF-1, un gradient décroissant de FGF s'établissait entre la niche vasculaire et la niche ostéoblastique, favorisant la mobilisation des CSH dans la circulation sanguine (Kopp, 2005).

Indépendamment des facteurs précédemment décrits, il a été suggéré que la PTH serait essentielle à la prolifération et au maintien des CSH, en régulant positivement l'activité des ostéoblastes (Calvi, 2003). La concentration en ions calciums  $Ca^{2+}$  joue elle aussi un rôle au sein de la niche hématopoïétique. L'ancrage des CSH dans celle-ci est régulée par l'expression du récepteur **CaR** (Calcium-sensing Receptor) et par la l'interaction  $Ca^{2+}$ /actine (Adams, 2006).

## **II.2.2- Les voies de signalisation dans la niche**

Plusieurs voies interviennent dans la régulation de l'homéostasie hématopoïétique (pour revue Warr, 2011). La description des acteurs impliqués, ainsi que leurs mécanismes d'action seront présentées brièvement dans les figures associées (**Figure 11 et 12**). Seule leur influence dans la régulation des cellules hématopoïétiques sera développée dans cette section.

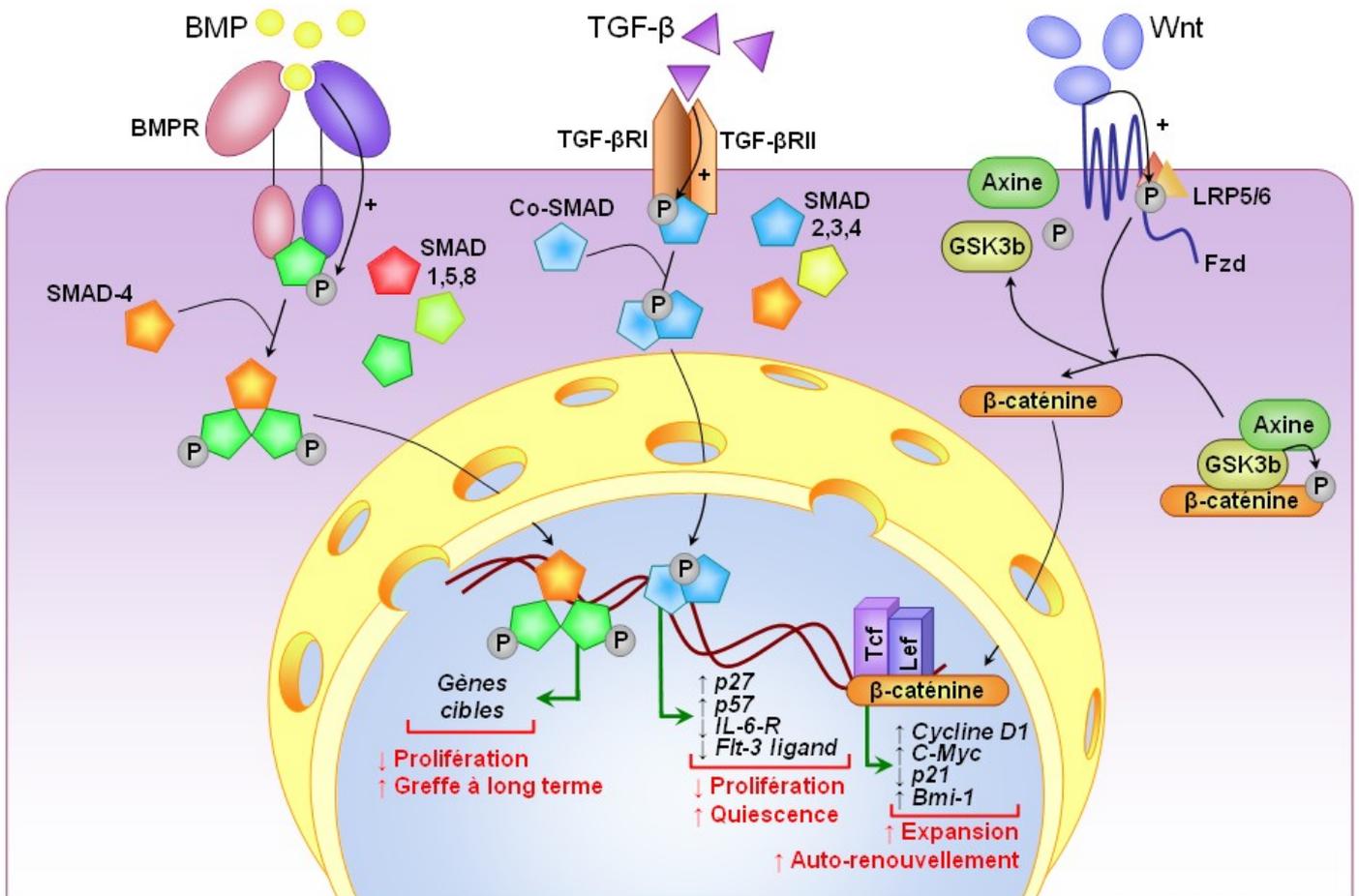


Figure 11 : Mécanismes moléculaires des voies de signalisation TGF- $\beta$ /BMP et Wnt/ $\beta$ -caténine et leurs implications dans la biologie des CSH

La famille des TGF- $\beta$  comprend 3 isoformes du TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1/2/3), environ 20 isoformes de BMP et l'activine. Activé après clivage dans la MEC, le TGF- $\beta$  se lie à 2 récepteurs des cellules hématopoïétiques primitives (TGF- $\beta$ RI et II) entraînant en aval l'activation des facteurs de transcription de la famille Smad, notamment Smad-2/-3 ou -4 (Karlsson, 2007).

L'interaction des BMP avec les récepteurs BMPR induit la phosphorylation de Smad-1/-5 ou -8. Des dimères phosphorylés forment avec Smad-4 un complexe qui migre dans le noyau et module certains gènes cibles (Cheung, 2006).

Composée de 19 glycoprotéines, la famille Wnt exerce son action majoritairement via la voie dite canonique. Wnt, exprimée par les cellules stromales, interagit avec le complexe Frizzled (Fzd)/Lrp5-6 et active le facteur de transcription  $\beta$ -caténine. Constitutivement, elle est phosphorylée via le complexe Axine/Gsk3b et dégradée. En présence de Wnt, Lrp5 et 6 sont phosphorylés et la  $\beta$ -caténine libérée interagit avec les facteurs nucléaires Tcf et Lef, modulant ainsi plusieurs gènes cibles.

Adapté d'après Graf, 2007 et Warr, 2011.

- La voie de signalisation **TGF- $\beta$ /BMP (Figure 11)**

Le TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) et le BMP (Bone Morphogenic Protein) participent activement à la régulation des CSH dans la niche (Isufi, 2007 ; Singbrant, 2010). Le **TGF- $\beta$**  est exprimé à la fois par les cellules hématopoïétiques primitives et par les cellules stromales de la moelle osseuse, suggérant que les CSH peuvent exprimer ce facteur, mais également en être la cible (Ruscetti, 2005). Le TGF- $\beta$  module l'expression des récepteurs de cytokines (IL-1R et c-kit) et augmente l'expression d'inhibiteurs du cycle cellulaire (p27 et p57) (Dubois, 1990 ; Dubois, 1994 ; Dao, 1998). Des études *in vitro* ont montré que TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 3 exercent des effets antiprolifératifs sur les populations de progéniteurs et de CSH, favorisant la quiescence de ces dernières (Goey, 1989 ; Hatzfeld, 1991). Le TGF- $\beta$  influence positivement sur l'activation et l'accumulation nucléaire de FoxO3a. Ce facteur de transcription joue un rôle critique dans la réponse à un stress oxydatif et maintient les CSH en quiescence (Miyamoto, 2007 ; Yamazaki, 2009). Ainsi, la voie du TGF- $\beta$  permet de réguler le niveau d'espèces réactives de l'oxygène (**ROS**, Reactive Oxygen Species) dans les CSH et joue un rôle déterminant dans leur maintien et leur protection dans les niches. Malgré les nombreux résultats obtenus *in vitro* chez la souris, la compréhension du rôle *in vivo* de la voie impliquant le TGF- $\beta$  reste encore peu documentée.

Concernant les **BMP**, une concentration élevée d'un de ses membres (BMP-2, -4 ou -7) inhibe la prolifération des CSH tout en maintenant la survie à long terme et les capacités de greffe de ces cellules (Bhatia, 1999). Le **BMP4** est retrouvé fortement exprimé à la surface des cellules ostéoblastiques associées à la niche et serait impliqué dans la régulation du nombre, mais également des fonctions des CSH *in vivo* (Goldman, 2009 ; Renström, 2010). Un déficit de son récepteur probable, **BMPR1a**, induit une diminution de leur capacité de reconstitution à long terme (Zhang, 2003).

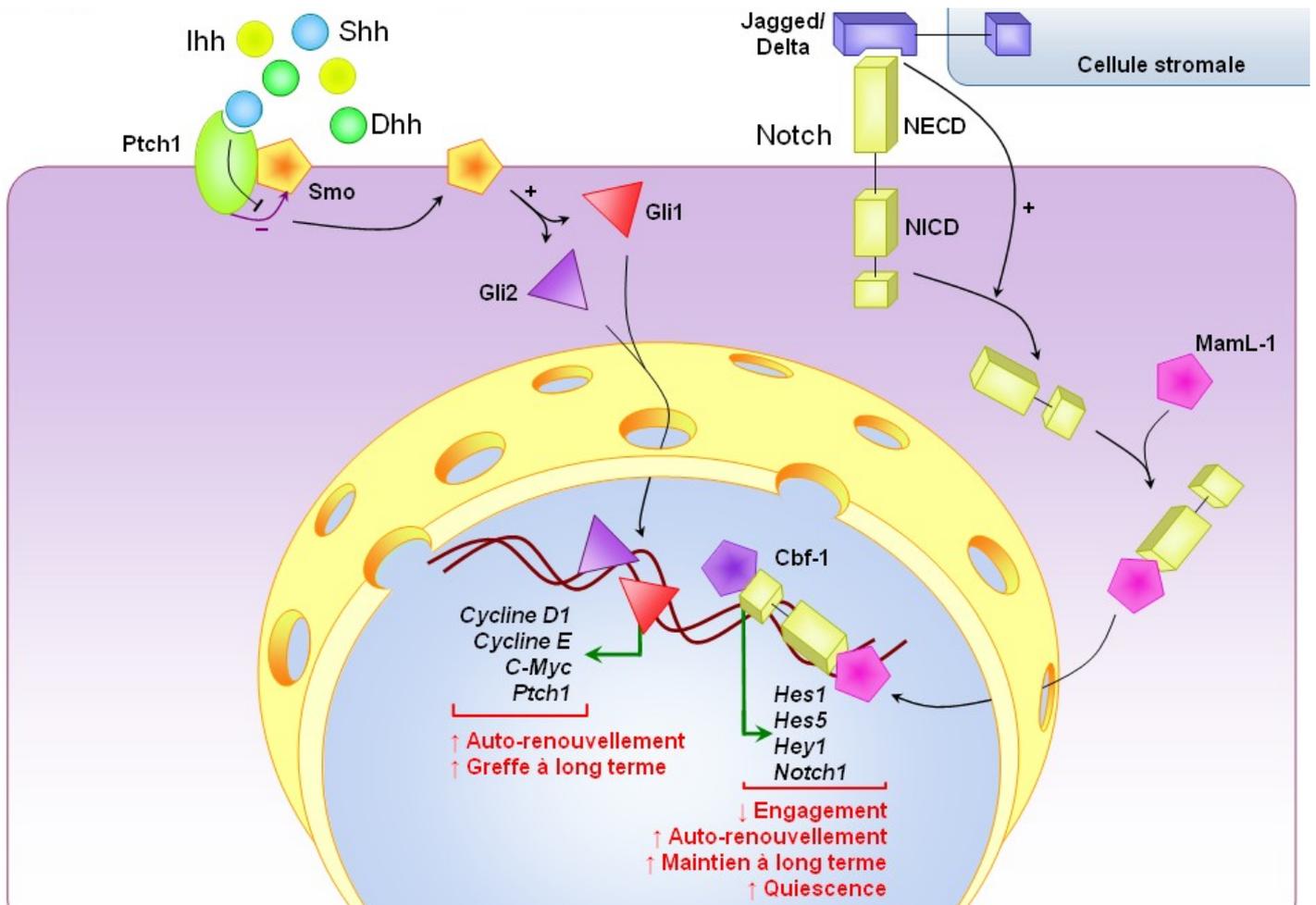


Figure 12 : Mécanismes moléculaires des voies de signalisation Hedgehog et Notch et leurs implications dans la biologie des CSH

Dans la voie Hedgehog les protéines Hh (**Shh**, **Ihh**, **Dhh**) se lient au récepteur Patched1 (**Ptch1**) régulant négativement la protéine Smoothened (**Smo**), à laquelle il est associé. La liaison d'une Hh à Ptch1 entraîne la libération de Smo qui active les facteurs de transcription du Glioblastome (**Gli1** et **Gli2**). Ces facteurs favorisent l'activation de gènes cibles essentiels, notamment ceux codant pour la cycline D1, la cycline E, c-Myc, Ptch1. (Trowbridge, 2006). Les protéines de la famille Notch (**Notch1-4**) exprimées par les cellules hématopoïétiques se lient aux ligands des cellules stromales, **Jagged-1-2** et **Delta-1-3/-4** (Radtke, 2010), entraînant le clivage et la libération des domaine extra- et intracellulaire des Notch (**NECD** et **NICD**). NICD interagit avec les protéines **MamL-1** et **Cbf-1**, favorisant alors la transcription de gènes cibles essentiels (*Hes1*, *Hes5*, *Hey1* et *Notch1* lui-même) (Weber, 2010 ; Schwanbeck, 2008). L'activité de Notch dépend également de l'internalisation de ligands, non figurés ici, via les ligases Mindbomb (Mib-1/-2) et Neuralized (Neur-1/-2) (Bray, 2006). Adapté d'après Graf, 2007 et Warr, 2011.

- La voie de signalisation **Wnt/ $\beta$ -Caténine (Figure 11)**

La famille des protéines Wnt (Wingless Integrase) intervient dans le maintien et l'auto-renouvellement des cellules hématopoïétiques matures et immatures (Staal, 2010). L'inhibition de cette voie par une surexpression d'axine a montré une diminution de la croissance des CSH (**cf. Figure 11**). La perte partielle du complexe régulant négativement la  $\beta$ -caténine favorise également l'auto-renouvellement de ces cellules (Lane, 2010). Enfin, la voie Wnt entraîne une augmentation de l'expression de Notch1 et de HoxB4, impliqués dans le maintien du stock de cellules hématopoïétiques immatures dans un état indifférencié (Baba, 2006). L'ensemble de ces données suggère que cette voie joue un rôle significatif dans le maintien des CSH *in vitro*. De par la diversité des protéines Wnt et de leur possible redondance, l'étude du rôle de cette voie *in vivo* n'a pas permis d'aboutir à des conclusions aussi nettes (Jeannet, 2008 ; Koch, 2008).

- La voie de signalisation **Hedgehog (Figure 12)**

La famille Hedgehog (Hh) est composée de trois protéines : Sonic Hh (Shh), Indian Hh (Ihh) et Desert Hh (Dhh). L'expression de Ihh par les cellules stromales augmente la capacité des progéniteurs CD34<sup>+</sup> à former des colonies ainsi que leur potentiel de greffe (Kobune, 2004). Shh semble activer la prolifération des cellules CD34<sup>+</sup> de la moelle osseuse via les BMP (Bhardwaj, 2001 ; Chung, 2001). Bien que de nombreuses études suggèrent une importance de Shh dans la régulation de l'hématopoïèse en condition d'homéostasie, d'autres suggèrent que cette voie assurerait le maintien de l'auto-renouvellement des CSH uniquement dans des conditions de haut stress hématopoïétique (transplantation, traitements myélosuppresseurs). Cette notion est actuellement encore discutée (Gao, 2009 ; Hofmann, 2009).

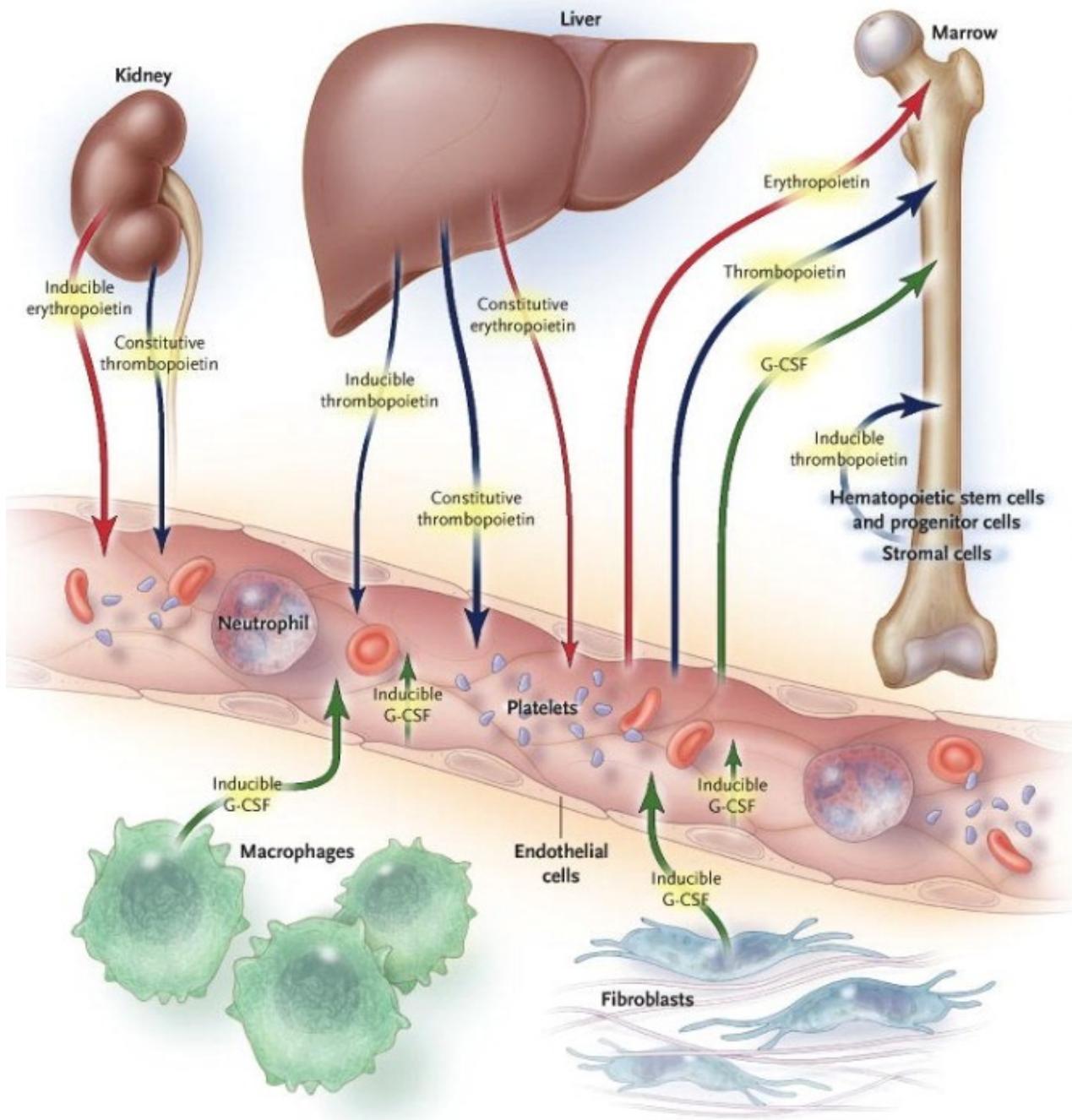


Figure 13 : Production des facteurs de croissance hématopoïétiques

La production et la sécrétion des facteurs de croissance par divers tissus et cellules sont à la fois constitutives et inducibles. L'EPO (flèche rouge) est produite constitutivement par le foie (environ 10% de l'EPO totale) et peut-être induite par l'hypoxie. Le G-CSF (flèche verte) est majoritairement induite dans les tissus par les fibroblastes et les macrophages et par les cellules endothéliales via des médiateurs inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$ ). La TPO (flèche bleue) est produite constitutivement par le foie (environ 50% du taux basal) et le rein et peut-être induite dans le foie par des récepteurs inflammatoires (essentiellement IL-6) et dans la moelle osseuse après cytopénie. D'après Kaushansky, 2006.

- La voie de signalisation **Notch (Figure 12)**

Cette voie est impliquée dans la régulation des compartiments des CSH et des progéniteurs (Duncan, 2005). Son induction *in vitro* favorise l'expansion des progéniteurs hématopoïétiques primitifs (Karanu, 2000 ; Karanu, 2001 ; Varnum-Finney, 2000 ; Varnum-Finney, 2003) et son inhibition entraîne la différenciation des CSH. Ces résultats montrent que Notch favorise l'auto-renouvellement des CSH et le maintien des progéniteurs dans un état indifférencié (Duncan, 2005 ; Stier, 2002).

### **II.2.3- Importance des facteurs solubles**

Les facteurs solubles (facteurs de croissance, cytokines et hormones), interviennent à tous les niveaux de l'hématopoïèse et régulent notamment le réservoir des CSH, mais également l'expansion cellulaire et la différenciation dans les lignages hématopoïétiques, ainsi que la maturation terminale des cellules sanguines. Toutes ces molécules, produites *in vivo* à de faibles concentrations (Zhu, 2002), peuvent interagir entre elles, modulant ainsi leurs effets sur les cellules cibles. Elles sont sécrétées soit à distance, comme l'érythropoïétine (EPO) ou la thrombopoïétine (TPO) sécrétées respectivement par le foie et le rein, soit par les cellules constituant la niche hématopoïétique, comme le G-CSF par les cellules endothéliales et les fibroblastes (**Figure 13**). L'action de ces facteurs nécessite obligatoirement leur liaison à des récepteurs, de plusieurs classes distinctes, présents à la surface des cellules hématopoïétiques, ainsi que l'activation de voies de signalisation particulières. Ces facteurs peuvent, selon leur nature, réguler positivement ou négativement l'hématopoïèse et, bien que leur action spécifique *in vivo* soit difficile à établir, ils sont couramment utilisés *in vitro*, notamment dans les protocoles d'expansion et de maintien des cellules hématopoïétiques les plus primitives. En lien avec nos travaux, ce dernier point fera l'objet dans ce chapitre d'une section détaillée concernant l'état actuel des connaissances.

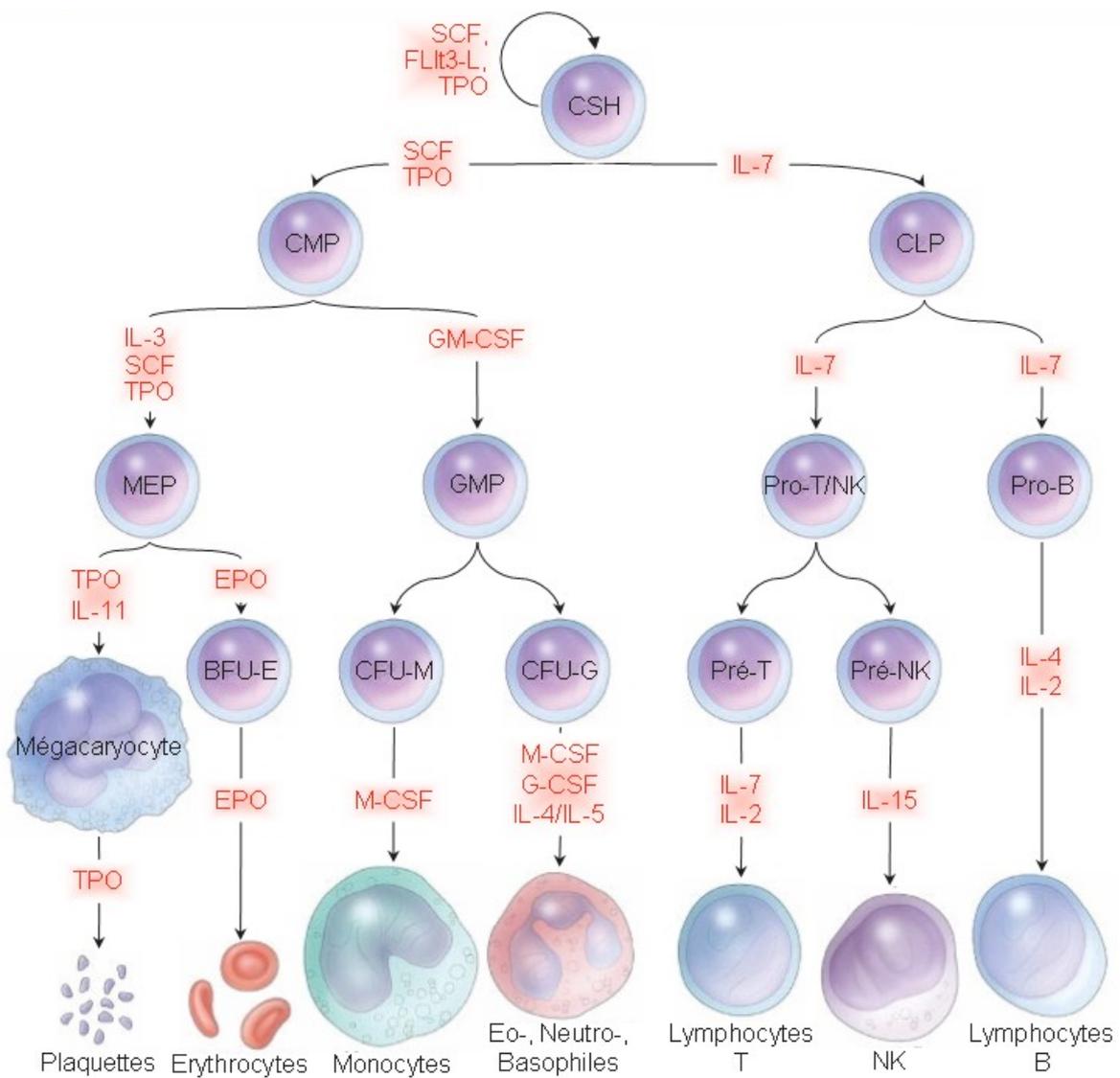


Figure 14 : Régulation par les facteurs de croissance et cytokines de certaines étapes cibles de l'hématopoïèse

Adapté d'après Kaushansky, 2006.

*II.2.3.a- Les facteurs régulant positivement l'hématopoïèse (Figure 14)*

Parmi ces facteurs, trois d'entre eux, ainsi que leur récepteur, jouent un rôle essentiel dans l'auto-renouvellement des CSH : la **TPO**, le **SCF** (Stem Cell Factor) et le **Flt3-L** (Fms-Like Tyrosine kinase 3-ligand). La TPO et son récepteur Mpl interviennent dans le maintien en quiescence et l'expansion des CSH adultes. Mpl est fortement exprimé sur les LT-CSH quiescentes et cette expression diminue dans les ST-CSH et les progéniteurs multipotents (Buza-Vidas, 2006). Les LT-CSH sont, de plus, majoritairement retrouvées à proximité des ostéoblastes sécrétant la TPO (Yoshihara, 2007). Le SCF, couplé à son récepteur c-kit, intervient également dans la survie et/ou l'expansion des CSH. c-kit, fortement exprimé dans les CSH de la moelle osseuse, induit un signal anti-apoptotique tout en maintenant la quiescence de ces cellules (Thorén, 2008). Enfin, le récepteur au Flt3-L, Flt3/Flk2, est exprimé sur les progéniteurs hématopoïétiques primitifs et joue un rôle essentiel dans leur survie, leur prolifération et leur différenciation (Mackarehtschian, 1995). D'autres cytokines interviennent également lors des étapes précoces de l'hématopoïèse : l'**IL-3** (Interleukine-3) ou multi-CSF, l'**IL-6** et le **GM-CSF** (Granulocyte and Macrophage-Colony Stimulating Factor). L'IL-3 et le GM-CSF stimulent, par exemple, les progéniteurs myélo-érythroïdes multipotents et les progéniteurs érythroïdes et granulo-macrophagiques.

D'autres cytokines possèdent des spectres d'actions plus restreints et interviennent lors des étapes tardives de l'hématopoïèse, voire lors des phases terminales de différenciation : l'**EPO** (différenciation érythroïde), le **G-CSF** (Granulocyte-Colony Stimulating Factor, différenciation granuleuse et rôle dans la mobilisation des cellules primitives), le **M-CSF** (Macrophage-Colony Stimulating Factor, différenciation terminale des monocytes et macrophages), l'**IL-4** (différenciation des lymphocytes B), l'**IL-7** (différenciation des lymphocytes B, T et NK), l'**IL-5** (production des polynucléaires éosinophiles) et l'**IL-2** (prolifération des cellules lymphoïdes).

<b>Champs d'application relatifs à l'expansion des cellules hématopoïétiques humaines</b>	<b>Situations concernées</b>	<b>Objectifs</b>
Augmenter le nombre de cellules souches primitives dans un greffon insuffisant	Greffes de sang placentaire chez l'adulte Recueil insuffisant de CSH (moelle et sang) Aplasia idiopathique ou radio-induite	Amplifier le compartiment hématopoïétique primitif
Diminuer la quantité de cellules à prélever	Effet purge dans les hémopathies et certains cancers	
Augmenter le nombre de cellules matures	Raccourcissement de la durée d'aplasie	Induire massivement la différenciation des compartiments de progéniteurs
Produire des cellules de lignées spécifiques (mégacaryocytaire ou érythroïde)	Cellules dendritiques, natural killer, etc. Transfusion sanguine	Induire, pour l'exemple des cellules érythroïdes, une prolifération maximale du compartiment primitif et imposer une différenciation exclusivement érythroïde aux progéniteurs produits

Tableau 1 : Applications cliniques de l'expansion *ex vivo* des cellules hématopoïétiques humaines

Adapté d'après Douay, 2003.

*II.2.3.b- Les facteurs régulant négativement l'hématopoïèse*

Ils jouent un rôle déterminant dans l'homéostasie hématopoïétique en inhibant l'auto-renouvellement et/ou la différenciation des CSH et régulent ainsi le nombre de cellules hématopoïétiques. Ils comprennent le **TNF- $\alpha$**  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ), qui induit l'apoptose des cellules hématopoïétiques via sa liaison à TNF-R2, le **PF4** (Platelet Factor-4) qui inhibe la mégacaryopoïèse, mais dont l'action régule également positivement la viabilité, la survie et l'adhésion des CSH et des progéniteurs (Maurer, 2006) et la protéine **Mip-1 $\alpha$**  (Macrophage inhibitory protein-1 $\alpha$ ), qui restreint la différenciation des cellules hématopoïétiques primitives (Taichman, 2000).

Les facteurs de croissance et les cytokines représentent des facteurs clés dans la régulation de l'homéostasie hématopoïétique. Cependant, bien que les effets isolés de chacun puissent être évalués sur les populations primitives, la réalité physiologique est difficilement appréhendable. En effet, les interactions existant *in vivo* entre ces facteurs, ainsi que l'importance de leur concentration et des autres composants du microenvironnement médullaire, sont actuellement difficiles voire impossibles à reproduire *in vitro*. Malgré cela, différentes combinaisons cytokiniques permettant l'expansion des cellules les plus primitives sont étudiées et optimisées depuis plusieurs années, notamment dans des buts thérapeutiques.

*II.2.3.c- Combinaisons cytokiniques et expansion ex vivo des CSH*

L'utilisation des cellules hématopoïétiques lors de transplantations allogéniques ou autologues est devenue depuis plus de 40 ans un outil thérapeutique majeur. Comme nous l'avons précédemment cité, la limitation majeure pour l'utilisation efficace des CSH est leur faible nombre disponible. Ainsi, l'expansion *ex vivo* des cellules d'un greffon doit permettre soit d'augmenter le nombre de cellules primitives dans un greffon insuffisant (**Tableau 1**), soit de diminuer la quantité de cellules à prélever pour constituer ce greffon, soit d'accroître le

Cellules utilisées	Combinaisons cytokiniques						Expansion observée	Références
	IL-3	IL-6	SCF	Flt3-L	TPO	G-CSF		
CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> de MO	20 ng/ml	100 ng/ml	100 ng/ml	100 ng/ml			LTC-IC : 30X et CFC : 80X	Petzer, 1996
	20 ng/ml	100 ng/ml	100 ng/ml	100 ng/ml	20 ng/ml	NGF-β	LTC-IC : 24X et CFC > 500X	
CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> de CB	20 ng/ml	20 ng/ml	100 ng/ml	100 ng/ml			CFC : 100X et LTC-IC : 4X	Conneally, 1997
CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> de CB	10 ng/ml	10 ng/ml	300 ng/ml	300 ng/ml			CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> : 4X, CFC : 10X et SRC : 2-4X	Bhatia, 1997
CD34 <sup>+</sup> de CB	20 ng/ml	20 ng/ml	100 ng/ml	100 ng/ml			LTC-IC : 23X et CFC : 35X	Glinn, 1999
CD34 <sup>+</sup> de MIO		100 ng/ml	100 ng/ml	100 ng/ml	10 ng/ml	IL-6R (1000 ng/ml)	SRC : 4,2X	Ueda, 2000
CD34 <sup>+</sup> de CB			nr	nr		MGDF	CD34 <sup>+</sup> : 1,6X, CFU-GM : 278X, LTC-IC : 47X Prise de greffe NOD/SCID	Kobari, 2000
CD34 <sup>+</sup> mobilisées			100 ng/ml	100 ng/ml	20 ng/ml		Cellules totales : 6X, CD34 <sup>+</sup> : 6X, CFC : 3,5X et LTC-IC : 12X. Prise de greffe NOD/SCID	Herrera, 2001
	20 ng/ml	20 ng/ml	100 ng/ml	100 ng/ml	20 ng/ml		Cellules totales : 19X, CD34 <sup>+</sup> : 18X, CFC : 19X et LTC-IC : 4X. Pas de prise de greffe NOD/SCID	
CD34 <sup>+</sup> de MIO			50 ng/ml	50 ng/ml	10 ng/ml		Cellules totales : 300-5000X	Gammatoni, 2003
		10 ng/ml	50 ng/ml	50 ng/ml	10 ng/ml		Cellules totales : 90-10000X et SRC : 6X	
	10 ng/ml		50 ng/ml	50 ng/ml	10 ng/ml		Cellules totales : 200-4000X	
CD34 <sup>+</sup> de CB			100 ng/ml				Prise de greffe NOD/SCID deux fois plus importante qu'avec les cellules non traitées	Zheng, 2005
CD34 <sup>+</sup> de CB			100 ng/ml	100 ng/ml		MGDF (100 ng/ml)	Cellules totales : 350X, CD34 <sup>+</sup> : 100X et CFC : 130X. Prise de greffe NOD/SCID	Ivanovic, 2011

nombre de cellules matures afin de raccourcir la durée de l'aplasie médullaire. Actuellement, parmi les 3 principales sources de CSH humaines - cellules de sang de cordon, de moelle osseuse, ou mobilisées dans le sang périphérique (Emerson, 1996) - l'attrait pour les cellules de sang de cordon connaît un essor grandissant, du fait de leur rapide disponibilité, de la fréquence plus faible des réactions hôte-greffon et du potentiel de prolifération de ces CSH en rapport avec leur immaturité. Le désavantage principal est leur faible nombre par rapport aux CSH de moelle osseuse, elles-mêmes responsables d'une prise de greffe et d'une reconstitution plus rapides. Plusieurs protocoles d'expansion des cellules de sang de cordon ont donc été étudiés et évalués en clinique de manière à résoudre ou limiter ces problèmes.

La majorité des études repose sur l'utilisation combinée d'au moins trois cytokines parmi le SCF, la TPO, le G-CSF, le Flt3-L, l'IL-3 et l'IL-6 (pour revue Koestenbauer, 2009). Le **Tableau 2** propose une vue d'ensemble de certaines combinaisons cytokiniques mises au point lors d'études précédentes, des cellules utilisées et des résultats obtenus sur les populations hématopoïétiques primitives. La question du choix optimal des cytokines pour l'expansion des CSH reste donc ouverte. Nous verrons, dans la section dédiée aux faibles concentrations d'oxygène, que l'expansion des CSH *ex vivo* peut également être favorisée par un paramètre encore peu pris en compte, la faible oxygénation. Notons enfin que de nouvelles molécules ont récemment été étudiées concernant l'expansion des CSH *ex vivo*, notamment des nouveaux facteurs de croissance, des morphogènes, mais également des facteurs de transcription, couplés, la plupart du temps, aux combinaisons de cytokines classiques précédemment citées (pour revue Dahlberg, 2011). De nombreux autres facteurs ont été mis en évidence pour leur influence dans l'expansion *ex vivo* des cellules hématopoïétiques les plus primitives, notamment les milieux de culture utilisés (conditions cytokiniques, importance du sérum), les concentrations cellulaires initiales ainsi que la pureté des échantillons, mais également l'influence des temps de culture (pour revue Douay, 2001).

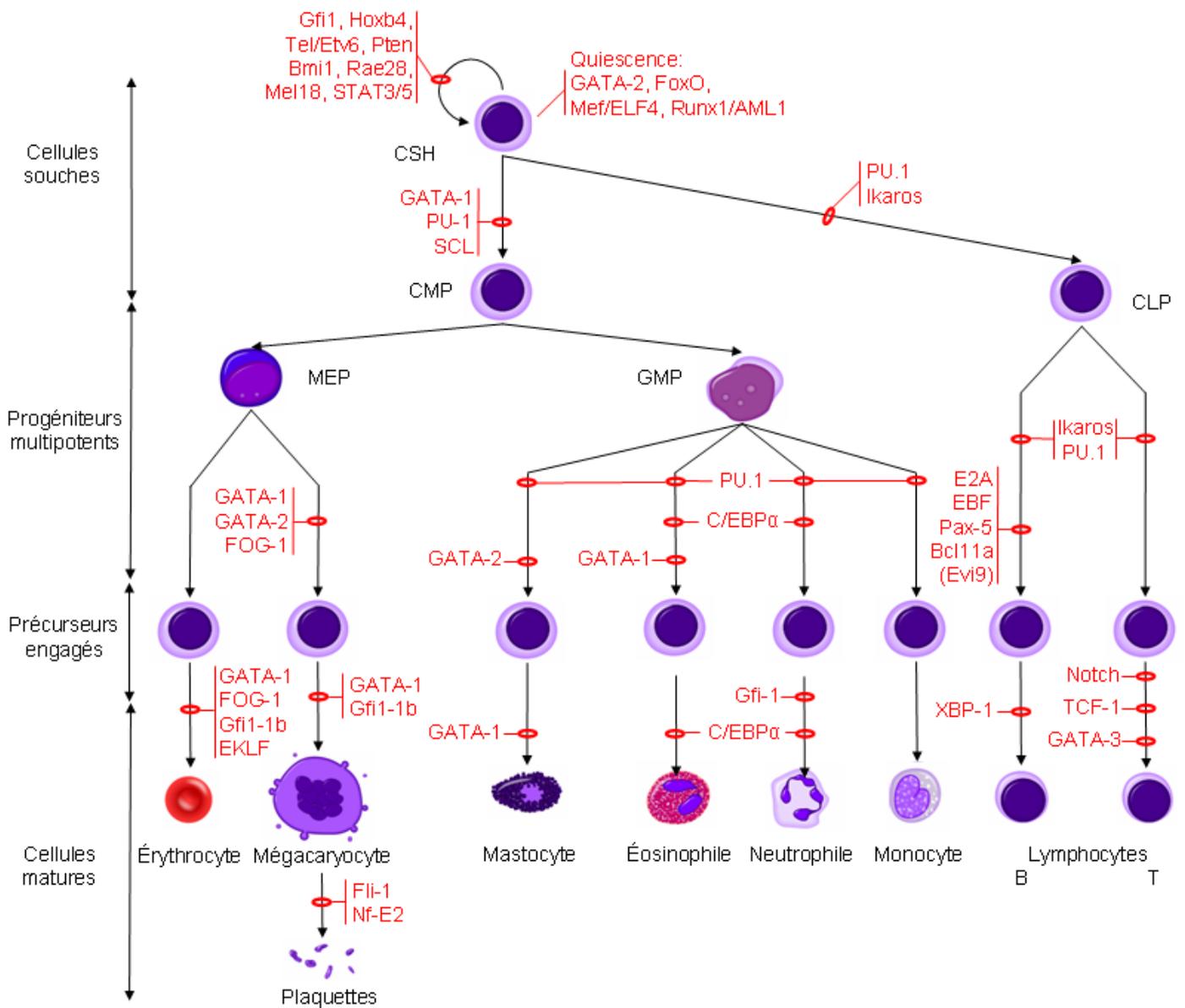


Figure 15 : Principaux facteurs de transcription régulant l'hématopoïèse

Adapté d'après Orkin, 2008.

## **II.3- Mécanismes intracellulaires impliqués dans la régulation des CSH**

Les mécanismes mis en jeu au niveau intracellulaire sont fortement dépendants des interactions des cellules avec leur microenvironnement. Ces interactions interviennent au niveau des éléments clés de la régulation cellulaire, comme des facteurs de croissance, des molécules régulatrices du cycle cellulaire et des microARN, dont le rôle dans la régulation des populations hématopoïétiques a récemment été mis en évidence.

### **II.3.1- Facteurs de transcription et voies de transduction du signal**

Dans cette partie nous citerons brièvement l'importance du rôle de certains facteurs dans l'hématopoïèse sans développer leur influence propre sur les différents compartiments. Les lecteurs intéressés trouveront dans l'**Annexe 1** une description plus détaillée de ces facteurs de croissance, ainsi que les références bibliographiques afférentes à ce sujet.

Les CSH et les différents lignages hématopoïétiques sont sous une dépendance fine de nombreux facteurs de transcription et de transducteurs de signal, eux-mêmes soumis à des régulations d'ordre métabolique ou moléculaire (**Figure 15**). La régulation de ces facteurs est étroitement liée à des grandes voies de signalisation, activées en amont et/ou en aval de ceux-ci. Les facteurs de croissance interviennent tout d'abord dans l'auto-renouvellement et la quiescence des CSH, ainsi que dans les premiers stades de l'engagement vers les voies myéloïdes ou lymphoïdes. De nombreux autres facteurs interviennent plus tardivement dans les processus de différenciation et de maturation de chaque lignage hématopoïétique.

Deux voies de signalisation interviennent en amont et/ou en aval de la régulation par les facteurs précédemment cités et assurent la transduction des signaux intracellulaires. La voie **JAK/STAT** fait intervenir la famille des kinases Janus (JAK) dont l'activité kinase leur permet de se lier à des facteurs STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription). La phosphorylation des STAT permet leur transport dans le noyau où ils régulent de

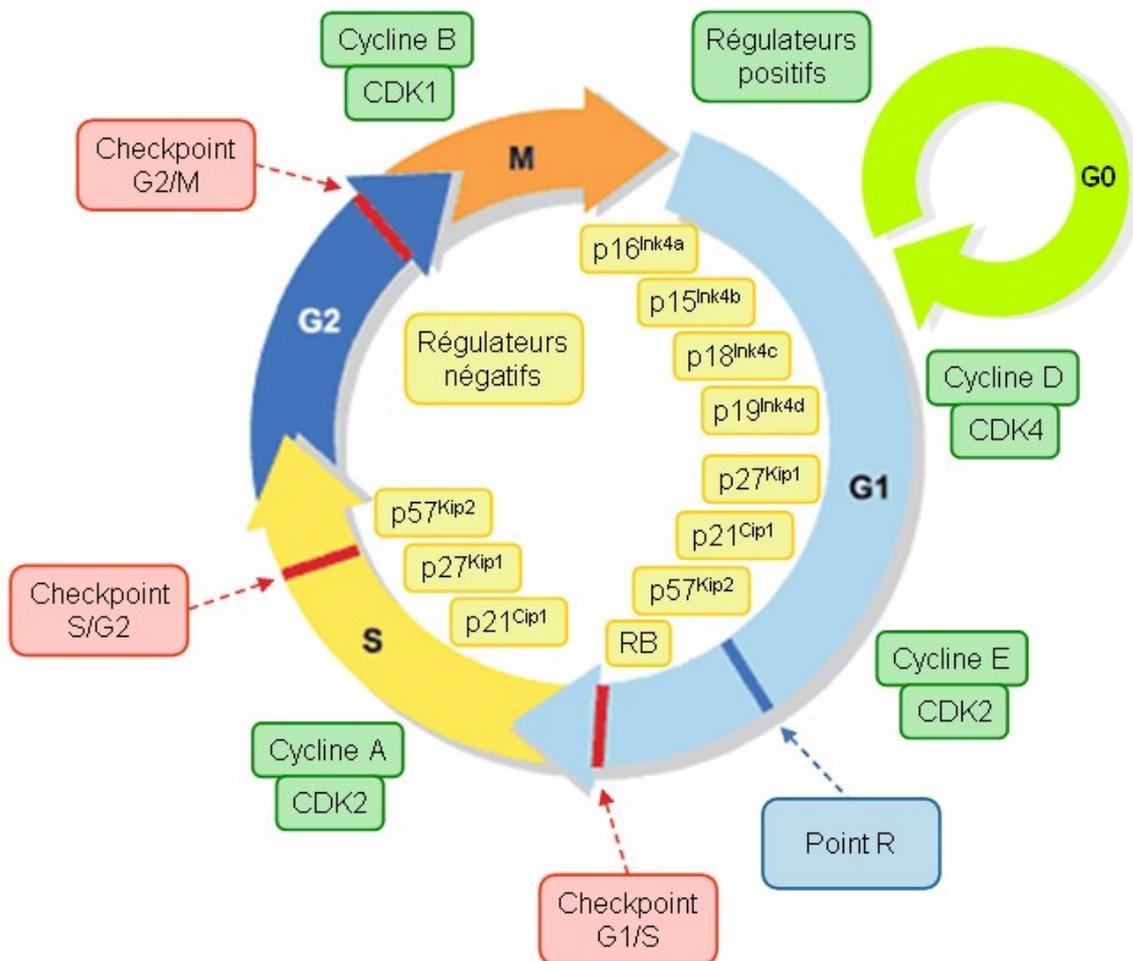


Figure 16 : Phases du cycle cellulaire et principales stratégies de régulation

Adapté d'après Kong, 2003.

nombreux gènes cibles. De manière constitutive, **STAT3** et **STAT5** favorisent l'auto-renouvellement des CSH et leur capacité de renouvellement hématopoïétique à long terme (Chung, 2006 ; Wierenga, 2006). La seconde voie fait intervenir la **PI3K** (Phosphatidyl Inositol 3-Kinase) qui permet, suite à l'activation d'un récepteur tyrosine kinase, le recrutement et la phosphorylation d'**AKT**. Cette activation d'**AKT** va permettre la transduction de signaux impliqués dans des processus tels que le métabolisme du glucose, la prolifération et la survie cellulaire.

## **II.3.2- Importance du cycle cellulaire**

### *II.3.2.a- Présentation générale*

Le cycle cellulaire est un des éléments essentiels intervenant dans la régulation des trois équilibres fondamentaux des CSH : survie/apoptose, prolifération/quiescence, différenciation/auto-renouvellement. Le cycle est schématiquement divisé en **4 phases** distinctes : **G<sub>1</sub>**, **S** ou synthèse, **G<sub>2</sub>** et **M** ou mitose. En marge de la phase **G<sub>1</sub>**, s'ajoute une **phase G<sub>0</sub>** ou phase de quiescence, durant laquelle les cellules présentent une activité métabolique faible et ne se divisent pas (**Figure 16**).

Le déroulement du cycle cellulaire est soumis à des contrôles, ou « checkpoints », localisés en différents points précis au niveau des transitions **G<sub>1</sub>/S**, **S/G<sub>2</sub>**, **G<sub>2</sub>/M** et au niveau d'un point **R** (Restriction) de la phase **G<sub>1</sub>** (O'Connell, 2000). Ce point **R** représente un point de non-retour à partir duquel les cellules ne dépendront plus de signaux mitogéniques pour leur division (Boye, 2009). Le passage du point **R** nécessite l'hyperphosphorylation de la protéine du rétinoblastome suppresseur de tumeur (**Rb**). Les phases du cycle sont également sous la dépendance positive de complexes entre des **CDK** (pour « Cyclin-DependentKinase ») et des **cyclines**. Quatre **CDK** (**CDK4/6**, **CDK2** et **CDK1**) et quatre **cyclines** (**D**, **E**, **A**, **B**) sont majoritairement décrites chez l'homme.

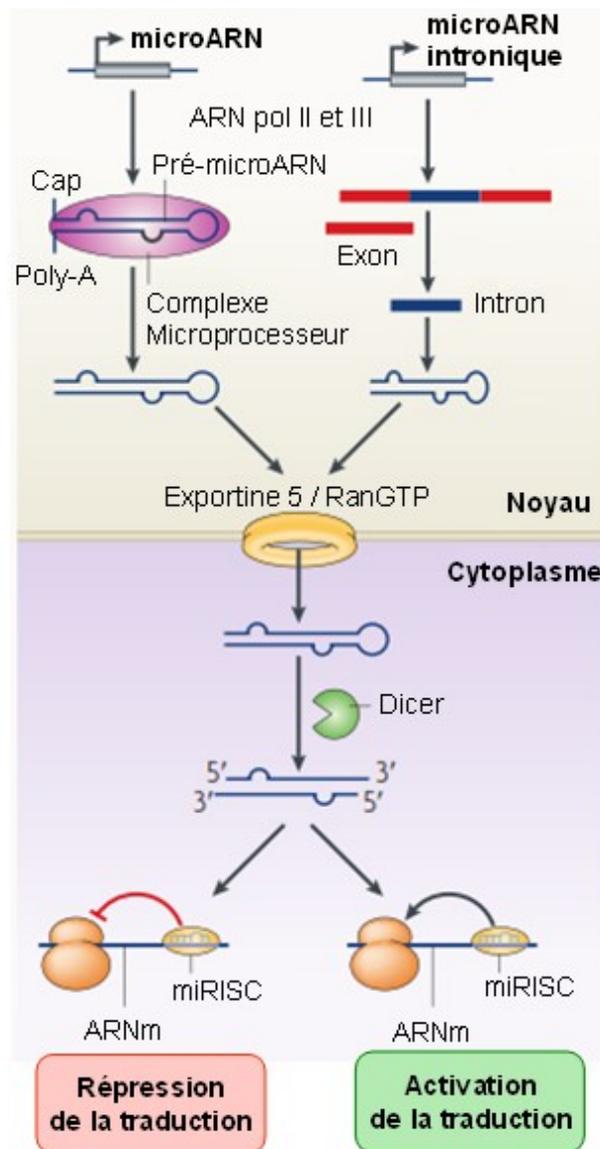


Figure 17 : Biogenèse des microARN et mécanismes d'action

La synthèse des miR et leur liaison aux ARNm met en jeu une cascade d'évènements faisant intervenir plusieurs complexes protéiques. Les microARN sont transcrits par les ARN polymérase I et II (ARN Pol I, II) en transcrits primaires appelés pré-microARN. Après des étapes de maturation dans le noyau, ils sont transportés dans le cytoplasme par l'intervention du complexe Exportine-5/RanGTP. Pris en charge par l'enzyme Dicer, les pré-microARN en épingle à cheveux (hairpin) donnent des micro-ARN simple brin de 20-25 nucléotides, qui se lient au complexe RISC (pour « RNA-induced silencing complex ») et sont finalement ciblés sur les régions 3'UTR d'ARNm cibles leur permettant de réguler positivement ou négativement leur traduction. Adapté d'après Gangaraju, 2009.

### *II.3.2.b- Régulation des CSH par contrôle du cycle cellulaire*

Les complexes CDK/cyclines sont soumis à une régulation négative faisant intervenir des inhibiteurs des CDK (**CDKI**). Les CDKI représentent ainsi une sous-catégorie de facteurs intrinsèques de régulation des CSH et sont divisés en deux grandes familles de protéines (Sherr, 1995) : les protéines **INK4** (inhibitrices de CDK4) comprenant quatre membres (**p15<sup>INK4b</sup>**, **p16<sup>INK4a</sup>**, **p18<sup>INK4c</sup>** et **p19<sup>INK4d</sup>**) et les protéines **Cip/Kip** (Cyclin dependant kinase Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein) comprenant trois membres (**p21<sup>Cip1</sup>**, **p27<sup>Kip1</sup>** et **p57<sup>Kip2</sup>**).

Chacune de ces protéines présente une action spécifique plus ou moins marquée sur la régulation des trois équilibres fondamentaux des CSH. Notons, en particulier, que la quiescence des CSH est régulée par p21<sup>Cip1</sup>, exprimée dans les CSH quiescentes et dont l'inhibition conduit à un épuisement du compartiment des CSH et à une absence de reconstitution hématopoïétique lors de greffes successives (Cheng, 2000b). La quiescence est également régulée par p27<sup>Kip1</sup>, dont l'inhibition provoque le retour en cycle des cellules (Rivard, 1996) et par p18<sup>INK4c</sup>, dont l'inhibition augmente la prolifération des CSH et favorise leur auto-renouvellement (Yuan, 2004 ; Song, 2006).

### **II.3.3- Rôle des microARN**

Les microARN (miR) sont des ARN non codants de 20-25 nucléotides se fixant aux régions 3' non codantes (**3'UTR**) d'ARN messagers (ARNm) cibles et régulant leur traduction et leur stabilité (Rana, 2007). Ils peuvent selon les cas être des facteurs activateurs ou répresseurs (Vasudevan, 2007) (**Figure 17**).

Les miR interviennent dans tous les compartiments cellulaires et participent, au sein du compartiment hématopoïétique, au maintien des CSH et aux processus d'engagement des progéniteurs (Gangaraju, 2009 ; Vasilatou, 2010 ; Arnold, 2011) (**Figure 18**). Ainsi, les

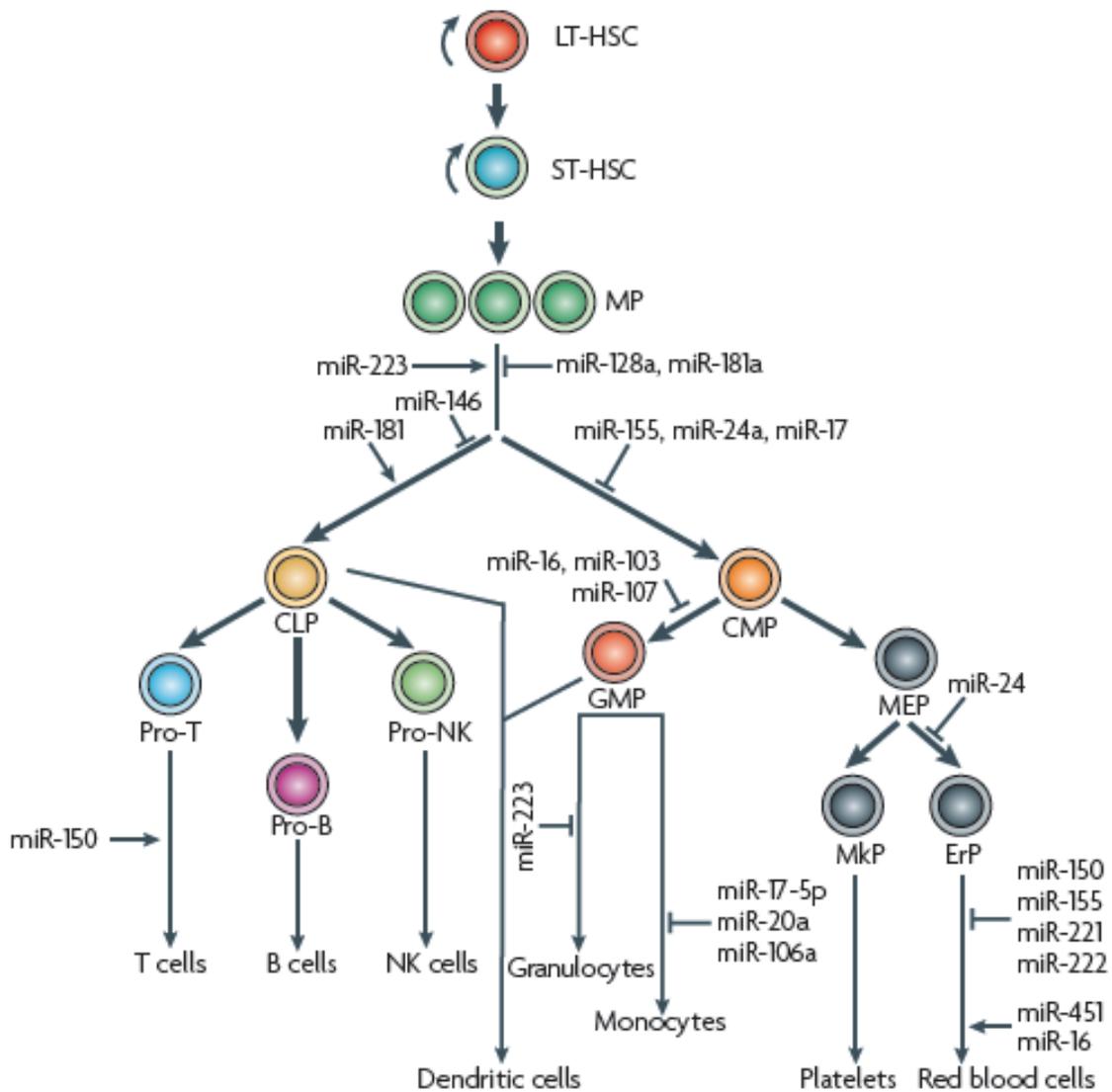


Figure 18 : Régulation de l'hématopoïèse humaine par les microARN

Les microARN interviennent dans la majorité des étapes de différenciation. Leur action régulatrice positive ou négative est représentée, respectivement, par une flèche et une barre en T. D'après Gangaraju, 2009.

**miR-181a** et **128a** inhibent la différenciation des CSH vers tous les lignages hématopoïétiques et régulent positivement leur auto-renouvellement (Georgantas, 2007). Les **miR-223** et **181** régulent la différenciation des MPP en CLP ou CMP, tandis que les **miR-155**, **24a** et **17** bloquent l'engagement vers la voie myéloïde. De nombreux miR ont ensuite été identifiés comme étant des régulateurs dans les processus de différenciation et de maturation des lignées érythro-mégacaryocytaires (**miR-24**, **150**, **155**, **221**, **222**, **451** et **16**), granulo-monocytaires (**miR-223**, **17-5p**, **20a** et **106a**) et lymphocytaire (**miR-150**) (Bruchova, 2007 ; Fontana, 2007 ; Georgantas, 2007 ; Zhou, 2007 ; Wang, 2008).

Le réseau complexe et encore mal connu des facteurs régulateurs présents dans le microenvironnement des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse permet d'assurer un maintien de l'homéostasie hématopoïétique tout au long de la vie d'un individu. Tout dérèglement de ce réseau aura des conséquences sur un ou plusieurs des compartiments de l'hématopoïèse et pourra mener à des hémopathies diverses. En plus de ces facteurs, la composition métabolique du microenvironnement, notamment les faibles concentrations en oxygène observées au sein de la moelle osseuse, représente un des facteurs probablement essentiels au maintien et à la protection des CSH *in vivo*. L'importance de ce facteur oxygène, les voies de signalisation mises en jeu et les conséquences directes sur les cellules hématopoïétiques primitives seront présentées dans la section suivante.

### **III- Importance de l'oxygène dans l'hématopoïèse**

Du fait de l'évolution, le métabolisme des cellules constituant les organismes supérieurs s'est adapté à une oxygénation plus faible que celle de l'air atmosphérique ou de leurs milieux de vie (aérien, aquatique, tellurique...). Ces taux d'oxygénation plus faibles correspondent aux concentrations en oxygène ( $O_2$ ) retrouvées dans les différents tissus en condition physiologique (Massabau, 2000). Ces adaptations ont conditionné l'évolution de systèmes (respiratoire et circulatoire) sophistiqués, assurant un approvisionnement en  $O_2$  adapté à chaque type cellulaire, ainsi que des mécanismes complexes, tels la chaîne respiratoire, nécessitant l' $O_2$  comme accepteur final des électrons (Das, 2006). Cependant, au besoin d' $O_2$  en tant que substrat métabolique, s'ajoutent des risques de dommages liés aux molécules oxydantes (génération de ROS). C'est pourquoi l' $O_2$  cellulaire doit être maintenu dans des intervalles de concentrations étroits qui modulent la balance apport/besoin (Ivanovic, 2009).

Au niveau du compartiment hématopoïétique, les faibles concentrations en  $O_2$  retrouvées au sein de la moelle osseuse régulent les trois équilibres fondamentaux des cellules primitives. Cette régulation est liée à la position des cellules par rapport au gradient d' $O_2$  observé dans ce tissu, mais également au type cellulaire et au degré d'engagement en différenciation (Guitart, 2011). Ainsi, dans cette section seront abordés : les variations de la concentration en  $O_2$  retrouvées au sein de l'organisme, le gradient existant dans la moelle osseuse et son importance dans l'architecture hématopoïétique ; puis les mécanismes d'adaptation et de réponse aux faibles concentrations d' $O_2$  ainsi que leur importance dans la régulation des compartiments hématopoïétiques.

### **III.1- Concentrations physiologiques d'O<sub>2</sub>**

#### **III.1.1- Notion d'hypoxie ou de normoxie *in situ***

L'**hypoxie** - du grec « hupo » (sous) et « oxus » (oxygène) - désigne un état d'oxygénation insuffisant de certains tissus ou de l'organisme entier, ainsi qu'une inadéquation entre les apports et les besoins en O<sub>2</sub>. Le terme « normoxie » désigne quant à lui un état d'oxygénation permettant une activité normale.

De nombreux travaux, notamment ceux liés à l'étude des facteurs de croissance et des cytokines et leurs conséquences sur les réponses cellulaires, sont basés sur des expériences réalisées majoritairement à 20-21% d'O<sub>2</sub> (concentration d'O<sub>2</sub> atmosphérique). Ces concentrations représentent en réalité des conditions qui pourraient être qualifiées d'hyperoxiques (Ivanovic, 2009). Les conditions mettant en jeu des concentrations plus faibles d'O<sub>2</sub> sont, par référence à cette concentration atmosphérique, communément qualifiées d'hypoxiques et ce malgré leur possible réalité physiologique. En effet, les concentrations physiologiques d'O<sub>2</sub> dans les différents tissus de l'organisme sont toujours retrouvées inférieures à celle de l'atmosphère.

Ainsi, des travaux récents préconisent, à l'instar du terme « hypoxie », l'utilisation des termes « normoxie *in situ* » ou « faibles concentrations en O<sub>2</sub> » lors de travaux utilisant des conditions d'oxygénation correspondant à celles observées physiologiquement dans les tissus (Chow, 2001 ; Hemphill, 2005 ; Guitart, 2011). Au contraire, le terme d'hypoxie pourra être préféré pour qualifier des conditions locales d'oxygénation inférieures à la normale et impliquant des conséquences pathologiques (Chiche, 2010 ; Semenza, 2010).

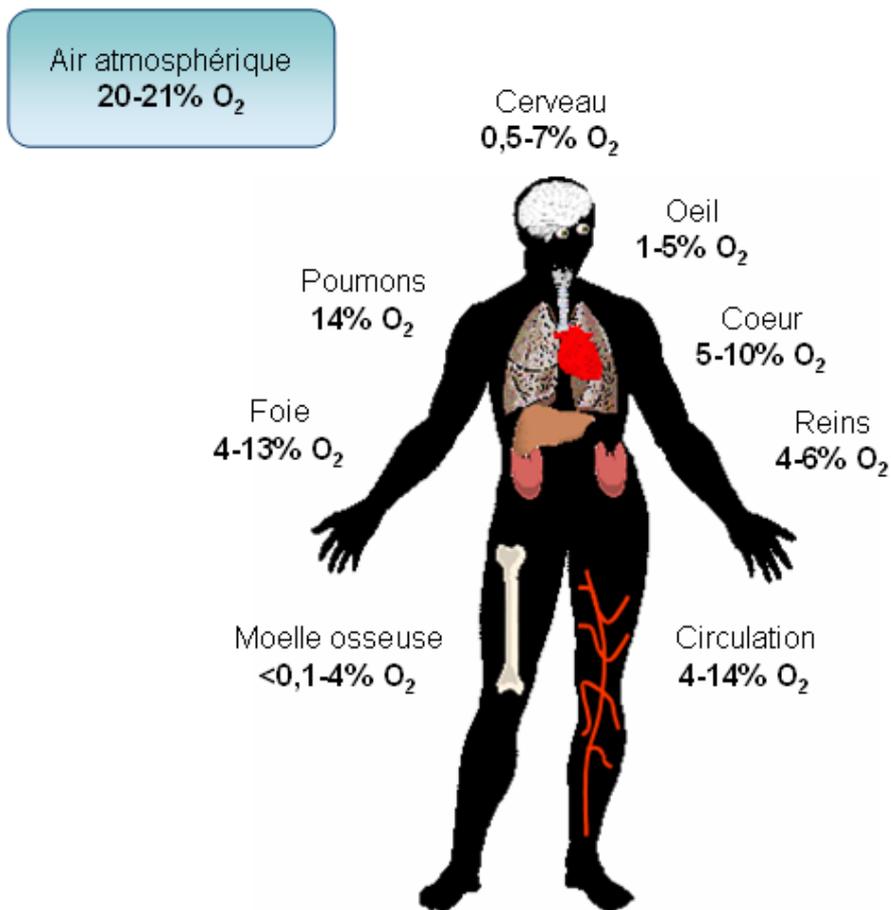


Figure 19 : Concentration d' $O_2$  dans les principaux organes du corps humain

Adapté d'après Hermitte, 2005.

### **III.1.2- Distribution de l'O<sub>2</sub> dans l'organisme**

#### *III.1.2.a- Concentration tissu-dépendante*

Chez l'homme, la concentration en O<sub>2</sub> varie de manière significative entre les différents organes ou au sein d'un même organe : dans le parenchyme pulmonaire et la circulation (McKinley, 1999 ; Saltzman, 2003 ; Johnson, 2005 ; Wild, 2005), ainsi que dans les organes fortement irrigués comme le foie, les reins et le cœur (Wölfle, 1985 ; Jungermann, 1997 ; Roy, 2000 ; Welch, 2001 ; Mik, 2004), la concentration d'O<sub>2</sub> est comprise entre 4 et 14% (**Figure 19**). Dans les autres tissus, relativement moins bien irrigués, la concentration en O<sub>2</sub> est souvent plus faible : elle varie de 0,5 à 7% dans le cerveau (Whalen, 1970 ; Nwaigwe, 2000 ; Hemphill, 2005), de 1 à 5% dans l'œil (Buerck, 1993 ; Yu, 2005) et de moins de 0,1 à 4% dans la moelle osseuse (Tondevold, 1979 ; Chow, 2001).

#### *III.1.2.b- Gradient d'O<sub>2</sub> et compartiments hématopoïétiques*

Récemment, différentes études ont permis d'établir que les CSH résident, au sein de la moelle osseuse, dans les zones où les concentrations en O<sub>2</sub> sont les plus basses (Cipolleschi, 1993 ; Parmar, 2007 ; Kubota, 2008 ; Takubo, 2010). Au cours de leur différenciation, les progéniteurs et les précurseurs migrent vers des zones plus vascularisées de la cavité médullaire et, en fin de maturation, les cellules sanguines matures atteignent la circulation sanguine (Guitart, 2010). Ainsi, l'organisation des différents compartiments hématopoïétiques semble être directement liée au gradient d'O<sub>2</sub> observé au sein de la moelle osseuse (**Figure 20**). Bien que non totalement établis, les mécanismes de tolérance des CSH aux faibles concentrations d'O<sub>2</sub> nécessitent des adaptations métaboliques importantes (Simsek, 2010), décrites dans la section suivante. Nous verrons également que ces faibles concentrations en O<sub>2</sub> représentent un facteur clé, essentiel au maintien des fonctions des CSH.

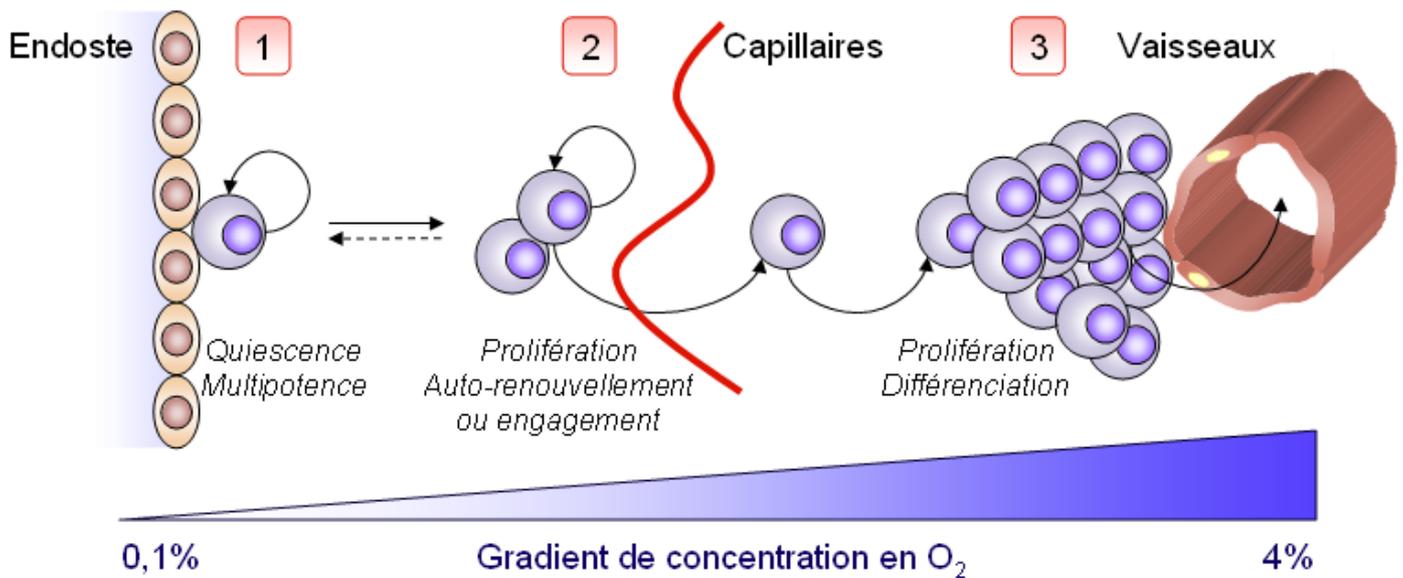


Figure 20 : Localisation des compartiments hématopoïétiques dans la moelle osseuse en fonction du gradient d'O<sub>2</sub>

**1-** CSH quiescentes au sein de la niche endostéale. **2-** CSH, non quiescentes, s'auto-renouvelant ou s'engageant au sein de la niche vasculaire. **3-** Progéniteurs et précurseurs en prolifération active, différenciation ou maturation. La balance régulant le maintien, la quiescence et l'engagement des CSH est régulée par la concentration d'O<sub>2</sub>. La flèche en pointillé schématise la réversibilité entre état quiescent et cycle actif. Adapté d'après Guitart, 2010.

## **III.2- Adaptation et réponse aux basses concentrations d'O<sub>2</sub>**

Les faibles concentrations en O<sub>2</sub> activent les facteurs de transcription **HIF** (Hypoxia Inducible Factor), qui représentent les principaux médiateurs du signal lié aux variations de la concentration d'O<sub>2</sub>. Initialement décrits comme des régulateurs de la production d'EPO (Wang, 1993), la caractérisation de ces facteurs a permis de mettre en évidence leur présence ubiquitaire et de comprendre par quels mécanismes l'O<sub>2</sub> régule l'hématopoïèse.

### **III.2.1- Présentation des facteurs de transcription HIF**

HIF est un hétérodimère de protéines bHLH/PAS (basic Helix-Loop-Helix/Per-ARNT-Sim). Il est constitué d'une sous-unité  $\beta$  - **HIF-1 $\beta$**  ou ARNT (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) - stable et insensible aux variations d'O<sub>2</sub> et d'une sous-unité  $\alpha$  - présentant trois isoformes (**HIF-1 $\alpha$** , **-2 $\alpha$**  et **-3 $\alpha$** ) - dont le taux varie avec la concentration cellulaire d'O<sub>2</sub> via des mécanismes de dégradation ou d'inactivation. Lorsque HIF $\alpha$  est stabilisée, elle est transloquée dans le noyau et s'associe à HIF $\beta$ . Le complexe ainsi formé reconnaît des séquences spécifiques de certains gènes cibles - séquences 5'-RCGTG-3' ou **HRE** (Hypoxia Response Elements) - et recrute des protéines partenaires modulant son activité (Kaelin, 2008). Bien que la structure, la régulation et les fonctions des isoformes de la sous-unité  $\alpha$  semblent similaires, chacune possède ses propres caractéristiques.

#### *III.2.1.a- Expression des sous-unités du HIF*

**HIF-1 $\alpha$**  est la sous-unité la mieux connue et la plus décrite dans la littérature. Elle est exprimée de manière ubiquitaire chez les mammifères et six variants d'épissage ont à ce jour été mis en évidence. Son mode de régulation par l'O<sub>2</sub> a été décrit peu après sa découverte (Huang, 1998). Au contraire, **HIF-2 $\alpha$**  - également nommé EPAS (Endothelial PAS protein), HLF (HIF-1 Like Factor) ou HRF (HIF-Related Factor) - et **HIF-3 $\alpha$**  - ou MOP7 (Member Of PAS superfamily 7) - présentent des distributions plus restreintes au niveau des tissus. Chez

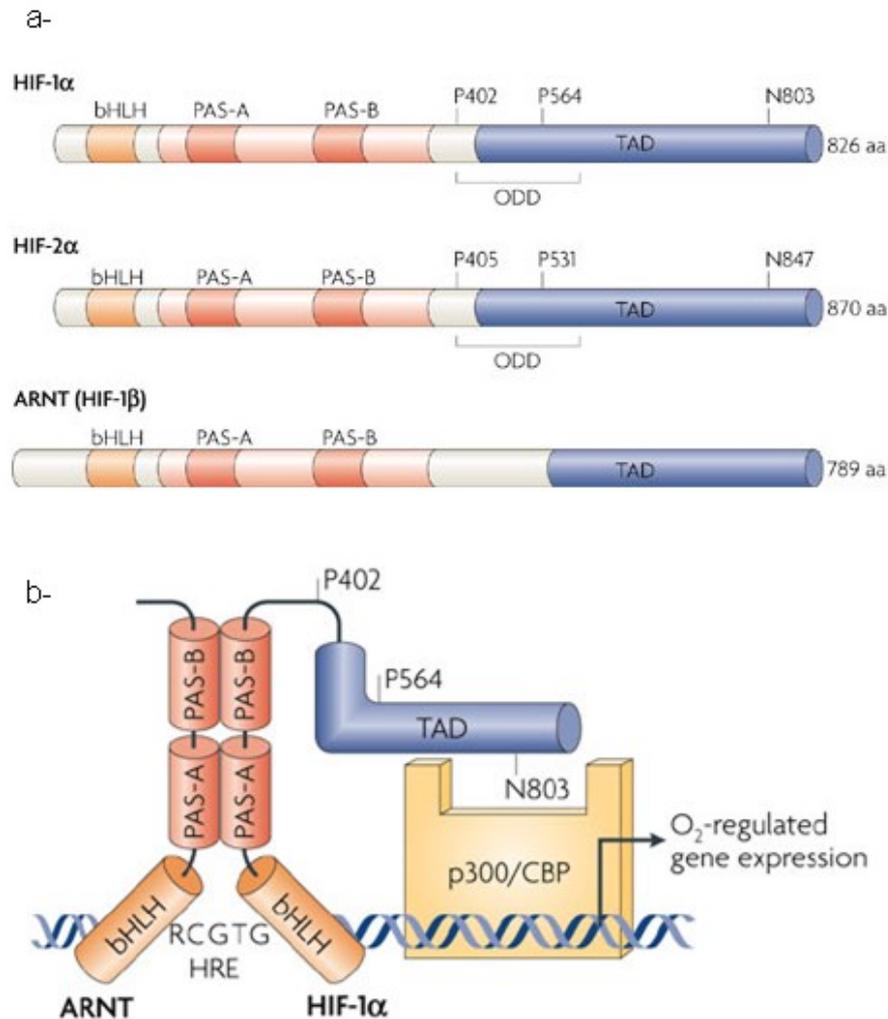


Figure 21 : Homologies de séquences des sous-unités de HIF et liaison à l'ADN

**a-** Présentation des différents domaines des sous-unités HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$ . Les prolines intervenant dans les phénomènes de dégradation sont figurées sur les deux premières sous-unités. **b-** Importance des domaines PAS et bHLH dans l'hétérodimerisation et la liaison à l'ADN au niveau des séquences HRE spécifiques. p300 et CBP sont des co-activateurs recrutés lors de la liaison de l'hétérodimère à l'ADN. D'après Simon, 2008.

l'adulte, HIF-2 $\alpha$  est exprimé dans le poumon, les cellules interstitielles du rein, les cellules du parenchyme du foie et les cellules des crêtes neurales (Tian, 1997 ; Jain, 1998 ; Wiesener, 2003). L'expression de HIF-3 $\alpha$  est restreinte au thymus, au cœur, au poumon, au rein, aux cellules de Purkinje et à l'épithélium de la cornée (Gu, 1998 ; Makino, 2002).

HIF-1 $\beta$  est exprimée de manière constitutive et ubiquitaire. Trois paralogues de HIF-1 $\beta$  ont été décrites (ARNT1, 2 et 3). ARNT2 et ARNT3 participent majoritairement aux régulations indépendantes de l'O<sub>2</sub> et interviennent, respectivement, dans le développement de l'hypothalamus et dans la régulation des rythmes circadiens (Bunger, 2000 ; Keith, 2001).

### *III.2.1.b- Structure des sous-unités*

Malgré la diversité de chacune des sous-unités, de nombreuses homologies de séquence subsistent entre celles-ci (**Figure 21, a**). En plus d'un domaine **bHLH** impliqué dans la liaison à l'ADN, elles présentent deux domaines **PAS** de 100-120 acides aminés, désignés PAS-A et PA-B, qui sont nécessaires pour l'hétérodimérisation avec la sous-unité  $\beta$  et la liaison à l'ADN (**Figure 21, b**). Les domaines PAS peuvent être les médiateurs de signaux environnementaux grâce à une liaison directe avec des ligands ou avec d'autres co-facteurs (Gu, 2000). En plus de ces domaines, elles partagent un domaine de dégradation dépendant de la concentration d'O<sub>2</sub> (**ODDD**), ainsi que deux domaines de transactivation : le domaine d'activation N-Terminal (**N-TAD**) et C-Terminal (**C-TAD**), tous deux localisés dans le domaine **TAD** et pouvant interagir avec des co-facteurs, tel p300/CBP (Pugh, 1997).

Cette homologie de séquence confère des propriétés communes à HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  (Hu, 2003). Ainsi, les deux sous-unités dimérisent avec l'ARNT, sont déstabilisées de la même manière en présence d'O<sub>2</sub> et leur activité transcriptionnelle en C-TAD est régulée par le facteur **FIH** (Factor Inhibiting HIF) (Mahon, 2001). Parallèlement, les facteurs HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  régulent l'activité de gènes communs et de gènes spécifiques à chacun d'eux.

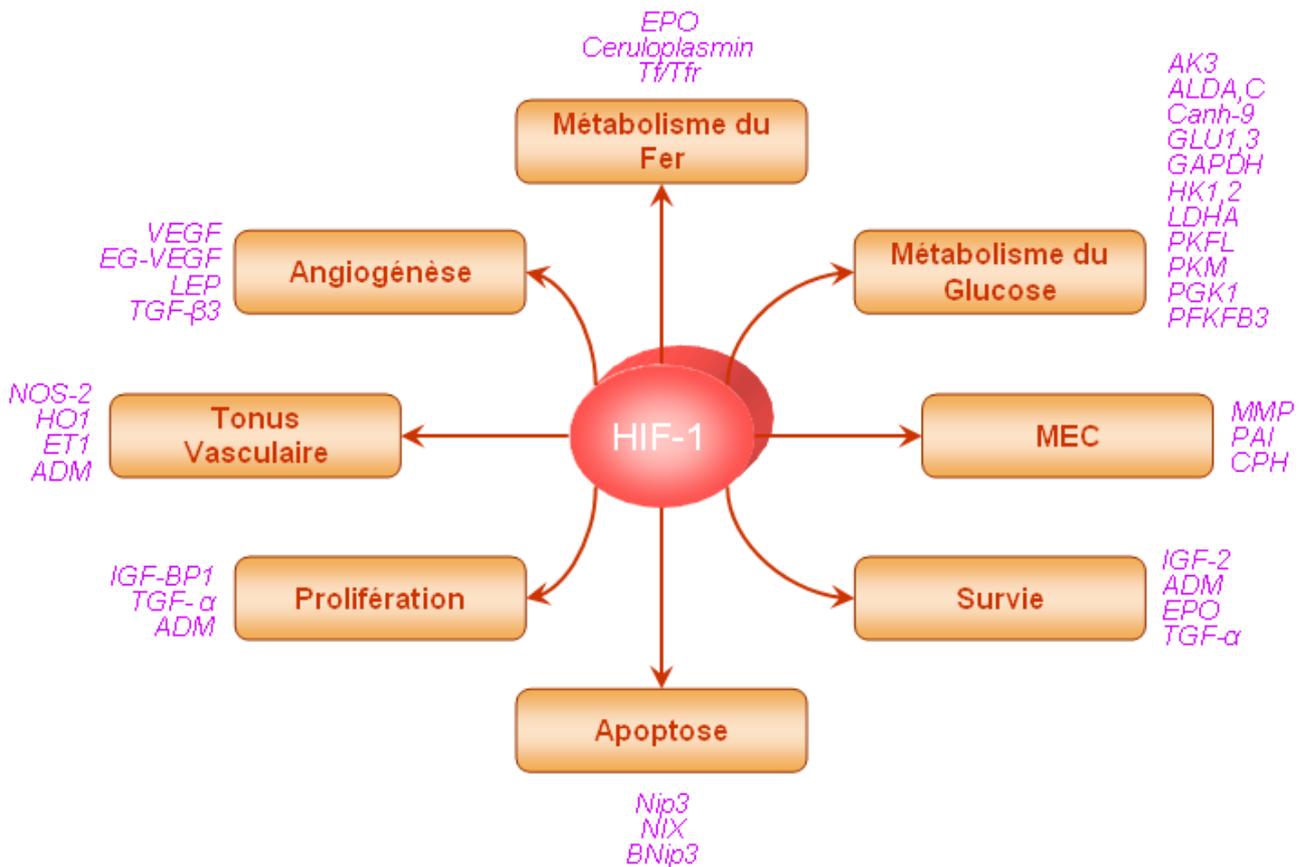


Figure 22 : Principaux gènes cibles de HIF-1 et fonctions biologiques associées

**ADM** : Adrénoméduline ; **AK3** : Adenylate kinase-3 ; **ALDA,C** : Aldolase-A,C ; **BNip3** : Bcl-2/adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3 ; **Canh-9** : Carbonic anhydrase-9 ; **CPH** : Collagen Prolyl Hydroxylase ; **EG-VEGF** : Endocrine-Gland-Derived VEGF ; **ENO1** : Enolase-1 ; **EPO** : Erythropoïétine ; **ET1** : Endotheline 1 ; **GAPDH** : Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase ; **GLU1,3** : Glucose transporter-1,3 ; **HK1,2** : Hexokinase ; **HO1** : Hème Oxygénase 1 ; **IGF2** : Insulin Growth Factor 2 ; **LDHA** : Lactate dehydrogenase-A ; **LEP** : Leptine ; **MMP** : Matrix MetalloProteinases ; **NIX** : Nip3-like protein X ; **NOS2** : Nitric Oxide Synthase ; **PAI** : Plasminogen Activator receptors and inhibitors ; **PFKFB3** : 6-phosphofructo-2-kinase/gructose-2,6-bisphosphate-3 ; **PFKL** : Phosphofructokinase L ; **PGK1** : Phosphoglycerate kinase 1 ; **PKM** : Pyruvate kinase M ; **Tf/Tfr** : Transferrine et Récepteur à la Transferrine ; **TGF-α** : Transforming Growth Factor-α ; **TGF-β3** : Transforming Growth Factor-β3 ; **VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor.

Adapté d'après Ke, 2006.

### *III.2.1.c- Cibles potentielles et voies de signalisation dépendantes de HIF*

Diverses études ont montré que plus ou moins 2% de tous les gènes humains sont régulés par HIF-1, directement ou indirectement (Mazure, 2004 ; Manalo, 2005). Ces cibles sont impliquées dans un large éventail de fonctions physiologiques, notamment l'érythropoïèse et le métabolisme du fer, l'angiogenèse, le métabolisme du glucose, la prolifération et la survie cellulaire, ainsi que l'apoptose (**Figure 22**). Une majorité de ces fonctions est en lien direct avec la régulation des compartiments hématopoïétiques, comme nous le verrons plus tard. En amont de ces modulations, les facteurs HIF sont régulés via des mécanismes variés et complexes. Ces mécanismes, liés à l'environnement ou à des interactions protéines/protéines, sont essentiels à l'activation spécifique de HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$ .

### **III.2.2- Régulation des facteurs de transcription HIF**

#### *III.2.2.a- Régulation dépendante de l'O<sub>2</sub>*

Les sous-unités HIF $\alpha$  sont constitutivement transcrites et traduites dans les cellules. Cependant, en présence de concentrations d'O<sub>2</sub> supérieures à 5%, elles présentent des demi-vies très courtes (inférieures à 5 minutes) et des concentrations intracellulaires très faibles (Huang, 1996 ; Yu, 1998). Ce processus de dégradation rapide est assuré par des prolyl-hydroxylases (**PHD**, pour revues Kaelin, 2005 ; Schofield, 2004). Les PHD, présentes sous trois formes (Semenza, 2001), hydroxylent un ou plusieurs résidus prolines au sein du domaine ODDD. Ceci entraîne la formation d'un site de liaison pour la protéine suppresseur de tumeur von Hippel-Lindau (**pVHL**), un composant du complexe E3-ubiquitine-ligase (Srinivas, 1999 ; Masson, 2001 ; Masson, 2003). HIF $\alpha$  ainsi polyubiquitinylée est alors dégradée par le protéasome. Lorsque les concentrations d'O<sub>2</sub> sont basses, l'hydroxylation via les PHD est supprimée, HIF $\alpha$  s'accumule et dimérise avec la sous-unité  $\beta$ , activant ainsi en aval les gènes cibles spécifiques (**Figure 23, a**).

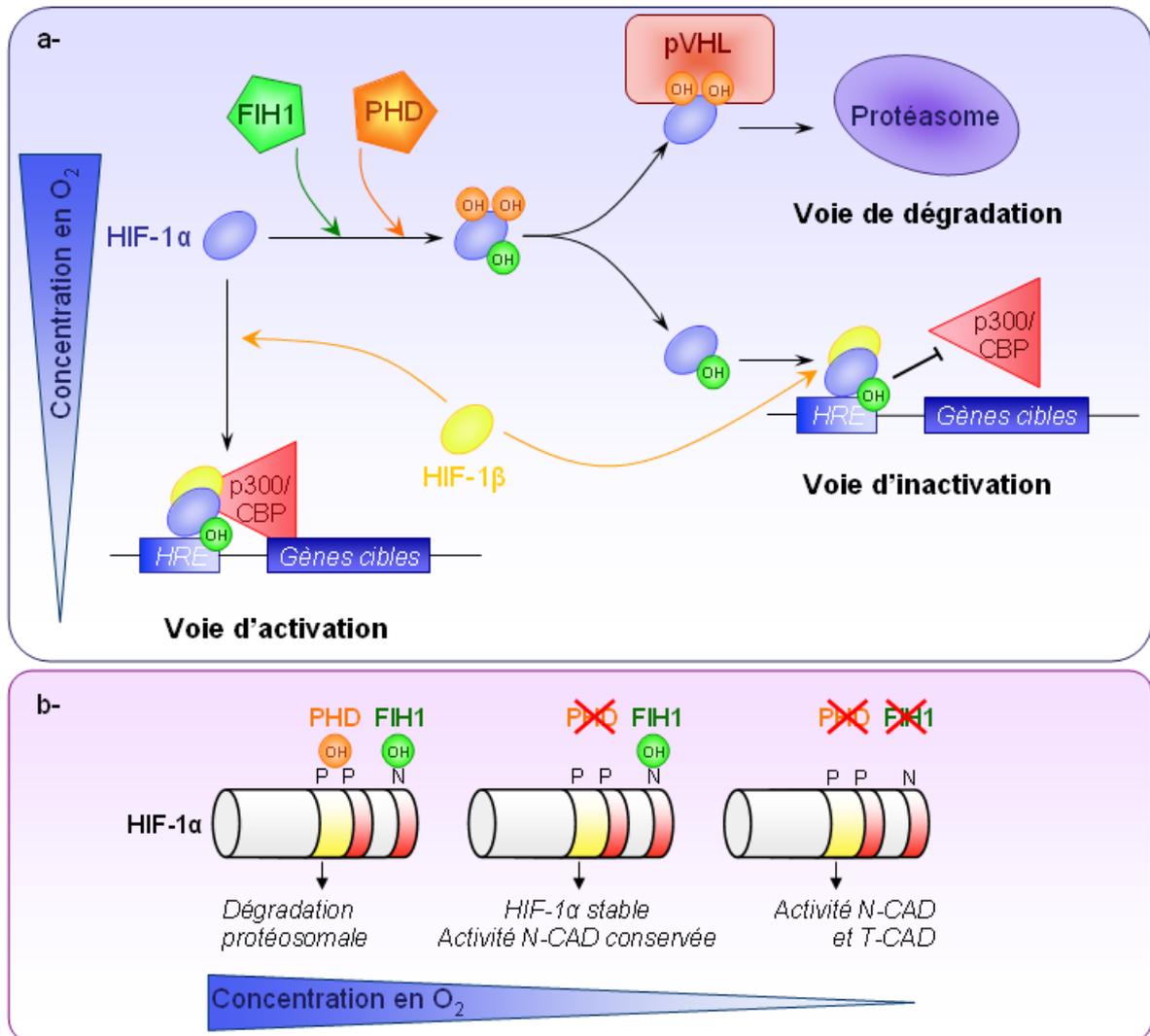


Figure 23 : Régulation de HIF-1 $\alpha$  via les PHD et FIH-1

**a-** Selon la concentration en  $O_2$ , HIF-1 $\alpha$  peut soit être dégradé via pVHL et le protéasome, soit être inactivée en partie via FIH-1, soit s'hétérodimeriser avec HIF-1 $\beta$  et activer ainsi la transcription de gènes cibles suite à la liaison de HIF1 aux séquences HRE. **b-** Régulation des activités spécifiques des PHD et de FIH-1 en fonction de la disponibilité en  $O_2$ .

Adapté d'après Lisy, 2008 ; Berchner-Pfannschmidt, 2010.

Une seconde régulation des sous-unités  $\alpha$  est assurée via le silencing de leur domaine C-TAD. En présence d' $O_2$ , ce domaine est hydroxylée, au niveau d'un résidu asparagine, via l'asparaginyl-hydroxylase **FIH-1** qui utilise l' $O_2$  et le 2-oxoglutarate (2-OG) comme co-substrats (Mahon, 2001 ; Hewitson, 2002 ; Lando, 2002). Cette hydroxylation inhibe l'association du domaine C-TAD avec les co-activateurs essentiels p300/CBP, inhibant ainsi l'activité transcriptionnelle de ce domaine. Lorsque la disponibilité en  $O_2$  est limitée, FIH-1 est incapable de catalyser l'hydroxylation de C-TAD, permettant sa liaison à p300/CBP et la transactivation des gènes cibles (**Figure 23, a**). Des études *in vitro* ont montré que FIH-1 possède une affinité pour l' $O_2$  plus forte que celle des PHD (Koivunen, 2004). De ce fait un modèle d'inhibition de ces deux facteurs lié à la disponibilité en  $O_2$  a été proposé (Stolze, 2004) (**Figure 23, b**).

Deux autres mécanismes de régulation dépendants de la concentration d' $O_2$  interviennent au niveau post-traductionnel. Le premier mécanisme fait intervenir l'acétylation du résidu lysine 532 (**Lys532**) du domaine ODDD de HIF-1 $\alpha$  via l'acétyltransférase **ARD-1** (ARrest Defective-1) (Jeong, 2002). Cette acétylation favorise l'interaction de HIF-1 $\alpha$  avec pVHL. Notons qu'une augmentation de l'état acétylé de HIF-1 $\alpha$  par l'acide butyrique, un inhibiteur de déacétylase, entraîne une diminution du niveau protéique de HIF-1 $\alpha$  (Kim, 2001). Bien que l'activité des acétyltransférases ne soit pas influencée par la concentration en  $O_2$ , les niveaux d'ARNm et de protéine ARD-1 sont diminués dans des conditions de faible oxygénation, entraînant une diminution de l'acétylation de HIF-1 $\alpha$  en comparaison avec des conditions d'oxygénation élevées (Jeong, 2002 ; Ke, 2006). Le second mécanisme fait intervenir les protéines **SUMO** (Small Ubiquitin-related Modifier), au niveau des résidus Lys391, 477 et 532, entraînant des modifications de son activité transcriptionnelle. Malgré l'évidence de la sumoylation de HIF $\alpha$  les conséquences sur sa stabilité sont controversées (Carbia-Nagashima, 2007 ; Cheng, 2007). SUMO1 est inductible par les faibles

concentrations d'O<sub>2</sub>, suggérant que la sumoylation de HIF $\alpha$  modifie la réponse à ces conditions (Comerford, 2003 ; Lee, 2007).

Enfin, les résultats des travaux concernant l'impact des ROS dans la modulation de l'activité de HIF sont controversés. Les ROS sont constitués de petites molécules issues de réactions d'oxydoréduction à partir de l'O<sub>2</sub>: l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> (anion superoxyde), l'OH $\cdot$  (radical hydroxyle) et l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peroxyde d'hydrogène) en sont les plus caractéristiques (Genestra, 2007). Selon certains, ils pourraient moduler le taux d'hydroxylation de HIF $\alpha$  (Kaelin, 2008) et les différents acteurs environnementaux ou pharmacologiques régulant leur augmentation ou leur diminution favoriseraient, respectivement, l'accumulation ou la réduction des quantités de HIF $\alpha$  (Brunelle, 2005 ; Guzy, 2005 ; Mansfield, 2005). D'autres au contraire ne constatent aucun effet concernant la stabilité de HIF via la modulation par les ROS (Tuttle, 2007). Parallèlement, les facteurs HIF modulent eux aussi la quantité de ROS intracellulaires. L'inhibition de HIF-1 $\alpha$  a pour effet d'augmenter les quantités de ROS et son activation module positivement l'activité de Foxo3a, entraînant l'augmentation de la quantité de ROS intracellulaires (Miyamoto, 2007). L'importance des ROS et leur intervention dans la régulation des compartiments hématopoïétiques seront développées dans la prochaine section.

### *III.2.2.b- Régulation indépendante de l'O<sub>2</sub>*

La régulation de la stabilité de HIF $\alpha$  est également modulée par des voies indépendantes de la concentration d'O<sub>2</sub> (Lisy, 2008). Notons, premièrement, que la **phosphorylation** est connue pour jouer un rôle crucial dans le contrôle de l'activité protéique. La phosphorylation directe de HIF-1 $\alpha$ , via la voie **MAPK** (Mitogen-Activated Protein Kinase), a ainsi été décrite comme activatrice de son activité (Richard, 1999 ; Sodhi, 2000 ; Minet, 2001). Les kinases p42/44 et p38 sont capables de phosphoryler HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  *in vitro* (Hur, 2001) et des expériences de transfection avec des formes actives de p42/44 stimulent

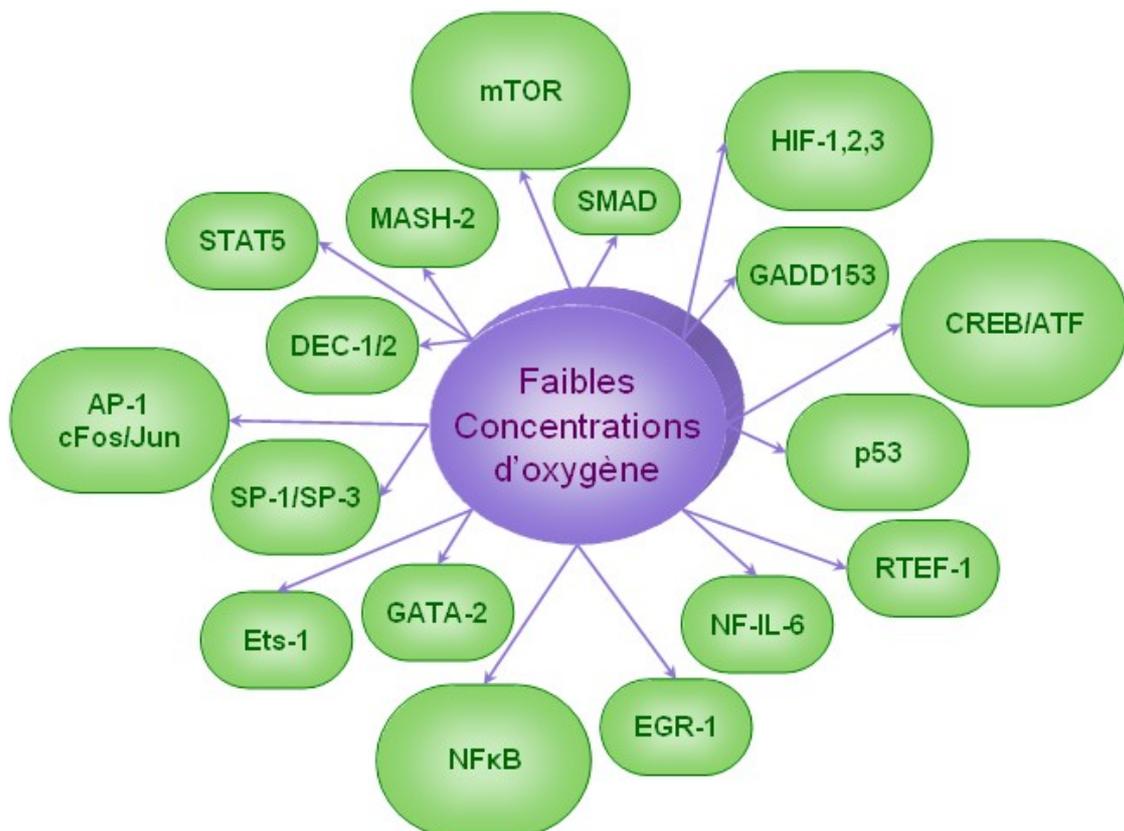


Figure 24 : Principaux facteurs de transcription impliqués dans la réponse aux faibles concentrations d'O<sub>2</sub>

**AP-1** : Activator-Protein-1 ; **DEC-1/2** : Deficiently Expressed in Chondrocytes-1/2 ; **CREB/ATF** : Cyclic Responsive Element/Activating Transcription Factor ; **EGR-1** : Erly Growth Response-1 ; **GADD153** : Growth Arrest and DNA Damage 153 ; **GATA2** : Gata-Binding protein-2 ; **MASH-2** : Mammalian Achaete-Scute Homologous protein 2 ; **mTOR** : mammalian Target Of Rapamycin ; **NF-IL-6** : Nuclear Factor for Interleukin-6 ; **NFκB** : Nuclear Factor-κB ; **RTEF-1** : Related Transcriptional Enhancer Factor-1 ; **STAT5** : Signal Transducer and Activator of Transcription-5.

Adapté d'après Cummins, 2005.

l'activité transcriptionnelle de HIF-1 $\alpha$ , sans affecter sa stabilité. Il a ainsi été proposé que HIF-1 $\beta$  se lierait préférentiellement avec les formes phosphorylées de HIF-1 $\alpha$  (Suzuki, 2001).

Un deuxième mécanisme de régulation met en jeu la **nytroxylation** de HIF-1 $\alpha$  au niveau du résidu Cys800 via un mécanisme mettant en jeu l'oxyde nitrique (**NO**). Ceci entraîne une modification de l'interaction entre HIF-1 $\alpha$  et ses différents co-facteurs, assurant une augmentation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 $\alpha$  (Sumbayev, 2003 ; Yasinska, 2003). NO intervient également dans l'inhibition des PHD de manière irréversible, par liaison de manière compétitive avec l'O<sub>2</sub> au niveau du site catalytique de ces enzymes (Metzen, 2003 ; Tug, 2009). Au contraire, l'inhibition de l'hydroxylation de HIF-1 $\alpha$  par NO est réversible *in vivo* en condition d'oxygénation faible ou élevée (Berchner-Pfannschmidt, 2007). Pour finir, l'activité de FIH-1 est également réduite par NO (Metzen, 2003).

Notons que certains facteurs environnementaux (pour revue Ke, 2006), régulent également la stabilité de HIF-1, tels le nickel et le cobalt, ainsi que des facteurs de croissance et des cytokines (IL-1, PDGF [Platelet-Derived Growth Factor]). Enfin, la régulation de HIF $\alpha$  dépend de son interaction avec différents partenaires protéiques pouvant moduler soit son activité de transcription, soit sa stabilité. En plus de p300/CBP, précédemment étudié, de nombreux autres partenaires ont été identifiés (pour revue Wenger, 2005).

### **III.2.3- Les autres acteurs de l'adaptation aux faibles concentrations d'O<sub>2</sub>**

Malgré l'importance de HIF, des voies de signalisation indépendantes de ce facteur sont également essentielles dans la réponse et l'adaptation cellulaires aux faibles concentrations d'O<sub>2</sub>. De nombreux facteurs de transcription ont ainsi été proposés comme acteurs de cette réponse (**Figure 24**). Nous ne ferons ici que citer les plus importants en proposant quelques références bibliographiques aux lecteurs intéressés : la protéine p53 (Hammond, 2006), le facteur mTOR (Toschi, 2008), l'AP-1 (Hoffmann, 2001), le NF $\kappa$ B (Koong, 1994), ou encore le facteur SP-1 (Song, 2009).

### **III.3- CSH et basses concentrations d'oxygène**

Comme nous l'avons vu précédemment, les CSH résident, *in vivo*, au niveau de niches spécialisées de la moelle osseuse et les différents compartiments hématopoïétiques s'organisent selon un gradient d'O<sub>2</sub> allant de 0,1 à 4% (Cipolleschi, 1993 ; Chow, 2001 ; Parmar, 2007 ; Kubota, 2008). La majorité des CSH est quiescente *in vivo* (Ogawa, 1993 ; Gunsilius, 2001) et le maintien de leur auto-renouvellement et de leur capacité de greffe à long terme est régulé par ces faibles concentrations d'O<sub>2</sub> (Bonnet, 2002 ; Ivanovic, 2009 ; Levesque, 2011). De nombreux travaux, réalisés à faible concentration d'O<sub>2</sub>, ont permis de caractériser l'influence de ce paramètre sur le maintien, la survie et l'expansion des CSH et de déterminer l'importance de combinaisons cytokiniques dans ces processus. Une revue détaillée des travaux de cultures de CSH en condition de faible oxygénation, réalisés au cours de ces 20 dernières années, est présentée ci-après. L'intervention du HIF au niveau des CSH, la compréhension de l'impact des ROS et les modifications du métabolisme de ces cellules seront également discutées.

#### **III.3.1- Influence des faibles concentrations d'O<sub>2</sub> sur les cultures de CSH**

Dès la fin des années 70, les premiers travaux liés à la préservation en culture de cellules primitives issues de moelle osseuse de souris, en condition de faibles oxygénation, ont permis d'observer un maintien des CFC de divers lignages hématopoïétiques (Bradley, 1978 ; Rich, 1982 ; Rich, 1986). Ces effets bénéfiques sur le maintien des CFC ont été confirmés par la suite avec des cellules humaines issues de moelle osseuse ou de sang placentaire (Broxmeyer, 1989 ; Broxmeyer, 1990 ; Koller, 1992). De plus, la culture à 5% d'O<sub>2</sub> de cellules CD34<sup>+</sup> mobilisées dans le sang périphérique montre une augmentation du nombre de CFU-Mk, en comparaison avec des cultures faites à 20% d'O<sub>2</sub> qui, elles, favorisent la maturation mégacaryocytaire et la formation de plaquettes (Katahira, 1987 ;

Mostafa, 2000 ; Mostafa, 2001). L'ensemble de ces travaux, menés principalement à des concentrations allant de **5 à 10% d'O<sub>2</sub>**, a ainsi permis d'établir l'importance de l'influence de l'oxygène sur les cellules hématopoïétiques les plus primitives. Il est important de noter que, pour de telles concentrations d'O<sub>2</sub>, HIF $\alpha$  est probablement déstabilisé via les mécanismes précédemment cités et que les effets observés pourraient être indépendants de celui-ci.

Les premiers travaux explorant directement le rôle et les mécanismes d'action des basses concentrations d'O<sub>2</sub> sur les CSH ont été réalisés par l'équipe de Dello Sbarba (Dello Sbarba, 1987 ; Cipolleschi, 1993). Des collaborations de notre groupe avec cette équipe ont permis de montrer que des cultures de 4 à 7 jours, réalisées entre **3 et 1,5% d'O<sub>2</sub>**, assuraient un meilleur maintien des populations de pré-CFC et de SRC (SCID Repopulating Cells), comparativement aux cultures réalisées à 20% d'O<sub>2</sub>. Aucune différence d'expansion des CFC n'a cependant été observée entre ces différentes conditions d'oxygénation (Danet, 2003 ; Ivanovic, 2004). D'autre part, la culture entre 1,5 et 5% d'O<sub>2</sub> de cellules CD34<sup>+</sup> de sang périphérique et de moelle osseuse a permis, comparativement à 20% d'O<sub>2</sub>, d'augmenter spécifiquement l'amplification des progéniteurs érythroïdes, d'accélérer leur prolifération, leur différenciation et la maturation des précurseurs érythroïdes (Vlaski, 2009).

Des concentrations plus faibles encore, de l'ordre de **1% d'O<sub>2</sub>**, influencent l'érythropoïèse *in vitro* (Cipolleschi, 1997), préservent les CSH les plus primitives mieux qu'à 20% d'O<sub>2</sub> et limitent l'amplification des CFC chez la souris (Cipolleschi, 1993 ; Ivanovic, 2000a ; Ivanovic, 2002) et chez l'homme (Ivanovic, 2000b). Des données contradictoires, ne montrant aucune différence dans la préservation de la capacité de greffe des cellules suite à leur culture à 20 et 1% d'O<sub>2</sub>, ont cependant été apportées (Eliasson, 2010).

Enfin, pour des concentrations d'O<sub>2</sub> proches de l'anoxie (**0,1% d'O<sub>2</sub>**), les cellules CD34<sup>+</sup> issues de sang placentaire stoppent leur prolifération et entrent en quiescence

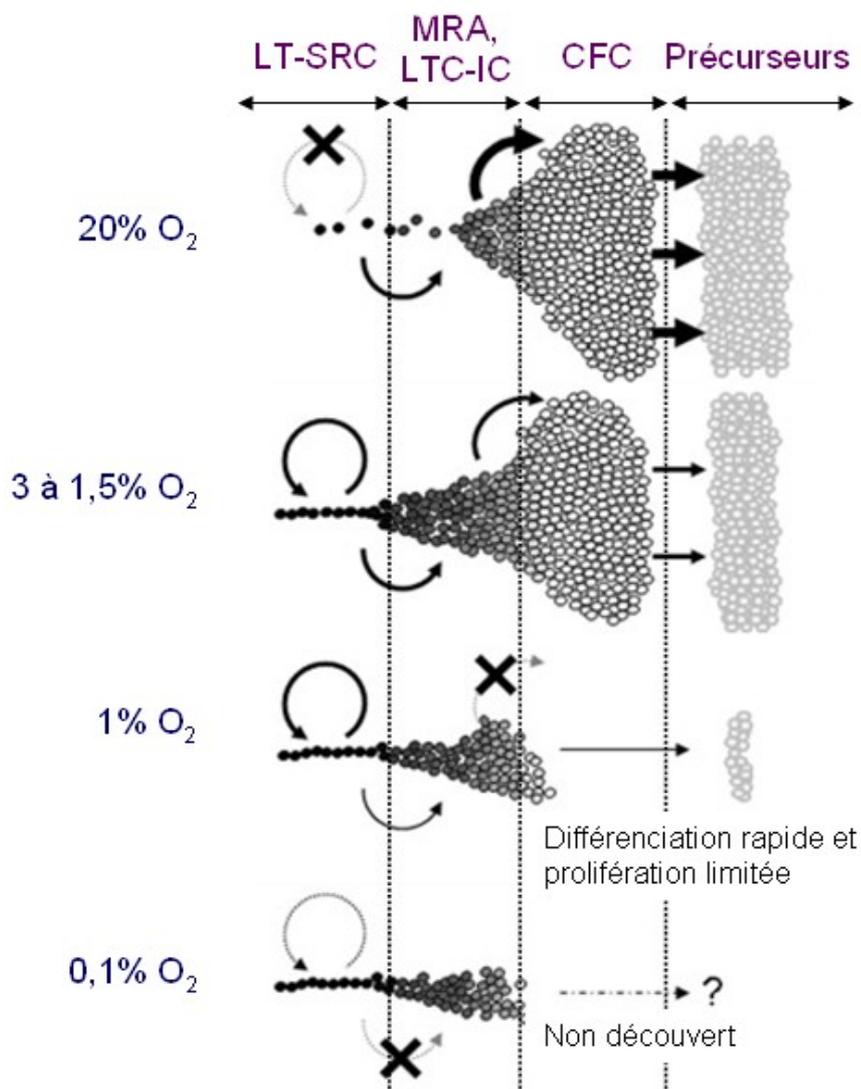


Figure 25 : Influence de la concentration en  $O_2$  *in vitro* sur les différents compartiments hématopoïétiques humains

La concentration atmosphérique d' $O_2$  (20%, supra-physiologique) induit une prolifération importante des CSH, leur différenciation rapide en progéniteurs et la perte de leur capacité de greffe qui signe la disparition des CSH pluripotentes capables d'auto-renouvellement. Une concentration intermédiaire d' $O_2$  (3 à 1,5%) permet à la fois le maintien des CSH et une expansion de progéniteurs engagés. Une concentration basse d' $O_2$  (1%) ralentit, sans la bloquer, la prolifération des CSH, inhibe leur différenciation et favorise leur auto-renouvellement. Une concentration d' $O_2$  très basse (0,1%, similaire à celle des niches endostéales) empêche les cellules  $CD34^+$  en  $G_0$  d'entrer dans les phases actives du cycle cellulaire, ramène en  $G_0$  après division celles qui cyclent et préserve leur capacité de greffe sans induire d'apoptose. Adapté d'après Guitart, 2010.

(Hermitte, 2006). Après trois jours de culture dans de telles conditions, le nombre de progéniteurs est préservé, ainsi que la capacité de greffe de ces cellules. L'influence des différentes conditions d'oxygénation sur les compartiments hématopoïétiques est illustrée dans la **Figure 25**, qui schématise les résultats cités précédemment.

Ainsi, les cultures *in vitro* de cellules issues de sources variées ont montré que la faible oxygénation était essentielle au maintien des fonctions des CSH *in vivo* (Koller, 1992 ; Cipolleschi, 1993 ; Danet, 2003 ; Parmar, 2007 ; Lo Celso, 2009 ; Eliasson, 2010).

### **III.3.2- Importance des cytokines lors de cultures à faible concentration d'O<sub>2</sub>**

D'autres facteurs environnementaux sont nécessaires, en combinaison avec les basses concentrations d'O<sub>2</sub>, à la modulation des équilibres quiescence/prolifération et auto-renouvellement/engagement caractérisants les CSH. Ces facteurs incluent la concentration et les combinaisons de cytokines activatrices ou inhibitrices, des chimiokines, mais également des interactions avec d'autres types cellulaires.

Il est important de noter que les faibles concentrations d'O<sub>2</sub> modulent les effets cytokiniques et l'expression des récepteurs liés (Laluppa, 1998), ainsi que l'expression de marqueurs spécifiques, notamment le CD34 (Brunet De La Grange, 2006). De nombreux travaux ont permis d'établir l'influence de différentes combinaisons cytokiniques sur les compartiments hématopoïétiques lors de cultures à basses concentrations d'O<sub>2</sub>. Les rôles de l'**IL-3** dans ces cultures sont variés et dépendent notamment de sa concentration, mais également des combinaisons cytokiniques réalisées : des travaux ont montré qu'en combinaison avec le MGDF (Megakaryocyte Growth Factor) et le SCF, l'IL-3 protégerait les cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon de l'apoptose et augmenterait le maintien et la capacité d'auto-renouvellement de ces cellules lors de cultures à 3% d'O<sub>2</sub> (Ivanovic, 2004). Au

contraire, d'autres travaux montrent que l'IL-3 posséderait des effets négatifs sur l'expansion des CSH *in vitro* (Eliasson, 2010) et qu'à de très faibles concentrations d'O<sub>2</sub> (0,1%) le retour ou l'arrêt des cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon dans la phase G<sub>0</sub> du cycle cellulaire seraient indépendants de la présence d'IL-3 (Hermitte, 2006 ; Ivanovic, 2009). Des études ont montré que l'IL-6 favoriserait le maintien des pré-CFC lors de cultures faiblement oxygénées (1% d'O<sub>2</sub>) en comparaison avec des cultures réalisées à 20% d'O<sub>2</sub> (Kovacevic-Filipovic, 2007). Parmi la variété des effets cytokiniques observés lors de culture faiblement oxygénées, notons également l'importance du SCF et de la TPO qui favorisent la survie et le maintien de la capacité de greffe à long terme des CSH (Saxonhouse, 2003 ; Ivanovic, 2009).

D'autre part, concernant l'importance des interactions cellulaires, des travaux récents ont montré que la co-culture de cellules hématopoïétiques primitives avec des cellules stromales mésenchymateuses mimant de manière plus réelle le microenvironnement médullaire augmente la survie, le maintien et la prolifération des CSH issues de moelle osseuse dans des conditions de faible oxygénation (1,5 à 5% d'O<sub>2</sub>), comparativement à des cultures réalisées à 20% d'O<sub>2</sub> (Koller, 1992 ; Hammoud, 2011).

### **III.3.3- Mécanismes d'adaptation des CSH aux faibles concentrations d'O<sub>2</sub>**

Bien que les mécanismes de réponse cellulaire *in vivo* ne soient pas totalement élucidés, il apparaît que les facteurs de transcription HIF, présentés précédemment, jouent un rôle essentiel dans l'adaptation des CSH aux faibles concentrations d'O<sub>2</sub> (Iyer, 1998 ; Ryan, 1998 ; Danet, 2003 ; Kim, 2006) et notamment dans le maintien et la quiescence des populations les plus primitives (Simsek, 2010 ; Takubo, 2010).

*III.3.3.a- Métabolisme glycolytique et oxydatif*

L'adaptation des CSH à leur environnement faiblement oxygéné s'accompagne d'une modification de leur métabolisme orchestrée par une forte stabilisation de HIF-1 $\alpha$ . Les CSH et les progéniteurs primitifs présentent une activité mitochondriale ralentie au profit d'un métabolisme glycolytique (Dello Sbarba, 1987 ; Simsek, 2010). Cet état, comparable à l'effet Warburg, diminue la respiration mitochondriale, accroît la production de lactate et requiert une activité enzymatique soutenue avec un afflux important de glucose. HIF-1 $\alpha$  permet notamment l'expression de gènes du métabolisme glycolytique et du transport du glucose : **GluT-1** (Glucose Transporter-1), **LDHA** (Lactate DéHydrogénase A), **PGK** (PhosphoGlycerate Kinase) et **aldolase A** (Semenza, 2003). Ce phénotype métabolique adopté par les CSH leur confère également un avantage de survie dans la niche hématopoïétique, où les cellules plus différenciées sont incapables de survivre. La culture en milieu semi-solide de LT-SRC, séparées sur la base de leur activité mitochondriale (**AM**), montre que les cellules présentant une faible AM produisent un plus grand nombre de colonies, en comparaison avec des cellules à forte AM, ainsi qu'une meilleure capacité de reconstitution hématopoïétique *in vivo* (Simsek, 2010). De plus, l'apport énergétique limité par un métabolisme glycolytique tend à limiter les phénomènes de transcription de l'ADN et à moduler négativement des programmes transcriptionnels de différenciation (Ivanovic, 2009).

*III.3.3.b- Régulation des ROS*

L'augmentation des ROS intracellulaires, essentiellement produits au niveau mitochondrial, entraîne une prolifération excessive des CSH et la perte de leurs fonctions via un mécanisme de sénescence dépendant de l'activation des facteurs **p16** et **p19**, eux-mêmes régulés par HIF-1 $\alpha$  (Takubo, 2010). HIF-1 $\alpha$  régule également l'expression de Foxo3a dont l'inactivation dans les CSH a pour effet d'augmenter la concentration des ROS et d'épuiser le réservoir de ces cellules (Miyamoto, 2007). L'augmentation des ROS intracellulaires peut

également provoquer des dommages de l'ADN et induire la différenciation des CSH. Afin de limiter ces phénomènes, la cellule dispose d'enzymes antioxydantes capables de neutraliser les ROS, les plus connues étant la **SOD1** (Super Oxyde Dismutase 1), **Gpx1** (Gluthation peroxydase 1) et la **catalase**, dont les activités sont modulées par HIF-2 $\alpha$  (Scortegagna, 2003). HIF-2 $\alpha$  est donc le principal facteur de transcription de la régulation rédox. Alors que HIF-1 $\alpha$  contrôle l'activité mitochondriale et limite la production de ROS, HIF-2 $\alpha$  régule, quant à lui, le stress oxydatif de la cellule et l'homéostasie rédox de celle-ci.

### *III.3.3.c- Maintien de la quiescence*

La régulation de la quiescence des CSH par HIF-1 $\alpha$  présente d'importantes implications dans la compréhension de la régulation de l'homéostasie de ces cellules par le microenvironnement (Takubo, 2010). Les faibles conditions d'oxygénation, en préservant les CSH dans un état quiescent, préservent le potentiel de reconstitution hématopoïétique à long terme de ces cellules. HIF-1 $\alpha$  module ainsi l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire, tels p21<sup>CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> et p57<sup>KIP2</sup> (Eliasson, 2010 ; Guitart, 2010). En parallèle du maintien de l'état quiescent, il est nécessaire de pouvoir contrôler le retour en cycle des cellules, afin de préserver leur capacité d'auto-renouvellement. Ainsi, HIF-2 $\alpha$ , en activant l'activité de la cycline D1 et en coopérant avec c-myc, semble capable de favoriser la prolifération des CSH (Bindra, 2002 ; Gordan, 2007). Le maintien d'un métabolisme glycolytique semble également être en lien avec le maintien dans un état quiescent des CSH (Kim, 1998 ; Parmar, 2007). Pour finir, notons également que HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  régulent la différenciation des CSH via la voie Notch et la voie Wnt (Gustafsson, 2005 ; Mazumdar, 2010).

# *Résultats*

# **I- Optimisation d'une technique de purification de cellules CD34<sup>+</sup> humaines**

## **I.1- Contexte des travaux**

Actuellement, les méthodes classiques d'utilisation clinique des CSH mettent en jeu trois sources principales de cellules CD34<sup>+</sup> : les cellules de moelle osseuse, les cellules de sang placentaire et les cellules mobilisées dans le sang périphérique (Emerson, 1996). Cependant, les difficultés d'approvisionnement et la faible disponibilité de ces sources en font un matériel peu adapté au développement, au laboratoire, de protocoles de routine et d'étude en recherche fondamentale ou clinique. C'est pourquoi la mise au point de techniques permettant l'utilisation de sources alternatives de cellules CD34<sup>+</sup> est rapidement devenue un critère de nécessité pour la poursuite de nos travaux de recherche sur l'hématopoïèse.

Dès le début des années 50, des expériences de parabiose entre animaux irradiés et animaux normaux (Brecher, 1951) ont mis en évidence l'existence de cellules souches de sang périphérique en situation d'homéostasie (CSSP-H) capables de reconstituer une hématopoïèse normale. Des études complémentaires ont définitivement prouvé l'existence de ces CSSP-H dans le sang circulant suite à la reconstitution hématopoïétique à long terme après injection de cellules sanguines autologues ou homologues à des animaux irradiés (Goodman, 1962 ; Cavins, 1964 ; Storb, 1977 ; Körbling, 1979). Des progéniteurs engagés (McCredie, 1971 ; Chervenick, 1971 ; Barr, 1975) et pluripotents (Ivanovic, 1997 ; Ivanovic, 1999) ont également été observés dans le sang périphérique en condition d'homéostasie. Les premiers essais cliniques, dans les années 1980, ont montré l'utilité d'une greffe de cellules de sang périphérique autologue (Körbling, 1986 ; Reiffers, 1986) et allogéniques

(Kessinger, 1989). Cependant, la greffe de CSSP-H s'accompagne de thrombopénies prolongées et d'une reconstitution lente de l'hématopoïèse. Leur faible concentration sanguine (1 à 5 cellules CD34<sup>+</sup>/μl) et l'incapacité dans ces années-là à amplifier des cellules souches *ex vivo*, ont conduit les scientifiques et les cliniciens vers une voie alternative. En effet, le phénomène de mobilisation précédemment décrit (cf. **Introduction §II.2.1, p.45**) a été découvert suite à l'observation de l'augmentation des progéniteurs et des cellules souches circulantes après traitement avec des cytokines (GM-CSF ou G-CSF) (Richman, 1976). Bien que les CSSP-H disposent d'une capacité d'expansion importante, il faut également souligner que, contrairement aux cellules CD34<sup>+</sup> de moelle osseuse, les cellules CD34<sup>+</sup> du sang périphérique en situation d'homéostasie expriment très peu le CXCR4 (Zou, 1998), essentiel au *homing* médullaire des CSH (Lataillade, 2000 ; Lataillade, 2004 ; Hicks, 2011). Une courte incubation des cellules CD34<sup>+</sup> *in vitro* fait apparaître le CXCR4 sur la membrane de ces cellules (Lataillade, 2000), ce qui augmente leur efficacité d'implantation *in vivo* (Lapidot, 2001).

Ces résultats, souvent anciens et peu nombreux, suggèrent pourtant que les CSSP-H disposent d'un potentiel biologique intéressant. Mais la recherche en amont et le développement pré-clinique basés sur ces cellules demeurent très limités à ce jour.

## **I.2- Mise en place de l'étude**

En France, la déleucocytation des produits sanguins labiles est obligatoire depuis 1998 (Ministère des Affaires Sociales, de la Santé et de la Ville, 1998). Cette technique, réalisée grâce à des **filtres de leucoréduction (LRF)**, permet de réduire considérablement la quantité de leucocytes et de plaquettes présents dans les concentrés de globules rouges (CGR). La déleucocytation, réalisée précocement dans les 24 heures suivant le prélèvement, présente des avantages démontrés sur la prévention de certains effets indésirables (allo-immunisation

anti-HLA, réactions fébriles non hémolytiques post-transfusionnelles, transmission du cytomégalovirus [CMV]) et des avantages potentiels dans la diminution de certains risques lors de la transfusion des CGR (récidive ou métastases lors du traitement chirurgical de certaines tumeurs solides, infections postopératoires, réactivation du CMV chez les sujets CMV positifs, dissémination du VIH chez les sujets séropositifs pour ce virus). Les cellules retenues sur les LRF ne sont pas utilisées à ce jour et les filtres sont détruits quotidiennement après préparation des CGR. La quantité de leucocytes retenus lors de la leucoréduction doit, selon la réglementation en vigueur, être supérieure à 99,99% de la population initialement présente dans une poche de don (Dzik, 2000). Ces poches, contenant au maximum 450 ml de sang, nous permettent d'estimer que le nombre de cellules CD34<sup>+</sup> dans les dons et donc retenus sur les filtres sera compris plus ou moins entre  $4 \cdot 10^5$  et  $2 \cdot 10^6$  cellules. Un des avantages d'utiliser les LRF comme source de cellules CD34<sup>+</sup> est que plusieurs échantillons de cellules purifiés peuvent être facilement rassemblés afin d'augmenter le nombre de cellules CD34<sup>+</sup> disponibles pour nos travaux et permettant, dans le même temps, de lisser les variabilités propres à chaque donneur.

Ainsi, pour nos études, les LRF récupérés au sein de l'EFS ont été traités selon différentes techniques d'élution leucocytaire (par gravité ou injection) et les quantités de leucocytes dans chaque fraction ont été déterminées, afin de mettre en évidence des variations significatives entre ces différentes méthodes. Plusieurs tampons d'élution ont été utilisés pour comparer leur influence sur l'état cellulaire et des essais de centrifugation à basse vitesse ont permis d'évaluer leur influence sur la réduction de la forte contamination plaquettaire observée dans les échantillons élués. Suite à la récupération quantitativement importante de cellules CD34<sup>+</sup> à partir de ces LRF, plusieurs tests ont permis de les valider, fonctionnellement et phénotypiquement, en comparaison avec des cellules d'autres sources.

### **I.3- Résultats et conclusions**

Nos résultats, qui ont fait l'objet d'une publication dans la revue Transfusion (Peytour, 2010), sont exposés en détail dans l'article joint et résumés ci-dessous. Ceux-ci ont permis de mettre en évidence que :

1- la quasi-totalité des leucocytes retenus dans les fibres des LRF sont élués dans les 40 ml injectés et que cette méthode d'injection donne de meilleurs résultats en comparaison avec des méthodes d'éluion par gravité ou avec des méthodes par injection de volumes plus conséquents,

2- la forte contamination plaquettaire des échantillons en sortie de filtre est totalement éliminée grâce à des procédures de centrifugation à faible vitesse et aucun satellitisme plaquettaire n'est observé sur les cellules CD34<sup>+</sup> en fin de purification,

3- chaque filtre permet d'obtenir, en fin de protocole de purification, entre 3,6 et 4,6.10<sup>5</sup> cellules CD34<sup>+</sup>, présentant un taux de pureté de l'ordre de 85%,

4- les cellules CD34<sup>+</sup> purifiées à partir des LRF montrent des propriétés fonctionnelles et phénotypiques comparables avec des cellules CD34<sup>+</sup> issues d'autres sources. Notons, cependant, que l'engagement en différenciation est retardé par rapport aux cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon.

Ce protocole rapide et simple à mettre en place permet d'obtenir une quantité suffisante de cellules, validées fonctionnellement. La possibilité de réunir plusieurs échantillons après éluion permet, d'une part, d'augmenter la quantité de cellules récupérées et, d'autre part, de compenser les disparités relatives à chaque donneur. La facilité d'utilisation et de récupération des LRF fait de cette technique une alternative intéressante en comparaison à l'accès et à la disponibilité des autres sources de cellules CD34<sup>+</sup>.

## **I.4- L'article**

### **Obtaining of CD34<sup>+</sup> cells from healthy blood donors: development of a rapid and efficient procedure using leukoreduction filters**

Yann Peytour\*, Amélie Guitart\*, Arnaud Villacreces\*, Jean Chevaleyre†, Francis Lacombe‡, Zoran Ivanovic†, Vincent Praloran\*

From the CNRS UMR 5164, University of Bordeaux 2, Bordeaux, France\*; the Etablissement Français du Sang Aquitaine-Limousin†; and the Laboratoire d'Hématologie, CHU of Bordeaux‡, Bordeaux, France.

#### **AUTHOR CORRESPONDENCE**

Professor V. Praloran ; MD, PhD, UMR CNRS 5164, 146, rue Leo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France; e-mail: [vincent.praloran@u-bordeaux2.fr](mailto:vincent.praloran@u-bordeaux2.fr).

#### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that they have no conflicts of interest relevant to the manuscript submitted to **Transfusion**.

**RUNNING HEAD:** CD34<sup>+</sup> cells isolation from LRFs

#### **ABBREVIATIONS**

FRP = fraction rich in platelets; GpA = glycophorin A; HuS = human serum; LRF(s) = leukoreduction filter(s).

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Human CD34<sup>+</sup> cells are mandatory to study many aspects of human haematopoiesis. Their low frequency in blood or bone marrow and ethical reasons limit their obtainment in large quantities. Leukoreduction filters (LRFs) are discarded after preparation of red blood cells. The CD34<sup>+</sup> cells concentration in healthy donor blood is low ( $1 \times 10^3$ - $4 \times 10^3$ /mL), but their number trapped in one LRF after filtration of 400 to 450 mL of blood is high ( $0.4 \times 10^6$ - $1.6 \times 10^6$ ).

**STUDY DESIGN AND METHODS:** To develop a procedure allowing obtainment of purified CD34<sup>+</sup> cells from LRFs with good a yield, white blood cell (WBC) recoveries after a 500-mL continuous or after sequential elution (50- or 20-mL fractions) were compared. Different WBC and mononuclear cell (MNC) centrifugation methods were tested to minimize samples platelet (PLT) contamination before the CD34<sup>+</sup> cell immunomagnetic selection. Cell functionality was finally analysed under various culture conditions.

**RESULTS:** The 20-mL back-flushing of LRFs allowed the most efficient WBC recovery. The next steps (110 x g centrifugation, MNC separation on Ficoll, and washes) resulted in a cell suspension in which the lymphocyte recovery was approximately  $76 \pm 10\%$  and the PLT contamination below 1.6%. After immunomagnetic selection,  $4 \times 10^5$  to  $6 \times 10^5$  cells containing approximately 85% of functional CD34<sup>+</sup> cells were obtained.

**CONCLUSION:** This procedure allows the easy, rapid (<5 hr), and efficient preparation of large quantities of CD34<sup>+</sup> cells having functional activities similar to those of CD34<sup>+</sup> cells from other sources. Therefore, easily available and virally safe, LRFs represent an important and regular WBC source to work with human CD34<sup>+</sup> cells, but also with other WBC types.

## KEY WORDS

CD34<sup>+</sup> cells selection, leukoreduction filters, platelets depletion, healthy blood donor.

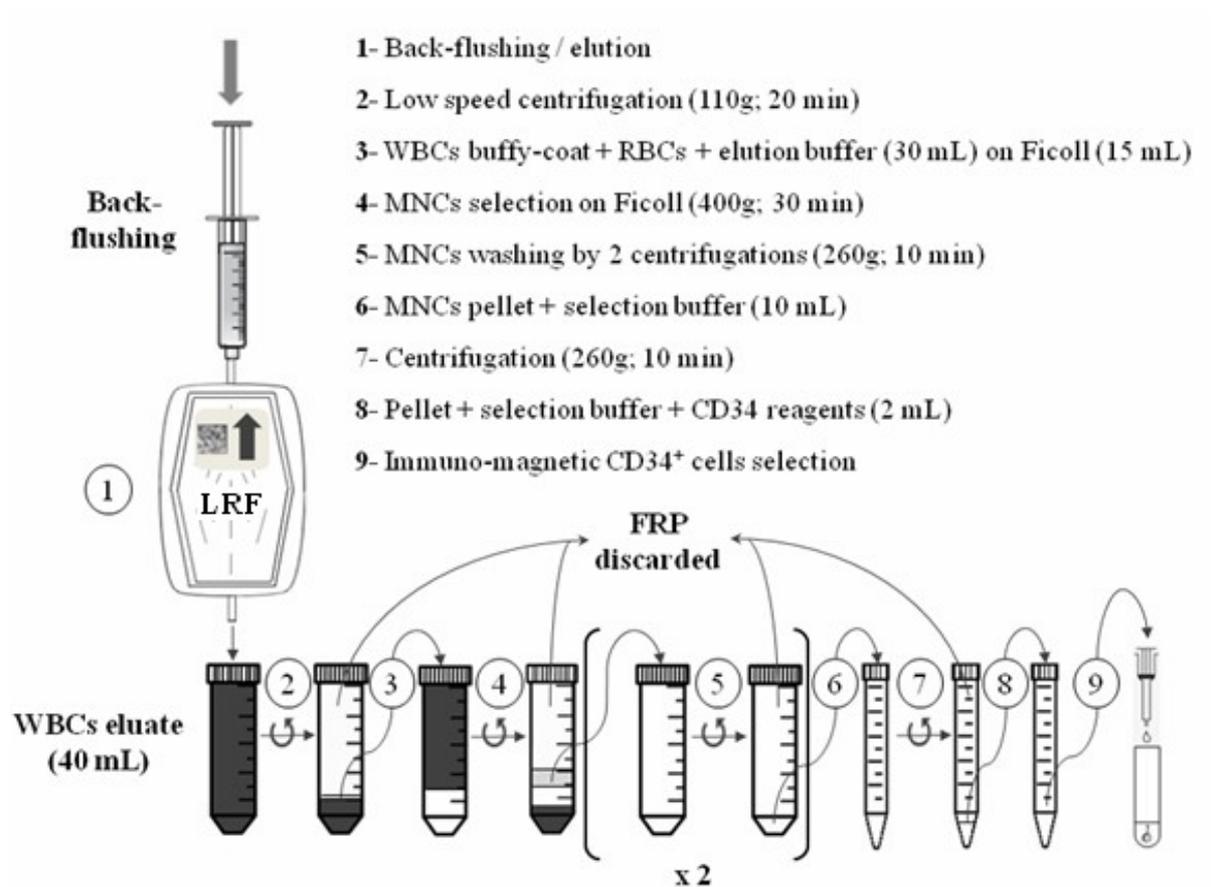


FIGURE 1. From LRFs to immuno-magnetic columns: a schema of CD34<sup>+</sup> cells selection

LRFs obtained from discarded blood collecting devices were used within 22 hours after blood collection. For WBCs elution, LRFs were back-flushed with 2 injections of 20 mL of elution buffer, using a 50 mL sterile syringe (step 1). The green arrow on LRF indicates the donor blood filtration way. Steps 2 to 9 allowed platelets depletion and MNCs enrichment. Finally, CD34<sup>+</sup> cells were selected by a double immuno-magnetic procedure according to the manufacturer protocol (Miltenyi Biotec). All steps were performed at 20°C. FRP: fraction rich in platelets.

## INTRODUCTION

Despite the very low percentage of CD34<sup>+</sup> cells in the steady-state blood of healthy donors - approximately 0.15% of mononuclear cells (MNCs)<sup>1</sup> - adult blood is an attractive alternative to umbilical cord blood and marrow for research and, in the future, for regenerative medicine<sup>2</sup>. Indeed, a blood gift bag (400 to 450 mL with  $1.6 \times 10^9$  to  $4 \times 10^9$  white blood cells [WBCs]), represents a potential source of large numbers of CD34<sup>+</sup> cells ( $0.4 \times 10^6$  to  $1.6 \times 10^6/400$  mL of blood), since leukoreduction filters (LRFs) are discarded after the preparation of therapeutic red blood cells (RBCs) devoid of WBCs and platelets (PLTs). CD34<sup>+</sup> cell isolation from LRFs has already been an objective for us and others<sup>2,3</sup>. Differences in deformability<sup>4</sup>, electronic charges<sup>5</sup> and surface antigens<sup>6,7</sup> between blood cell types explain that LRFs trap about 99% of PLT and WBCs within the filter matrix fibers<sup>8,9</sup>. Since LRFs are easily available, rather safe for common blood infectious agents, and contain the number of CD34<sup>+</sup> cells found in 400 to 450 mL of steady-state blood, they represent an interesting source for purifying CD34<sup>+</sup> cells as well as other WBCs types. Procedures currently available for WBC elution require back-flushing of LRFs with large volumes of buffer. Therefore, they are difficult, tedious, and time-consuming to be realized on a regular basis. This study was devoted to develop an easy and rapid technical procedure allowing the most efficient WBC elution from LRFs, the largest PLT reduction and the best CD34<sup>+</sup> cells selection ( $84 \pm 4.1\%$ ) with favorable yields (> 90%).

## MATERIALS AND METHODS

### **Elution of WBCs from LRFs and preparation of PLT-reduced MNCs (Fig. 1)**

LRFs (Composelect WB, Fresenius, Paris, France), still connected to the empty primary blood donor bag, were obtained from the Regional Blood Transfusion Institute (Etablissement Français du Sang Aquitaine-Limousin, Bordeaux, France) and used within 22 hours after

blood collection. After its removal from the primary bag, the LRF was fixed on a stand and back-flushed with elution buffer using either a 500-mL plastic bag (hung at 1 m above the filter) or a 50-mL sterile syringe connected to the filter exit (Fig. 1, Step 1). Elution buffers tested were composed of phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2) supplemented or not by ACD-A (10% vol/vol) and heat-inactivated human serum (HuS; 5%, vol/vol). After comparing the effects of elution with various buffers at 4 and 20°C on WBC recovery, PLT reduction, and lymphocyte yield, all further experiments were performed at 20°C in PBS supplemented with ACD-A and HuS. Our previously described 500-mL continuous elution method<sup>2</sup> was compared with sequential back-flushing with 50 or 20 mL of elution buffer using a 50-mL syringe. RBC, PLT, and WBC counts and differentials in the collected fractions were performed with an automatic multivariable hematology analyzer (CELL-DYN 3500, Abbott Laboratories, Inc., Abbott Park, IL). Since eluted fractions contained very high numbers of PLTs, we compared the efficiency of three low-speed centrifugation procedures (260, 190 and 110 x g; 20 min; 20°C), in terms of PLT reduction and WBC recovery. After elimination of the upper fraction rich in PLTs (FRP) RBC pellets and WBC buffy coat were then resuspended in elution buffer (qs 30 mL), layered onto Ficoll (d = 1.077, lymphocytes separation medium, Laboratories EUROBIO, Courtaboeuf, France) and centrifuged (400 x g, 30 min; 20°C). After elimination of the FRP, the MNC layer was harvested and washed twice in elution buffer (qs 50 mL) by centrifugation (260 x g, 15 min; 20°C). The pellet was then resuspended in 10 mL of selection buffer (PBS [pH 7.2], 2 mmol/L ethylenediaminetetraacetate [EDTA], 5 g/L HSA), washed once, and resuspended in 2 mL of selection buffer for the immunomagnetic selection of CD34<sup>+</sup> cells.

### **CD34<sup>+</sup> cells selection**

CD34<sup>+</sup> cells were isolated with a two-steps “indirect” immunomagnetic procedure (Indirect kit CD34 microbeads kit, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), according to the manufacturer’s protocol: the first step used the “midi” column and the second used the “minicolumn” (Vario Macs Device, Miltenyi Biotec). Finally, CD34<sup>+</sup> cells were counted using Trypan Blue dye staining for the identification of dead cells.

### **Flow cytometry analysis of CD34<sup>+</sup> cells at seeding and after liquid cultures**

The percentage of CD34<sup>+</sup> cells along the purification procedure was measured with a flow cytometer (FACSCanto, Beckton Dickinson, San Jose, CA) and analysed through the accompanying software (FACSDiva, Beckton Dickinson). Cells were first washed (PBS, Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> free, EDTA [10 mM], fetal calf serum [FCS; 5%, vol/vol] and azide [0.05%, wt/vol]) and then labelled for 30 minutes with anti-CD34-phycoerythrin (PE; BD Biosciences, Meylan, France) or with the corresponding isotype control (mouse  $\gamma$ 1-PE, BD Biosciences). The same protocol was used to assess the commitment of purified CD34<sup>+</sup> cells after 7 and 11 days of culture in Iscove’s modified Dulbecco’s medium (IMDM + GlutaMAX-1, Gibco, Invitrogen Corp., Cergy Pontoise, France) supplemented with FCS (10%, vol/vol), interleukin (IL)-3, IL-6, and stem cell factor (SCF), respectively at 20, 20, and 100 ng/mL, and erythropoietin (EPO) at 3 U/mL (all from PeproTech, Neuilly-Sur-Seine, France). The CD33, CD61, CD65, and glycophorin A (GpA) antigens were analysed using fluorescent antibodies (all from BD Biosciences). The cell cycle status of freshly isolated and cultured CD34<sup>+</sup> cells was analyzed using Topro-3 iodide (Topro) and anti-Ki-67 antibody. Topro discriminates cells with 2n (G<sub>0</sub> and G<sub>1</sub> phases), 2n to 4n (S phase), and 4n (G<sub>2</sub> and M phases) DNA content. The nuclear antigen Ki-67 is expressed by cells in active phases of the cell cycle (G<sub>1</sub> to M phases) and absent in G<sub>0</sub> quiescent cells. Cells were washed, fixed, and permeabilized for 30

minutes with formaldehyde (0.4%, vol/vol), saponin (0.02%, vol/vol), and HEPES (pH 8; 10 mmol/L), H<sub>2</sub>O. Cells were washed twice and incubated with an anti-Ki-67-PE antibody (B56 clone, BD Biosciences) or with the corresponding isotypic control (clone MOPC-21, BD Biosciences) for 30 minutes. After being washed, cells were labelled with Topro and analyzed by flow cytometry.

### **Colony-forming ability of CD34<sup>+</sup> cells**

Colony-forming unit assays were performed with CD34<sup>+</sup> cells freshly purified from LRFs and after 3 and 6 days of liquid culture of cells seeded ( $5 \times 10^4$  per mL) in IMDM plus FCS (10%) and IL-3 (20 ng/mL). For this test, 5 $\mu$ L of cell suspension was added to 250  $\mu$ L of Stem $\alpha$ .1D (Stem Alpha, Saint-Clément-les-Places, France), a semisolid methylcellulose medium (containing FCS, human transferrin, IL-3, IL-6, IL-11, SCF, EPO, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor, and granulocyte-colony-stimulating factor) and seeded in 24-wells plates (NUNC, Roskilde, Denmark). After 14 days of culture (37°C, 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>), the colonies (>50 cells) were counted under an inverted microscope.

### **Statistical analysis**

Mean values  $\pm$  SD of the mean values were calculated from data of independent experiments. Differences between experiments were assessed using analysis of variance and considered as significant when the p value was below 0.05.

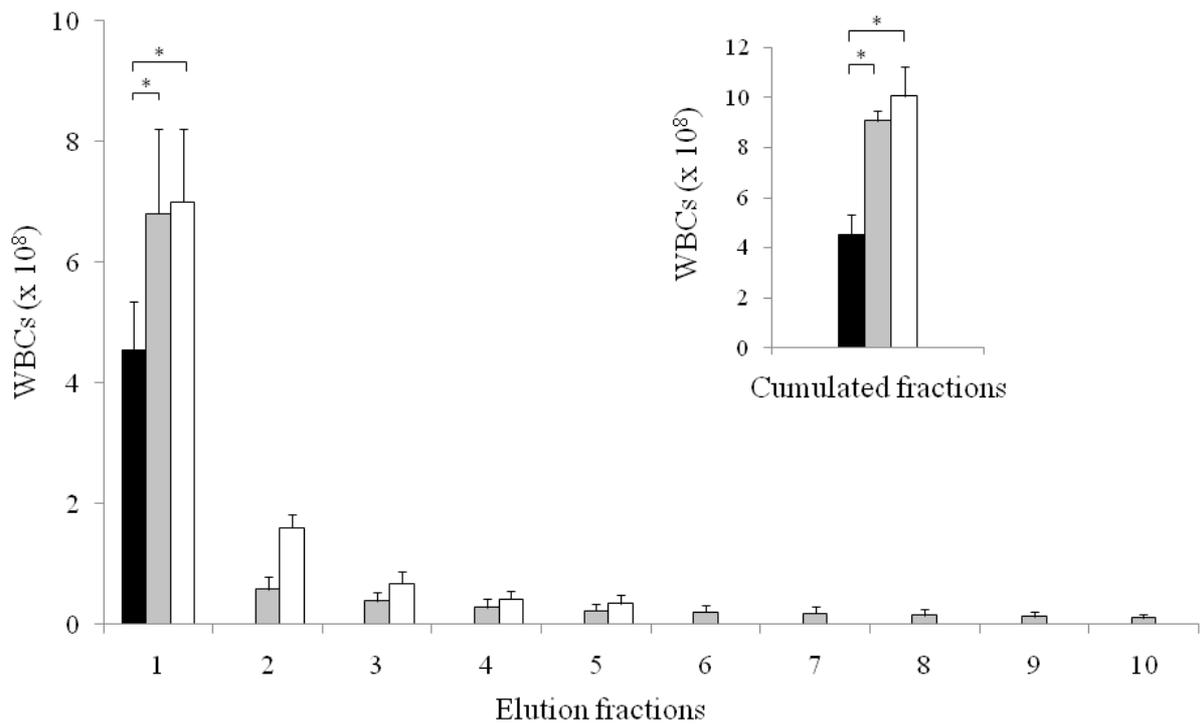


FIGURE 2. LRF back-flushing modalities influence the WBCs elution (n=12)

The WBCs number recovered from a 500 mL-continuous (black bar), a 50 mL-sequential (10 fractions, grey bars) or a 20 mL-sequential elution (5 fractions, white bars), are shown. Inset compares the total number of WBCs in 500 mL obtained by continuous elution (black bar), in 500 mL by the 10 x 50 mL-sequential elution (grey bar) and in 100 mL by the 5 x 20 mL fractionated elution (white bar). \*  $P < 0.01$ .

## RESULTS

### **LRF back-flushing modalities influence the WBC elution**

Preliminary tests (data not shown) showed that WBC elution from LRFs were similar at 4 and 20°C and that addition of ACD-A and HuS to PBS improved cell survival and reduced cell aggregate formation during the CD34<sup>+</sup> cells selection procedure. All the experiments were then performed at 20°C with PBS supplemented with ACD-A and HuS.

We compared the WBC recovery reached with the 500-mL continuous elution procedure and with two sequential procedures using 10 or 5 independent injections of 50 or 20 mL respectively. Figure 2 shows that significantly ( $p < 0.01$ ) more WBCs were eluted in Fraction 1 of the 50- and 20-mL sequential procedures than in the total 500 mL of the continuous back-flushing. The WBC count in the 10 or the 5 cumulated fractions from the sequential injections were respectively 2 to 2.2 times higher than in the 500-mL continuous one (Fig. 2, inset). Interestingly, the number of WBCs in Fractions 1 + 2 of the 20-mL sequential back-flushing represented more than 85% of the total number of WBCs in its whole five fractions. This number was equal to the one in Fraction 1 + 2 of the 50-mL sequential elution and higher in the 500-mL continuous back-flushing.

The comparison of the numbers of RBCs, PLTs, polymorphonuclear leukocytes (PMNs), and lymphocytes obtained with the three elution procedures (Table 1) show that the number of lymphocytes was the highest and the number of PLTs the lowest in Fractions 1 + 2 of the 20-mL sequential procedure, an interesting result since CD34<sup>+</sup> cells are inside the lymphocyte population. The sequential elution by two successive 20-mL fractions was then used for all the following experiments.

**TABLE 1. Blood cell recoveries after three different elution procedures\***

Elution procedure	PLTs ( $\times 10^{10}\ddagger$ )	RBCs ( $\times 10^{11}\ddagger$ )	PMNs ( $\%/ \times 10^8\ddagger$ )	Lymphocytes ( $\%/ \times 10^8\ddagger$ )	CD34+ cells ( $\%/ \times 10^6\ddagger$ )
500 mL (continuous)	4.2 $\pm$ 0.7	0.7 $\pm$ 0.3	37.1/1.7 $\pm$ 0.4	55.1/2.5 $\pm$ 0.3	ND
100 mL§ (50-mL sequential)	3.5 $\pm$ 0.3	1.15 $\pm$ 0.2	28.9/2.1 $\pm$ 0.6	59.5/4.4 $\pm$ 1	0.07/0.58 $\pm$ 0.17
40 mL§ (20-mL sequential)	3.1 $\pm$ 0.9	0.7 $\pm$ 0.4	29.1/2.5 $\pm$ 0.7	64.3/5.5 $\pm$ 0.7	0.06/0.69 $\pm$ 0.11

\* Results are the mean of 12 experiments  $\pm$  SD.

† Absolute number of cells in each WBC subpopulation.

‡ Percentage of each WBC subpopulation among total WBCs.

§ Volume of Fractions 1 + 2.

ND = not done.

**TABLE 2. PLT reduction, lymphocyte recovery, and CD34+ cell enrichment: effects of low-speed centrifugation, Ficoll, washing steps, and immunomagnetic columns\***

Cell type	Low-speed centrifugation ( $\times g$ )			MNC Ficoll layer†	CD34 selection†	
	260	190	110		Before	After
PLTs‡ (%)	47.9 $\pm$ 0.6	36.3 $\pm$ 6.7	22.5 $\pm$ 3.5	18 $\pm$ 2.8	1.6 $\pm$ 0.9	0
WBCs‡ (%)	93.1 $\pm$ 1.4	94.5 $\pm$ 4.6	95.8 $\pm$ 4.2	66 $\pm$ 8	63 $\pm$ 7.8	0.06 $\pm$ 0.02
Lymphocytes‡ (%)	92.9 $\pm$ 2	95 $\pm$ 3.8	96 $\pm$ 3	77.9 $\pm$ 8	75.8 $\pm$ 10	0.05 $\pm$ 0.00
CD34+ cells§ (%)	ND	ND	0.06 $\pm$ 0.028	0.083 $\pm$ 0.036	0.083 $\pm$ 0.036	84 $\pm$ 4.1
CD34+ cells   ( $\times 10^6$ )	ND	ND	0.665 $\pm$ 0.23	0.6 $\pm$ 0.2	0.58 $\pm$ 0.17	0.41 $\pm$ 0.05

\* Results were obtained after a 2  $\times$  20-mL sequential elution and are the mean of 16 experiments  $\pm$  SD.

† All these values were obtained with WBCs suspensions issued from the 110  $\times g$  centrifugation procedure.

‡ Ratio (%) of the number of cells recovered at each step to the number of cells back-flushed from LRFs.

§ Ratio (%) of the CD34+ cells number to the total number of cells at each step.

|| Total number of CD34+ cells ( $\times 10^6$ ) among WBCs at each step.

ND = not done.

### **PLT reduction**

The propensity of PLTs to form aggregates and clumps *in vitro* with WBCs and/or RBCs often reduces the yield of CD34<sup>+</sup> cells during their selection, by blocking the immunomagnetic column matrix. To maximally reduce the PLT contamination of WBCs before the CD34<sup>+</sup> cells selection, we compared three low-speed centrifugations (260, 190, and 110 x g; 20°C; 20 min). Table 2 shows that PLT reduction was 2 and 1.6 times more efficient after centrifugation at 110 x g than at 260 and 190 x g, respectively, whereas the WBC and lymphocyte recoveries remained unchanged and higher than 96%. Further reductions of the centrifugation speed and/or time led to a significant loss of WBCs. The next steps of MNCs selection by Ficoll and subsequent washes allowed the elimination of approximately 98% of RBCs, 98.5% of PLTs, and of only 24% of the lymphocytes eluted from LRFs. Importantly, with this procedure, the cell suspension loaded on the immunomagnetic column did not contain aggregates or clumps.

### **CD34<sup>+</sup> cell recovery and purity rate**

The 20-mL back-flushing of LRFs was also the right technical choice for the CD34<sup>+</sup> cell recovery since their percentage and total number were similar in Fractions 1 + 2 of the 50- and 20-mL sequential elution procedures (Table 1, Column 6).

The yields of CD34<sup>+</sup> cells (related to their initial number in LRF-eluted WBCs) were also analysed after MNC isolation on Ficoll, after their resuspension in selection buffer and after their immunomagnetic selection (Table 2, Columns 4 to 6). As expected, CD34<sup>+</sup> cells and lymphocyte loss were similar and low during the low-speed centrifugation, Ficoll, and washing steps of the procedure. The CD34<sup>+</sup> cell yield after the selection step was lower and variable from one LRF to the other, ranging from 54 to 72% with a mean purity of  $84 \pm 4.1\%$ . Most importantly, the total number of CD34<sup>+</sup> cells recovered after the complete selection

**TABLE 3. Functional capacities of CD34+ cells purified from LRFs\***

Day	Growth rate†	Mortality rate‡ (%)	Colony-forming ability§ (%)
0			11 ± 2.5
3	2 ± 0.1	9.5 ± 1.2	11.6 ± 4.3
6	6.5 ± 0.2	14 ± 1.7	4.1 ± 0.5

\* Growth and mortality rates were obtained from liquid cultures seeded at  $1 \times 10^5$ /mL. Colony-forming ability was obtained from methylcellulose semisolid cultures, seeded by 250 eluted CD34+ cells or by 5  $\mu$ L of liquid cultures. Results are the mean of seven experiments  $\pm$  SD.

† Growth rate: number of living cells after culture/number of seeded cells.

‡ Mortality rate: dead cells number/total cells number (dead + alive) at each time point.

§ Colony-forming ability: colonies number/seeded cells number.

procedure ranged from  $0.36 \times 10^6$  to  $0.46 \times 10^6$ . The PLT contamination of the cell suspension was quite null and PLT satellitism on CD34<sup>+</sup> cells, measured by CD34/CD41 double labelling of purified cells, was always below  $0.7 \pm 0.5\%$  of the total CD34<sup>+</sup> cells (data not shown).

### **Functional analysis of LRF CD34<sup>+</sup> cells: growth rate, colony formation, cell cycling and differentiation**

The growth and mortality rates of CD34<sup>+</sup> cells after 3 and 6 days of liquid culture with IL-3 (Table 3, Columns 2 and 3) as well as the frequency of progenitors (Column 4) were very similar to those previously found for steady-state blood CD34<sup>+</sup> cells selected with other methods.<sup>1-3</sup> Their cell cycling was also similar to the one of CD34<sup>+</sup> cells from other sources<sup>10</sup>. Indeed, before liquid culture,  $45 \pm 4.5\%$  of the CD34<sup>+</sup> cells were in G<sub>0</sub> phase,  $55 \pm 4.5\%$  in G<sub>1</sub>, and none in S, G<sub>2</sub>, or M phases (n=6). In contrast, after 3 days of culture in IMDM supplemented by FBS (10%) and IL-3 (20 ng/mL), cells entered in the active cell cycle phases, as evidenced by 1) the decrease of the proportion of cells in the G<sub>0</sub> phase to  $33 \pm 2.3\%$  and to  $42 \pm 3.2\%$  for the G<sub>1</sub> phase and 2) the increase of the proportion of cells in S and G<sub>2</sub>/M phases, respectively, to  $13 \pm 2.1$  and  $12 \pm 1.4\%$  (data not shown).

When cultured for 7 to 11 days in IMDM plus IL-3, IL-6, SCF, and EPO, the CD34<sup>+</sup> cells progressively differentiated along the granulomonocytic and erythroid pathways (Fig. 3). In particular,  $47.5 \pm 2.9\%$  of cells expressed the GpA after 11 days of culture, against  $3 \pm 4.8\%$  initially and  $9 \pm 0.2\%$  after 7 days. Altogether, these results demonstrate that CD34<sup>+</sup> cells isolated from LRFs of adult blood donors present functional properties very similar to those of CD34<sup>+</sup> cells obtained from other sources<sup>1-3,10</sup>.

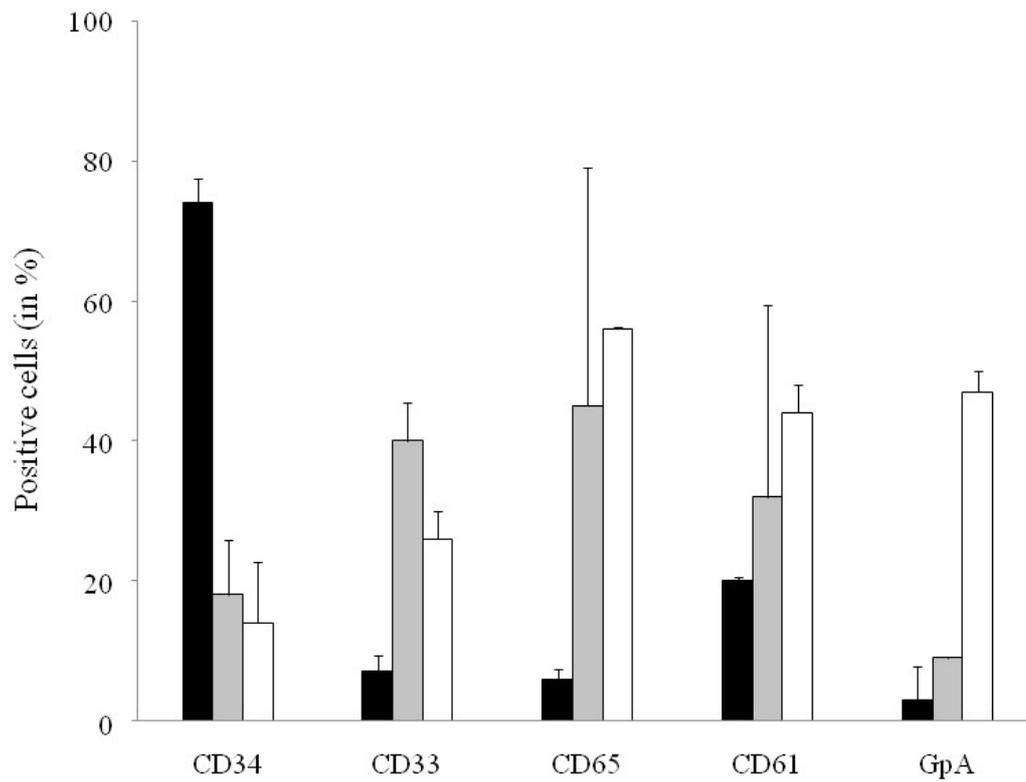


FIGURE 3. Myeloid differentiation of LRFs CD34<sup>+</sup> cells in culture (n=3)

Analysis of CD33 (early myeloid differentiation antigen), CD65 (monocytic antigen), CD61 (platelets/megakaryocytes antigen) and GpA (late erythroids antigen) was performed on freshly isolated CD34<sup>+</sup> cells (black bars) and after 7 (grey bars) and 11 days (white bars) of liquid cultures, performed in IMDM supplemented by foetal calf serum, IL-3, IL-6, SCF and EPO.

## DISCUSSION

LRFs are a convenient and abundant source of CD34<sup>+</sup> cells since they contain a high number of WBCs and are discarded after the preparation of RBCs. We and others already used LRFs to purify CD34<sup>+</sup> cells for research purposes<sup>2,3</sup>. However, WBC recovery required back-flushing of LRFs with a large volume of buffer and resulted in a heavy PLT contamination, making this technique tedious and time-consuming for research laboratories lacking materials for processing large volumes of blood-derived products. The method described here is easy and neither more expensive nor longer (<5 hr from LRF elution to purified CD34<sup>+</sup> cell recovery) than other procedures commonly used for the isolation of CD34<sup>+</sup> cells. Our first objective was reached with the 20-mL sequential elution procedure, which reduced by 12.5 times the volume necessary to extract an equal or higher number of WBCs and CD34<sup>+</sup> cells. This low elution volume allows the concomitant use of several LRFs and the pooling of WBCs to purify large numbers of CD34<sup>+</sup> cells required for biochemical analyses. Our second objective was to dramatically reduce the PLT contamination, which is a frequent source of aggregates and clumps with RBCs and WBCs leading to a lower quality and yield of the CD34<sup>+</sup> cells selection and to uncontrolled disturbances of the hematopoietic progenitors growth. A 110 x g low speed centrifugation, followed by four other centrifugation steps along the CD34<sup>+</sup> cells isolation, led to the total elimination of PLTs as evidenced by the very low percentage of CD34<sup>+</sup>/CD41<sup>+</sup> cells present after the immunomagnetic selection step. CD34<sup>+</sup> cells obtained with this convenient, rapid, and efficient procedure have satisfying functional properties as evidenced by their cell cycle entry, *ex vivo* expansion, colony-forming ability, and lineage differentiation.

In conclusion, the procedure described here to purify CD34<sup>+</sup> cells from LRFs is an interesting alternative to other methods and sources. Indeed LRFs are an easily available and safe source of cells whose fibers trap the WBCs contained in 400 to 450 mL of blood from one healthy

donor. Thus, one LRF allows the isolation of  $0.36 \times 10^6$  to  $0.46 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> cells. Since 6 to 10 filters can be processed together, a high number of CD34<sup>+</sup> cells ( $2.2 \times 10^6$  to  $4.8 \times 10^6$ ) can be purified in the mean time, as required for some biochemical analyses. Mixing of CD34<sup>+</sup> cells from several donors may be even interesting to moderate individual differences. Finally, the initial steps of this procedure could also be used to isolate other subpopulations of WBCs present in the eluted fractions<sup>11,12</sup>.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was financed by a 2009 research fund of the Regional Aquitaine-Limousin Branch of French Blood Institute (EFS-AL) and by regular funding of University of Bordeaux 2 and by CNRS. Yann Peytour and Amélie Guitart were respectively the recipients of CNRS and MENRT fellowships. We thank C. Hamsany and her EFS-AL collaborators for their continuous help in providing us leukoreduction filters and M. Jeanneteau, A. Viale, M. Giraudon, and A. Briais for their help in the setting up of the flow cytometry techniques.

## REFERENCES

1. **Herbein G., Sovalat H., Wunder E. et al.** (1994). Isolation and identification of two CD34<sup>+</sup> cell subpopulations from normal human peripheral blood. *Stem Cells* **12**:187-197.
2. **Ivanovic Z., Duchez P., Morgan D. et al.** (2006). Whole-blood leuko-depletion filters as a source of CD 34<sup>+</sup> progenitors potentially usable in cell therapy. *Transfusion* **46**:118-125.
3. **Meyer T., Zehnter I., Hofmann B. et al.** (2005). Filter Buffy Coats (FBC): a source of peripheral blood leukocytes recovered from leukocyte depletion filters. *J Immunol Methods* **307**:150-166.
4. **Bruil A., Beugeling T., Feijen J., van Aken W.** (1995). The mechanisms of leukocyte removal by filtration. *Transfus Med Rev* **9**:145-166.
5. **Dzik S.** (1993). Leukoreduction blood filters: filter design and mechanisms of leukocyte removal. *Transfus Med Rev* **7**:65-77.
6. **Hynes R.** (1992). Integrins: versatility, modulation, and signalling in cell adhesion. *Cell* **69**:11-25.
7. **Barbe L., Boval B., Wautier M., Wautier J.** (2000). Human promyelocytic cell line: a convenient tool for studying the molecular basis of WBC filtration. *Transfusion* **40**:1250-1256.
8. **Masse M., Naegelen C., Pellegrini N. et al.** (1992). Validation of a simple method to count very low white cell concentrations in filtered red cells or platelets. *Transfusion* **32**:565-571.
9. **Dzik S., Aubuchon J., Jeffries L. et al.** (2000). Leukocyte reduction of blood components: public policy and new technology. *Transfus Med Rev* **14**:34-52.
10. **Hermitte F., Brunet de la Grange P., Belloc F. et al.** (2006). Very low O2 concentration (0.1%) favors G0 return of dividing CD34<sup>+</sup> cells. *Stem Cells* **24**:65-73.
11. **Ebner S., Neyer S., Hofer S. et al.** (2001). Generation of large numbers of human dendritic cells from whole blood passaged through leukocyte removal filters: an alternative to standard buffy coats. *J Immunol Methods* **252**:93-104.
12. **Neron S., Dussault N., Racine C.** (2006). Whole-blood leukoreduction filters are a source for cryopreserved cells for phenotypic and functional investigations on peripheral blood lymphocytes. *Transfusion* **46**:537-544.

## **II- Influence des basses concentrations d'O<sub>2</sub> et des conditions de culture sur la quiescence, le maintien et l'expansion des CSH adultes normales**

### **II.1- Contexte des travaux**

L'expansion *ex vivo* des CSH représente un enjeu essentiel dans l'élaboration de protocoles cliniques en vue de transplantations allogéniques ou autologues. Elle doit permettre : soit d'augmenter le nombre de cellules primitives dans un greffon insuffisant, soit de diminuer la quantité de cellules à prélever pour constituer ce greffon, soit d'accroître le nombre de cellules matures afin de raccourcir la durée d'aplasie médullaire. L'expansion *ex vivo* des CSH repose essentiellement sur l'élaboration de cocktails cytokiniques ou sur l'optimisation des milieux de culture, à partir de cellules issues de sang de cordon ou mobilisées dans le sang périphérique. Malgré l'importance physiologique des faibles concentrations d'O<sub>2</sub> dans les différents processus de maintien, d'auto-renouvellement et de quiescence des CSH (Iriuchishima, 2011), peu de travaux prennent en compte ce paramètre en culture. En effet, la concentration atmosphérique d'O<sub>2</sub> induit une prolifération importante des CSH, leur différenciation rapide en progéniteurs et la perte de leur capacité de greffe, qui signe la disparition des CSH pluripotentes capables d'auto-renouvellement. De plus, des travaux antérieurs ont démontré les effets d'une oxygénation réduite (3%, 1% et 0,1% d'O<sub>2</sub>) sur la régulation fonctionnelle des CSH *in vitro* (cf. **Introduction §III.3.1, p.67**). Une concentration très basse d'oxygène (0,1%, similaire à celle des niches endostéales où résident les CSH), empêche notamment les cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon, initialement en G<sub>0</sub>, d'entrer dans les phases actives du cycle cellulaire, ramènent en G<sub>0</sub> celles qui cyclent et préserve leur capacité de greffe sans induire d'apoptose (Hermitte, 2006).

Le rôle et les mécanismes d'action des facteurs solubles hématopoïétiques (cytokines, chimiokines, facteurs de croissance) en conditions de faible oxygénation restent eux aussi très peu explorés. Leur présence ou leur absence, leur combinaison et leur concentration agissent pourtant de façon déterminante sur le devenir des CSH lors de cultures à 20% d'O<sub>2</sub>. Notre équipe a ainsi montré récemment que l'engagement en différenciation de cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon, cultivées à 3% d'O<sub>2</sub>, était fortement dépendant de la concentration d'IL-3 dans le milieu (Ivanovic, 2004) et que l'IL-6 permettait une préservation et une expansion des CSH murines en culture à 1% d'O<sub>2</sub> (Kovacevic-Filipovic, 2007). Les interactions entre faibles concentrations d'O<sub>2</sub>, cycle cellulaire et facteurs solubles dans le maintien et l'expansion *ex vivo* des CSH méritent donc d'être explorées. Cela permettra de reproduire des conditions expérimentales proches de celles retrouvées *in vivo* et de développer de nouvelles méthodes d'expansion pour leur utilisation en thérapie cellulaire, où l'impératif est soit le maintien, soit l'amplification des cellules les plus primitives.

## **II.2- Mise en place de l'étude**

Nous avons cherché à confirmer et à étendre, à des CSSP-H issues de LRF, les résultats obtenus avec des cellules de sang placentaire par F. Hermitte. Celui-ci a décrit, lors de cultures de 3 jours réalisées à 0,1% d'O<sub>2</sub>, un important retour en quiescence des cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon et un maintien de leur capacité de reconstitution hématopoïétique (**Hermitte, 2006**). Dans le travail présenté ici, les cellules CD34<sup>+</sup> de LRF ont été cultivées pendant 7, 10 ou 14 jours à 20 ou 0,1% d'O<sub>2</sub> en présence de différentes combinaisons cytokiniques. Bien que ce travail ne soit pas terminé à ce jour, nous avons décidé de le présenter sous la forme d'un article en préparation pour les raisons suivantes :

- cette présentation sous la forme d'un manuscrit à soumettre représente un exercice important de synthèse du travail réalisé et de rédaction,

- nous considérons la structure de l'article comme établie,
- les résultats obtenus à ce jour sont considérés comme définitifs et ne seront plus modifiés.

S'y ajouteront d'autres résultats relatifs aux travaux encore en cours ou à réaliser (**cf. Résultats §II.4, p.94**).

Ainsi, dans ce manuscrit, seront décrits l'ensemble des techniques utilisées, les résultats obtenus et les discussions afférentes à ceux-ci. Au cours de cette étude, de nombreuses combinaisons cytokiniques ont été utilisées lors des cultures comparatives de cellules CD34<sup>+</sup> de LRF à 0,1 et 20% d'O<sub>2</sub>. Les résultats obtenus lors de cette étape de mise au point sont présentés de manière succincte dans l'**Annexe 2**. Dans le manuscrit, nous avons retenu une unique période de culture (7 jours) et seulement deux conditions cytokiniques (IL-3, 10 ng/ml et SCF + TPO, respectivement à 100 et 10 ng/ml), du fait du maintien et de la forte amplification des cellules les plus primitives lors des LC2 consécutives à des LC1 faiblement oxygénées. Notons également que l'influence des conditions sélectionnées sur le maintien de la capacité de reconstitution hématopoïétique de ces cellules a été évaluée grâce à des xénogreffes dans des souris NOG, réalisées par injection intra-fémorale afin de pallier au problème, mentionné par divers groupes, de « greffabilité » des CSSP-H non cultivées.

### **II.3- Résultats et conclusions**

Les résultats présentés dans ce manuscrit ont permis de mettre en évidence que :

1- une culture de 7 jours de cellules CD34<sup>+</sup> de LRF à 0,1% d'O<sub>2</sub> freine leur prolifération et augmente la mortalité cellulaire, en comparaison avec des cultures réalisées à 20% d'O<sub>2</sub> et ce quelles que soient les conditions cytokiniques sélectionnées (IL-3 et SCF/TPO).

2- Les cultures de cellules CD34<sup>+</sup> de LRF à 0,1 et 20% d'O<sub>2</sub> permettent le maintien d'une population indifférenciée. Cependant, alors que la culture à faible oxygénation inhibe l'engagement dans les différents lignages hématopoïétiques, les cultures à 20% d'O<sub>2</sub>,

favorisent ce phénomène d'engagement.

3- La culture liquide primaire à 20% d'O<sub>2</sub> induit à la fois la prolifération/différenciation des pré-CFC et un maintien/expansion des CFC. En effet, les taux d'expansion cumulés, en sortie de LC1 et en sortie de LC2, montrent que le nombre de CFC détectés après ces phases de cultures est 20 fois plus élevé que le nombre de CFC détectés au temps 0. De plus, la combinaison entre le SCF et la TPO donne la meilleure expansion totale des populations de CFC, en comparaison avec l'ajout d'IL-3 seule, quelles que soient les conditions d'O<sub>2</sub> appliquées lors de la LC1.

4- La faible oxygénation inhibe le maintien/expansion des CFC et la prolifération/différenciation des pré-CFC pendant la phase de LC1. Cependant, elle favorise le maintien des pré-CFC durant cette même phase, comme le montrent les taux d'expansion obtenus au cours des LC2 consécutives. En effet, la comparaison des cinétiques d'expansion, calculées selon le ratio (nombre de colonies)<sub>LC2</sub>/(nombre de colonies)<sub>LC1</sub>, révèle une expansion plus tardive à 0,1% d'O<sub>2</sub>, témoignant de la primitivité des populations maintenues lors des LC1 dans ces conditions. De plus, il apparaît que l'ajout d'IL-3 favorise un meilleur maintien des pré-CFC, en comparaison avec les LC1 contenant la combinaison SCF + TPO.

5- Nous avons pu mettre en évidence un chimérisme suite à des greffes intra-fémorales de cellules CD34<sup>+</sup> de LRF fraîchement isolées. Ces observations confirment des résultats récents obtenus par notre groupe, non publiés et concernant la prise de greffe de ces cellules avant incubation. La culture à 20 ou 0,1% d'O<sub>2</sub> modifie la reconstitution de l'hématopoïèse dans les animaux receveurs. Nous avons pu montrer que des cultures de 7 jours à 20% d'O<sub>2</sub> permettaient un maintien de la capacité souche des cellules très fortement supérieur à celui observé après culture à 0,1% d'O<sub>2</sub>. Les conditions cytokiniques testées ont permis de révéler un rôle positif de la combinaison SCF + TPO, en comparaison avec la condition IL-3 seule, qui assure une prise de greffe semblable à celle observée avec des cellules non cultivées.

6- La culture de 7 jours à 0,1% d'O<sub>2</sub> permet d'augmenter le pourcentage de cellules CD34<sup>+</sup> en G<sub>0</sub>, à la différence des cultures à 20% d'O<sub>2</sub> qui favorisent l'entrée des cellules CD34<sup>+</sup> dans le cycle cellulaire. Elle assure enfin le maintien d'une population ne se divisant pas ou très peu durant cette étape de LC1, comme le montrent les profils de cytométrie en flux après double marquage CFSE/Ki-67.

Ces résultats sont analysés dans la partie discussion du manuscrit en cours de rédaction.

## **II.4- Perspectives**

Ces premiers résultats ont permis de mettre en évidence, lors de cultures de 7 jours à 0,1% d'O<sub>2</sub>, un maintien de cellules primitives capables d'expansion secondaire *in vitro* (pré-CFC) et de xéno greffe. Avant la soumission du manuscrit, présenté dans la prochaine section, ces travaux doivent être complétés par de nouvelles expériences de xéno greffes afin de valider définitivement les conclusions de l'étude. Une meilleure caractérisation des cellules quiescentes capables de greffe et des mécanismes de leur adaptation métabolique aux faibles concentrations d'O<sub>2</sub> nous apportera des éléments importants pour achever ce travail. Nous nous intéresserons donc prochainement :

- à la détection et à l'évolution des cellules SP (Side Population) du sang périphérique suite à leur culture à 20 et 0,1% d'O<sub>2</sub> et à l'étude de leur capacité de greffe. En effet, des résultats préliminaires (non publiés) du groupe montrent la présence de cellules SP dans la circulation en condition d'homéostasie.

- à l'étude du métabolisme glycolytique des cellules CD34<sup>+</sup> de LRF, lors de leur culture à 20 et 0,1% d'O<sub>2</sub>, afin de déterminer son rôle dans l'adaptation physiologique des cellules (survie et quiescence) aux faibles concentrations d'O<sub>2</sub>. En effet, les travaux de Dello Sbarba ont montré qu'un blocage de la chaîne respiratoire mitochondriale, par addition d'un excès de pyruvate dans les cultures, inhibe la prolifération des progéniteurs engagés, mais pas celle des CSH (Dello Sbarba, 1987). Ces observations suggèrent que le métabolisme des CSH serait

largement indépendant de l'O<sub>2</sub>. Dans cette optique, nous effectuerons des mesures de la consommation du glucose, de la production d'acide lactique, de l'activité mitochondriale et des variations de pH, lors de cultures à 0,1% d'O<sub>2</sub> de cellules CD34<sup>+</sup> issues de LRF. Parallèlement, nous tenterons d'inhiber la chaîne respiratoire de ces cellules par différents traitements (pyruvate, analogues du glucose, antimycine A), afin d'observer, sur les CFC et les pré-CFC, l'influence des différents métabolismes (glycolytique et oxydatif) lors de cultures à 20 et 0,1% d'O<sub>2</sub>.

## **II.5- Présentation du manuscrit**

### **Induction of quiescence and maintenance of hematopoietic stem cells during *ex vivo* culture of unmobilized steady state blood CD34+ cells at very low oxygen concentration (0.1%)**

*Yann Peytour<sup>1,2</sup>, Arnaud Villacreces<sup>1,2</sup>, Philippe Brunet de la Grange<sup>2,3</sup>, Amélie Guitart<sup>1,4</sup>, Zoran Ivanovic<sup>2,3</sup>, and Vincent Praloran<sup>1,2,5</sup>.*

From the <sup>1</sup>University of Bordeaux Segalen, CIRID, F-33000 Bordeaux, France; the <sup>2</sup>CNRS, CIRID, UMR 5164, F-33000 Bordeaux, France; the <sup>3</sup>Etablissement Français du Sang Aquitaine-Limousin, Bordeaux, France; <sup>4</sup>Paul O’Gorman Leukaemia Research Centre, Institute of Cancer Sciences, College of Medical, Veterinary, and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow G12 0XB, Scotland, UK and the <sup>5</sup>Laboratoire d’Hématologie, CHU of Bordeaux, Bordeaux, France.

#### **AUTHOR CORRESPONDANCE**

Prof. V. Praloran, MD, PhD, UMR CNRS 5164, Université Bordeaux Segalen, 146, rue Leo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France; e-mail: [vincent.praloran@u-bordeaux2.fr](mailto:vincent.praloran@u-bordeaux2.fr).

#### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that they have no conflicts of interest relevant to this manuscript.

#### **ABBREVIATIONS**

HSCs = haematopoietic stem cells, LRF(s) = leukoreduction filter(s), LC = liquid culture, CFC = colony forming cells, CFSE = carboxyfluorescein succinimidyl ester, NOG mice = non obese diabetic/Shi-*scid*, IL-2R $\gamma$ <sup>null</sup> mice, SSPB = steady state peripheral blood.

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Most CD34<sup>+</sup> cells culture studies are performed under high oxygen (O<sub>2</sub>) concentrations (20%), although physiological oxygenation in endosteal bone marrow (BM) niches, where long-term hematopoietic stem cells (HSCs) reside, is thought to be lower than 0.1%. Here we evaluated the effect of 7-days 0.1% O<sub>2</sub> cultures on steady state peripheral blood (SSPB) CD34<sup>+</sup> cells on several aspects of their biology, including HSC capacity.

**STUDY DESIGN AND METHODS:** Cells were cultured during 7 days at 20 and 0.1% O<sub>2</sub> in medium supplemented with either IL-3 or SCF + TPO before being replated at 20% O<sub>2</sub> for 14 days in liquid culture (LC) medium supplemented with a combination of cytokines inducing primitive and committed progenitors proliferation/differentiation. Their functional properties were studied after 7-days LC1 and 14 days after their replating in 20% O<sub>2</sub> LC2.

**RESULTS:** Cell growth was inhibited 3 to 4 times and mortality rate was significantly increased in 0.1 vs. 20% O<sub>2</sub> 7-days LC1. We also evidenced a defect of maturing cells for 0.1% O<sub>2</sub> LC1, but no significant differences in the maintenance of phenotypically primitive CD34<sup>+</sup> cells. Functional assays revealing pre-CFCs (LC2) and HSCs (xenograft) confirmed these phenotypic results; *in vitro* and *in vivo* repopulating cells being maintained after 7-days LC1 at 0.1% O<sub>2</sub>. Cell cycle and division status analysis of 0.1% O<sub>2</sub> cultured CD34<sup>+</sup> cells evidenced that more than 20% of them were quiescent (undivided or G0 returning cells).

**CONCLUSION:** We confirmed recent unpublished results of our group showing that SSPB CD34<sup>+</sup> freshly isolated from LRFs or cultured during 7 days at 20% O<sub>2</sub> were able to engraft immunodeficient NOG mice. We extended them by evidencing that 7-days 0.1% O<sub>2</sub> cultures did not alter their engraftment capacity, whereas cells remained undivided. Coupled with high mortality rates, phenotypic maturation defect and dramatic CFCs decrease in these 0.1% O<sub>2</sub> LC1, we can conclude that very low O<sub>2</sub> levels allows maintenance of quiescent HSCs, but is inappropriate for their proliferation/differentiation after commitment. These results bring new concepts for a better understanding of the role of O<sub>2</sub> in HSCs biology and suggest new approaches for the storage without freezing of graft samples.

## INTRODUCTION

The permanent and regulated production of mature blood cells, during all individual lifespan, depends on haematopoietic stem cells (HSCs) which are located in specialized bone marrow (BM) niches in close proximity with endosteal osteoblasts<sup>1-3</sup>. These pluripotent stem cells are characterized by their alternative capacities of self-renewal versus commitment, quiescence vs. proliferation and survival vs. apoptosis. The regulation of these balances is complex and involves multiple factors including cytokines, stromal/cellular adhesion molecules and numerous metabolic factors. Among these metabolic factors, oxygen (O<sub>2</sub>) plays an important role, which is still under investigation. Indeed, BM O<sub>2</sub> concentrations vary from about 4-5 % (as measured in capillaries) to probably less than 0.1% in stem cells BM niches as estimated by calculation<sup>4,5</sup>. However, despite the fact that these low/very low O<sub>2</sub> concentrations are physiological in several tissues and organ territories<sup>4-8</sup>, they are commonly called hypoxic in comparison to the normal atmospheric concentration (21% O<sub>2</sub>) considered as normoxia. The terms *in situ* normoxia, “physioxia” or low O<sub>2</sub> concentration would better describe these physiological tissue/cell O<sub>2</sub> concentrations and hypoxia would better define the concentrations lower than normal tissue O<sub>2</sub> concentrations found in various pathologies such as tumours, inflammation and ischemia. In mammals, the majority of HSCs is quiescent most of the time and resides in endosteal BM niches where O<sub>2</sub> concentration is lower than 0.1% (*in situ* normoxia)<sup>9,10</sup>. This cellular and metabolic environment maintains their life-long survival, quiescence and self-renewing capacities by protecting them from most extrinsic aggressions, which induce reactive oxygen species accumulation and/or DNA damage<sup>11-14</sup>. We and others showed that culture of human and murine primitive haematopoietic cells at decreasing O<sub>2</sub> concentrations (3; 1 and 0.1%) improved the expansion of normal progenitors (3% O<sub>2</sub>) and/or the maintenance of HSCs (3; 1 and 0.1% O<sub>2</sub>)<sup>15-25</sup>. We showed also that culture of human cord blood CD34<sup>+</sup> cells at 0.1% O<sub>2</sub> - physioxia for BM niches HSCs - induced their G<sub>0</sub> quiescence<sup>21</sup>. Some recent articles evidenced the role and mechanisms of HIF-1 $\alpha$  in the

adaptation of HSCs to low O<sub>2</sub> concentrations<sup>26,27</sup>. All these results confirm that local O<sub>2</sub> concentration is a major regulator of HSCs maintenance through its effects on their self-renewal versus commitment, quiescence vs. proliferation and survival vs. apoptosis balances. In the last 30 years, most researches and medical developments concerning HSCs used CD34+ cells issued either from BM, from blood after cytokine treatment and from perinatal cord blood<sup>28</sup>, because the percentages of CD34+ cells/HSCs are high in these materials. However, their obtaining is limited by ethical and technical reasons. Very few studies explored the presence and characteristics of HSCs in human adult steady state peripheral blood (SSPB). The very low percentage of CD34+ cells in blood - approximately 0.15% of mononuclear cells and 1-5 CD34+ cells/ $\mu$ l of blood<sup>29</sup>- and rare publications suggesting that they were unable to significantly engraft immunodeficient mice probably explain this fact. However, huge quantities of leucocytes from healthy blood donors are discarded every day by blood transfusion centres after the preparation of therapeutic red blood cells (RBCs) concentrates. Moreover, unmobilized CD34+ cells have not been exposed to the stimulating effects of growth factors injections used for the mobilization procedure, which can compromise their long-term repopulating potential<sup>30</sup>. We and others showed that large quantities of viable CD34+ cells with colony forming ability were trapped in and easily eluted from the leukoreduction filters (LRFs) now commonly used for the preparation of RBCs concentrates<sup>31-32</sup>. We recently set up a miniaturized method allowing the easy, rapid and efficient recovery of  $4.10^5$  to  $6.10^5$  CD34+ cells from one LRF<sup>33</sup>. This methodology made our present investigation feasible.

Here we investigated the effects of cytokines combination (IL-3 or SCF+TPO) and of a 7-day incubation of SSPB CD34+ cells at a very low O<sub>2</sub> concentration (0.1%) on several of their characteristics, including their capacity to engraft immunodeficient NOG mice. Indeed, if SSPB CD34+ cells contain long-term HSCs, that can be maintained or expanded in culture, they would then represent an interesting alternative to other sources of HSCs for future

regenerative medicine<sup>32</sup>. The data presented here compare the effects of 7-day incubation at 20 and 0.1% O<sub>2</sub> on survival, proliferation, differentiation, colony forming ability, cell cycle and division status of steady state blood CD34<sup>+</sup> cells. Finally and more importantly, we evidenced for the first time that these “ungraftable” CD34<sup>+</sup> cells maintained their HSCs capacity after this 7-day *ex vivo* incubation.

## MATERIALS AND METHODS

### **CD34<sup>+</sup> cells isolation**

Steady state blood CD34<sup>+</sup> cells were isolated as previously described<sup>33</sup> from LRFs obtained from the Etablissement Français du Sang Aquitaine-Limousin (EFS-AL). Briefly, leukocytes eluted from LRFs were deprived of platelets by low speed centrifugation. Mononuclear cells were then isolated on Ficoll and washed twice. CD34<sup>+</sup> cells were purified using a two-step ‘indirect’ immunomagnetic procedure (Indirect CD34 microbeads kit, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer procedure. Cells were counted using Trypan Blue dye staining for the identification of dead cells. The purity of isolated CD34<sup>+</sup> cells was measured by flow cytometry (FACSCanto, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA; all fluorochrome molecules were obtained from BD Biosciences, Meylan, France).

### **Primary liquid cultures (LC1)**

CD34<sup>+</sup> cells (viability >98%) were seeded at 10<sup>5</sup> cells/ml in Iscove Modified Dulbecco’s Medium (IMDM + GlutaMAX1, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) complemented with foetal bovine serum (FBS, Invitrogen, 10% v/v), penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 mg/ml) and with rHu IL-3 (10 ng/ml) or rHu SCF (100 ng/ml) + rHu TPO (10 ng/ml) (all cytokines from Peprotech, Neuilly-Sur-Seine, France). LC1 were maintained for 7 days at 37°C, either at a 20% O<sub>2</sub> concentration in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator (Binder, Tuttlingen, Germany) or at a 0.1% O<sub>2</sub> concentration in a low O<sub>2</sub> culture system (Xvivo, Biospherix, Red Eld, NY, USA). Cellular viability at day 7 was calculated as described above.

### **Secondary liquid cultures (LC2)**

LC1 cells were replated in LC2 at 10<sup>5</sup> cells/ml, cultured during 2 weeks (20% O<sub>2</sub>, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) in a serum-free medium containing recombinant IL-1, IL-3, IL-6, SCF, G-CSF, GM-CSF and Flt3 ligand (Stemα.AG, StemAlpha, Saint-Clément-Les-Places, France). Medium was renewed every 7 days of culture. As previously described, this method allows pre-CFCs and primitive progenitors, present at the end of LC1, to give rise to CFCs identifiable and countable in semi-solid cultures<sup>16,23,34</sup>.

### **Semisolid cultures**

The number of progenitors present in freshly purified CD34+ cells, after LC1 and throughout the LC2 was measured by counting myeloid colonies grown in semi-solid culture medium. For this test, 250 purified CD34+ cells or 5 µl of LC1 and LC2 cells were seeded into 24-wells plates (NUNC, Roskilde, Denmark) in 250 µl of Stemα.1D (Stem Alpha), a ready-to-use 0.9% semi-solid methylcellulose medium, supplemented with rHu cytokines (IL-3, IL-6, IL-11, SCF, EPO, GM-CSF and G-CSF) allowing the *in vitro* growth of CFU-GM, BFU-E and CFU-Mix. After 14 days of culture (37°C, 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>), colonies (>50 cells) were counted under an inverted microscope and the number of progenitors per millilitre of liquid culture was calculated.

### **Comparison of pre-CFCs and CFCs expansion rates during LC1 at 0.1 and 20% O<sub>2</sub>**

Liquid culture of CD34+ cells at 20% O<sub>2</sub> in cytokine supplemented medium induces the progressive loss of HSCs present at day 0 due to their commitment to pre-CFCs and CFCs. Thus, the total number of CFCs produced during the culture time is higher than the number of CFC seeded at time 0. This expansion rate depends on the cellular material and the culture conditions used (medium, serum, cytokines, metabolism, etc). CFCs were identified and counted by the number of colonies that they generate when seeded in semi-solid cultures. The ratio between the number of CFCs produced during liquid culture and their number in the

freshly isolated CD34<sup>+</sup> cells sample allows to compare the respective capacities of different LC1 conditions to maintain and expand the pre-CFCs and the CFCs present in the initial CD34<sup>+</sup> cells sample. In our system, LC1 represents a “conditioning” phase in which the hypoxic (0.1% O<sub>2</sub>) or normoxic (20% O<sub>2</sub>) parameters modifies the self-renewal, proliferation and differentiation of HSCs, pre-CFCs and CFCs. Replating the conditioned cells in identical LC2, at 20% O<sub>2</sub>, reveals the LC1-induced modification by amplifying them during the proliferation/differentiation processes. To quantify the effects of the LC1 conditioning phase, the number of colonies counted at the end of LC1 and after 14 days of LC2 were added and divided by the number of colonies present at time 0. This “expansion fold ratio” was used to compare the maintenance/expansion of pre-CFCs and CFCs in low oxygenated LC1. The kinetics of these processes were established by calculation of ratios between the number of colonies present at the end of LC1 and at time 0 and between the number of colonies present after 14 days of LC2 and at the end of LC1.

### **Myeloid differentiation analysis**

The influence of culture conditions on the commitment of CD34<sup>+</sup> cells towards myeloid lineages was explored by immuno-phenotypical analysis. Cells were multi-labelled with anti-CD34 and the following fluorescent antibodies: anti-CD45, anti-CD33, anti-CD38, anti-CD-61, anti-CD133 or anti-glycophorin A (all from BD Biosciences), that identify granulocytic, monocytic, megakaryocytic and erythroid differentiation antigens. Briefly, freshly isolated CD34<sup>+</sup> cells and cultured cells (7 days at 20 or 0.1% O<sub>2</sub>) were washed in PBS (Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> free, pH=7.2) supplemented with EDTA (10 mM), FBS (5%, v/v) and azide (0.05%, w/v), labelled for 30 minutes with fluorescent antibodies or with the corresponding isotype control, washed again and analysed by flow cytometry (FACSCanto, Becton Dickinson). Analysis was performed on CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>-</sup> subpopulations.

### **Cell cycle analysis**

Freshly isolated and cultured CD34<sup>+</sup> cells were triple labelled with Topro-3 iodide (T3605, 1 mM in DMSO, Invitrogen), anti-CD34-PE and anti-Ki-67-FITC antibody. Topro-3 iodide discriminates cells with 2n (G<sub>0</sub> and G<sub>1</sub> phases), >2n to <4n (S phase) and 4n (G<sub>2</sub> and M phases) DNA content. The nuclear antigen Ki-67 is absent in G<sub>0</sub> quiescent cells and expressed by all actively cycling cells (G<sub>1</sub> to M phases). Cells were washed and incubated for 30 minutes at room temperature in a 'fixation/permeabilization buffer', containing para-formaldehyde (PFA, 0.4%, v/v), saponin (0.02%, v/v), Hepes (pH 8; 10 mM) diluted in H<sub>2</sub>O. After a double wash in a 'washing buffer' (FBS 5%, sodium azide 0.05%, saponin 0.02% (all v/v) and EDTA 55 mg/l), cells were first labelled with the anti-CD34-PE antibody or with the corresponding isotype control antibody (mouse  $\gamma$ 1-PE), then washed and incubated with an anti-Ki-67-PE antibody (B56 clone) or with the corresponding isotype control (clone MOPC-21) for 30 minutes (all antigens from BD Biosciences). Washed cells were re-suspended in PBS supplemented with Topro-3 iodide and analyzed by flow cytometry.

### **Cell divisions analysis**

Our purpose was to know whether the G<sub>0</sub> CD34<sup>+</sup> cells present after 7 days of culture were issued from the 50% of G<sub>0</sub> CD34<sup>+</sup> cells in SSPB, that remained undivided, or if they were totally or partly issued from cells returning in G<sub>0</sub> after one or more divisions in culture. Cells were labelled with CFSE before culture and analysed after culture according to the manufacturer's instructions. CFSE (C34554, Invitrogen) is a stable vital intracellular fluorescent dye, whose decay is linked to cell division. Briefly, 10<sup>6</sup> SSPB CD34<sup>+</sup> cells were incubated in the dark for 15 min at 37°C in 1 ml of pre-warmed PBS supplemented with 1% BSA (v/v) and CFSE (10  $\mu$ M), then washed in IMDM + 10% FBS and returned for 30 min at 37°C in the dark. After a last wash, 10<sup>5</sup> cells/ml were cultured for 7 days at 20 and 0.1% O<sub>2</sub> in IMDM + 10% FBS + IL-3 (10 ng/ml). Every 48h, cell aliquots were labelled with

anti-Ki-67-PE antibody and their Ki-67/CFSE double fluorescence were analyzed by flow cytometry.

### **NOG-mice engraftment and chimerism analysis**

8 to 12-week-old NOG mice were conditioned by intra-peritoneal injection of Busulfan (20 mg/g), 48 and 24 hours before engraftment, allowing myelosuppression, as previously described<sup>35</sup>. Grafts were performed by intra-femoral injection, into anesthetised mice, of freshly isolated CD34<sup>+</sup> cells ( $2.5 \times 10^5$ ) or of cultured CD34<sup>+</sup> (number of cells corresponding to  $2.5 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup> cells seeded at time 0). Eight mice (4 males and 4 females) were used by culture condition. At 7 weeks post-engraftment, a mouse blood aliquot was analysed for human CD45 chimerism. Mice were sacrificed after 13 weeks and human chimerism was measured on cells extracted from injected and non-injected femurs and spleen. Human myeloid and lymphoid commitment was measured by flow cytometry after mouse anti-CD45, human anti-CD13 and anti-CD19 labelling (all from BD Biosciences).

## **RESULTS**

### **CD34<sup>+</sup> cells expansion and mortality rates depend on culture oxygenation (Table 1)**

Whatever the cytokines used, cellular expansion was 3 to 4 times lower after 7 days of culture at 0.1% O<sub>2</sub> and the mortality rate 2 to 3 times higher, reaching approximately 55%. These results confirm that culture of CD34<sup>+</sup> cells at an O<sub>2</sub> concentration lower than 1% significantly blocked the CD34<sup>+</sup> cells expansion and increased their mortality rate. Comparable results were obtained when cultures were supplemented with IL-3, SCF, TPO, IL-6 and SDF-1 (data not shown)

### **Culture at 0.1% O<sub>2</sub> concentration delays commitment of CD34+ cells (Figure 1)**

As expected from previous published results, culture at 20% O<sub>2</sub> induced a rapid phenotypic differentiation of CD34+/CD45+ cells, which was evidenced by 1- the dramatic decrease of CD34+/CD45+/CD38-/CD133+ cell number (Figure 1, upper panel), a population that contains primitive progenitors and part of HSCs; 2- the expansion of CD34-/CD45+ cells, labelled by differentiation/maturation markers, such as CD38, CD33, CD61 and GpA (Figure 1, lower panel). By comparison, the 7-days culture of CD34+ cells at 0.1% O<sub>2</sub> blocked their phenotypic maturation and even induced their apoptosis, as suggested by results of the lower panel. Concerning the maintenance of CD34+/CD45+/lin- cells (where lin- means lineage negative), it was similar to what was observed at 20% O<sub>2</sub>, evidencing that the very low O<sub>2</sub> concentrations, that was unable to maintain the proliferation/differentiation processes of CD34+ cells, allowed the survival of a limited subset of primitive CD34+ cells equivalent to what was observed at 20% O<sub>2</sub>. Similar effects, concerning the maintenance of primitive subset of cells, close to that was obtained at 20% O<sub>2</sub> and the blocking of differentiation/maturation at 0.1% O<sub>2</sub>, were obtained for cultures performed with medium supplemented with SCF + TPO (data not shown).

### **Maintenance/expansion of pre-CFCs and CFCs in liquid culture depends on O<sub>2</sub> concentration during LC1 (Figure 2)**

While after 7-days at 20% O<sub>2</sub>, the number of CFCs was 2 to 5 times higher than at time 0, it was 2 to 5 times lower in 0.1% O<sub>2</sub> cultures (Figure 2A, line 1), thus showing that CFCs survival was compromised at very low O<sub>2</sub> concentrations. The expansion of CFCs during LC1 and LC2 (Figure 2A, line 2) was also higher when LC1 was performed at 20% O<sub>2</sub> than at 0.1%, whatever the cytokines used. However, it should be noticed that the 7-days 0.1% O<sub>2</sub> LC1, which did not allow survival/expansion of CFCs, did not affect the survival of pre-CFCs, since the expansion of CFCs after 14 days of LC2 was 3 to 6 higher, compared to

time 0. Interestingly, comparison of the expansion rates of CFCs during the 14-days LC2, compared to 7-days LC1, evidenced that they were 2.5 to 4.5 higher when LC1 was performed at 0.1% O<sub>2</sub> (Figure 2B), evidencing a more primitive subset maintenance in these conditions. Culture performed in medium supplemented with SCF + TPO showed better amplification compared to time 0 and to what was obtained with medium supplemented with IL-3, whatever the O<sub>2</sub> concentrations applied during LC1. Interestingly, comparison of the expansion rates of CFCs during the 14-days LC2, compared to 7-days LC1 performed at 0.1% O<sub>2</sub>, evidenced that the medium supplemented with IL-3 gave better results compared to those with SCF + TPO, suggesting that primitive subset was better maintained for this condition.

**Compared effects of low versus high oxygenated cultures on CD34+ cells engraftment into NOG mice (Figure 3).**

Results show that engraftment was observed with freshly isolated SSPB CD34+ cells, which confirm non published results recently obtained by our group. Engraftment into NOG mice was observed both in blood, 7 weeks post-injection, or in bone marrow of injected or non-injected femurs, 13 weeks post-injection (Figure 3, upper panel and lower panel, respectively). Chimerism, consequently engraftment and presence of primitive hematopoietic cells, was always better with uncultured cells. 7-days culture at 20% O<sub>2</sub> allowed maintenance of these cells under SCF+TPO treatment but not under IL-3 treatment. The lowest chimerism rates were obtained from cells cultured at 0.1% O<sub>2</sub> and thus under IL-3 or SCF-TPO treatment. All these datas confirm the presence of potentially engraftable cells into peripheral blood physiologically, whereas culture in vitro with our treatment is not yet sufficient to expand them and to increase their stemness capacities.

### **Culture of CD34<sup>+</sup> cells at 0.1% O<sub>2</sub> inhibits their cellular divisions and induces their G0 quiescence**

As already observed by Hermitte et al.<sup>21</sup>, with cord blood CD34<sup>+</sup> cells, 55 and 45% of freshly isolated LRF CD34<sup>+</sup> cells were respectively in the G0 and G1 phases of the cell cycle (data not shown). As expected, after 7 days of LC1 at 20% O<sub>2</sub>, the percentage of G0 CD34<sup>+</sup> cells decreased to values lower than 10%, while the percentages of S and G<sub>2</sub>/M cells increased due to the proliferation. In contrast, after 7 days of LC1 at 0.1% O<sub>2</sub>, the percentage of G0 CD34<sup>+</sup> cells remains higher than 50% and the percentage of S phase cells lower than 10% (Figure 4). These data confirm and extend those from Hermitte et al. obtained with cord blood after 3 days of culture at 0.1% O<sub>2</sub><sup>21</sup>. Results showed only culture in IL-3 supplemented medium, but similar results were obtained under SCF/TPO treatment (data not shown).

Analysis of the CFSE fluorescence intensity and Ki-67 labelling of cells after 3, 5 and 7 days of LC1 showed that a significative percentage of CFSE labelled CD34<sup>+</sup> cells at day 0 remained undivided after 7 days at 0.1% O<sub>2</sub> (Figure 5.a and 5.b), while this fraction was highly reduced (3%) into 20% O<sub>2</sub> LC1 (Figure 5.b). Same results were obtained independently of the cytokine combination used.

## **DISCUSSION**

CD34<sup>+</sup> cells are a matter of intense research devoted to a better knowledge of their properties and regulatory mechanisms. Improvement of their *ex vivo* expansion, with maintenance of their engraftment capacity, is still a cell engineering challenge for regenerative medicine. Most experimental studies and clinical cell therapy procedures use CD34<sup>+</sup> cells isolated from cord blood and mobilized in peripheral blood, whose obtaining in sufficient amounts represents, sometimes, a limiting factor. We decided to use the well-established procedure, using LRFs<sup>33</sup>, to overcome with these limitations. Moreover, SSPB CD34<sup>+</sup> cells are poorly described in literature, which, in fact, made them an interestingly material. In addition, most

studies concerning HSCs maintenance/expansion are performed under high - supraphysiological - O<sub>2</sub> levels<sup>8</sup>. As a consequence, study of low O<sub>2</sub> concentrations seems to reflect more similarities with physiological parameters. Indeed, several recent studies showed that in bone marrow the physiological O<sub>2</sub> concentration range from about 4-5% in small vessels, where it was measurable, to probably less than 0.1% in endosteal bone marrow niches, where HSCs reside<sup>5,9,10</sup>. We found that 7-days LC1 at 0.1% O<sub>2</sub> inhibited proliferation, increased mortality of SSPB CD34+ cells, reduces maintenance of CFCs and proliferation/differentiation of pre-CFC, in comparison to cultures performed at 20% O<sub>2</sub>, but this work has revealed that a primitive, undifferentiated and non-dividing subset of cells were maintained at low O<sub>2</sub> concentrations; giving, moreover, better later expansion of CFCs, thus evidencing a beneficial role of this parameter in hematopoietic cell biology. Accordingly to these results we brought a hypothesized schematically view of the possible phenomenon that might come into play during these non established subset selection by low O<sub>2</sub> concentrations and explain results obtained in this work (Figure 6). So, this work allowed us to extend results of our group, initially performed on cord blood CD34+ cells and having studied only short-term incubation influence<sup>21</sup>. This work has also allowed to confirm unpublished results showing that SSPB CD34+ cells freshly eluted from LRFs, as well as after their 7-days culture, were able to engraft immunodeficient mice. Unfortunately, conditions applied during culture were not adapted to their expansion, maybe due to a lack of stromal cells layer, which could decrease mortality at lower oxygen concentration and increase stemness capacities of cultured cells at 20 and 0.1% O<sub>2</sub>. Finally, cytokine combination seems to play a critical role in the HSCs maintenance/expansion processes and combinations tested here have highlighted a potential beneficial role of IL-3, SCF or TPO in these phenomenon. Further studies and improved combinations should give rise better expansion, whose mechanisms remain to be well established.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by grants from la ligue nationale contre le cancer (comité sud-ouest) and the association Laurette Fugain. This work was also financed by a 2010 research fund of the Regional Aquitaine-Limousin Branch of French Blood Institute (EFS-AL) and by regular funding of University of Bordeaux 2 and CNRS. Yann Peytour was the recipient of CNRS fellowship and Amelie Guitart was the recipient of a doctoral fellowship from the French Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie. We thank C. Hamsany and her EFS-AL collaborators for their continuous help in providing us leukoreduction filters.

## REFERENCES

1. Nilsson S., Johnston H., Coverdale J. (2001). Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood* **97**:2293-2299.
2. Calvi L., Adams G., Weibrecht K. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**:841-846.
3. Zhang J., Niu C., Ye L. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**:836-841.
4. Chow D., Wenning L., Miller W., Papoutsakis E. (2001). Modeling pO<sub>2</sub> distributions in the bone marrow haematopoietic compartment. I. Krogh's model. *Biophys J* **81**:675-684.
5. Chow D., Wenning L., Miller W., Papoutsakis E. (2001). Modeling pO<sub>2</sub> distributions in the bone marrow haematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J* **81**:685-696.
6. Hemphill J., Smith W., Sonne D., Morabito D., Manley G. (2005). Relationship between brain tissue oxygen tension and CT perfusion: feasibility and initial results. *AJNR Am J Neuroradiol* **26**:1095-1100.
7. Ivanovic Z. (2009). Hypoxia or in situ normoxia: the stem cell paradigm, *J Cell Physiol* **219**:271-275.
8. Guitart A., Hammoud M., Dello Sbarba P., Ivanovic Z., Praloran V. (2010). Slow-cycling/quiescence balance of haematopoietic stem cells is related to physiological gradient of oxygen. *Exp Hematol* **38**(10):847-51.
9. Parmar K., Mauch P., Vergilio J., Sackstein R., Down J. (2007). Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:5431-5436.
10. Kubota Y., Takubo K., Suda T. (2008). Bone marrow long label-retaining cells reside in the sinusoidal hypoxic niche. *Biochem Biophys Res Commun* **366**:335-339.
11. Cheng T., Rodrigues N., Shen H. (2000). Haematopoietic stem cell quiescence maintained by p21<sup>cip1/waf1</sup>. *Science* **287**:1804-1808.
12. Hock H., Hamblen M., Rooke H. (2004). Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature* **431**:1002-1007.
13. Nygren J., Bryder D., Jacobsen S. (2006). Prolonged cell cycle transit is a defining and developmentally conserved hemopoietic stem cell property. *J Immunol* **177**:201-208.
14. Eliasson P., Rehn M., Hammar P., Larsson P., Sirenko O., Flippin L., Cammenga J., Jönsson J. (2010). [Hypoxia mediates low cell-cycle activity and increases the proportion of long-term-reconstituting haematopoietic stem cells during in vitro culture.](#) *Exp Hematol* **38**(4):301-310.
15. Schmaltz C., Hardenbergh P., Wells A., Fisher D. (1998). Regulation of proliferation-survival decisions during tumour cell hypoxia. *Mol Cell Biol* **18**:2845-2854.
16. Cipolleschi M., Rovida E., Ivanovic Z., Praloran V., Olivotto M., Dello Sbarba P. (2000). The expansion of murine bone marrow cells preincubated in hypoxia as an in vitro indicator of their marrow-repopulating ability. *Leukemia* **14**:735-739.
17. Desplat V., Faucher J., Mahon F., Dello Sbarba P., Praloran V., Ivanovic Z. (2002). Hypoxia modifies proliferation and differentiation of CD34(+) CML cells. *Stem Cells* **20**:347-354.
18. Ivanovic Z., Belloc F., Faucher J., Cipolleschi M., Praloran V., Dello Sbarba P. (2002). Hypoxia maintains and interleukin-3 reduces the pre-colony-forming cell potential of dividing CD34(+) murine bone marrow cells. *Exp Hematol* **30**:67-73.
19. Ivanovic Z., Hermitte F., De La Grange P., Dazey B., Belloc F., Lacombe F. (2004). Simultaneous maintenance of human cord blood SCID-repopulating cells and expansion of committed progenitors at low O<sub>2</sub> concentration (3%). *Stem Cells* **22**:716-724.
20. Giuntoli S., Rovida E., Barbetti V., Cipolleschi M., Olivotto M., Dello Sbarba P. (2006). Hypoxia suppresses BCR/Abl and selects imatinib-insensitive progenitors within clonal CML populations. *Leukemia* **20**:1291-1293.
21. Hermitte F., Brunet de la Grange P., Belloc F., Praloran V., Ivanovic Z. (2006). Very low O<sub>2</sub> concentration (0.1%) favours G<sub>0</sub> return of dividing CD34+ cells. *Stem Cells* **24**:65-73.

22. **Nguyen-Khac F., Della Valle V., Lopez R., Ravet E., Mauchauffe M., Friedman A.** (2006). Functional analyses of the TEL-ARNT fusion protein underscores a role for oxygen tension in haematopoietic cellular differentiation. *Oncogene* **25**:4840-4847.
23. **Giuntoli S., Rovida E., Gozzini A., Barbetti V., Cipolleschi M., Olivotto M.** (2007). Severe hypoxia defines heterogeneity and selects highly immature progenitors within clonal erythroleukemia cells. *Stem Cells* **25**:1119-1125.
24. **Kovacevic-Filipovic M., Petakov M., Hermitte F., Debeissat C., Krstic A., Jovicic G.** (2007). Interleukin-6 (IL-6) and low O<sub>2</sub> concentration (1%) synergize to improve the maintenance of haematopoietic stem cells (pre-CFC). *J Cell Physiol* **212**:68-75.
25. **Guitart A., Debeissat C., Hermitte F., Villacreces A., Ivanovic Z., Boeuf H., Praloran V.** (2011). Very low oxygen concentration (0.1%) reveals two FDCP-Mix cell subpopulations that differ by their cell cycling, differentiation and p27KIP1 expression. *Cell Death Differ* **18**(1):174-182.
26. **Simsek T., Kocabas F., Zheng J., Deberardinis R., Mahmoud A., Olson E., Schneider J., Zhang C., Sadek H.** (2010). The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell* **3-7**(3):380-90.
27. **Takubo K., Goda N., Yamada W., Iriuchishima H., Ikeda E., Kubota Y., Shima H., Johnson R., Hirao A., Suematsu M., Suda T.** (2010). Regulation of the HIF-1 $\alpha$  level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **3-7**(3):391-402.
28. **Koestenbauer S., Zisch A., Dohr G., Zech N.** (2009). Protocols for hematopoietic stem cell expansion from umbilical cord blood. *Cell Transplant* **18**(10):1059-68.
29. **Herbein G., Sovalat H., Wunder E., Baerenzung M., Bachorz J., Lewandowski H., Schweitzer C., Herbein G., Schmitt C., Kirn A.** (1994). Isolation and identification of two CD34<sup>+</sup> cell subpopulations from normal human peripheral blood. *Stem Cells* **12**:187-197.
30. **Wang J., Doedens M., Dick J.** (1997). Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay. *Blood* **89**(11):3919-3924.
31. **Meyer T., Zehnter I., Hofmann B., Zaisserer J., Burkhart J., Rapp S., Weinauer F., Schmitz J., Illert W.** (2005). Filter buffy coats (FBC): a source of peripheral blood leukocytes recovered from leukocyte depletion filters. *J Immunol Methods* **307**:150-166.
32. **Ivanovic Z., Duchez P., Morgan D., Hermitte F., Lafarge X., Chevaleyre J., Praloran V., Dazey B., Vezon G., Boiron J.** (2006). Whole-blood leuko-depletion filters as a source of CD34<sup>+</sup> progenitors potentially usable in cell therapy. *Transfusion* **46**:118-125.
33. **Peytour Y., Guitart A., Villacreces A., Chevaleyre J., Lacombe F., Ivanovic Z., Praloran V.** (2010). Obtaining of CD34<sup>+</sup> cells from healthy donors: development of a rapid and efficient procedure using leukoreduction filters. *Transfusion* **50**(10):2152-2157.
34. **Ivanovic Z., Bartolozzi B., Bernabei P., Cipolleschi M., Rovida E., Milenković P., Praloran V., Dello Sbarba P.** (2000). 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* **108**(2):424-429.
35. **Robert-Richard E., Ged C., Ortet J., Santarelli X., Lamrissi-Garcia I., de Verneuil H., Mazurier F.** (2006). Human cell engraftment after busulfan or irradiation conditioning of NOD/SCID mice. *Haematologica* **91**(10):1384.

## TABLES AND LEGENDS

	Living Cells (10 <sup>5</sup> /ml)		Mortality Rate (%)	
	20% O <sub>2</sub>	0.1% O <sub>2</sub>	20% O <sub>2</sub>	0.1% O <sub>2</sub>
<b>IL-3</b>	7.4 ±0.85	0.6 ±0.2 *	20.5 ±7.1	54.5 ±10.3 *
<b>SCF/TPO</b>	6.5 ±0.5	0.5 ±0.2 *	19.4 ±5.4	57.4 ±14.6 *

TABLE 1. CD34<sup>+</sup> cells expansion and mortality rates depend on culture oxygenation

CD34<sup>+</sup> cells were seeded at 10<sup>5</sup> cells/ml in IMDM supplemented with 10% FBS and IL-3 (10 ng/ml) or SCF (100 ng/ml) plus TPO (10 ng/ml) and cultured at 20% and 0.1% O<sub>2</sub> during 7 days. Living and dead cells were identified and counted on Malassez Cell with Trypan Blue exclusion. Mortality rates correspond to the ratios of dead cells to total counted cells. Values are the mean of 7 independent experiments. \*  $P < 0.01$ .

## TITLES AND LEGEND TO FIGURES

### **Figure 1. Culture at 0.1% O<sub>2</sub> delays commitment of CD34+ cells**

Flow cytometric analysis was performed on freshly isolated CD34+ cells (■) and on cells cultured during 7 days at 20 (■) and 0.1% (□) O<sub>2</sub> in medium supplemented with IL-3. The CD34+/CD45+ cells population was further characterized using anti-CD38 and anti-CD133 antibodies (upper panel). Commitment of CD34+ during these 7-days cultures was analysed by measuring the number of CD38, CD33 and CD61 and GpA positive cells inside the CD34-/CD45+ cells population (lower panel). Commitment into erythroid lineage was analysed by measuring the number of GpA positive cells inside the CD34-/CD45- cells populations, but was although mentioned on the same graph. Values correspond to an absolute number of cells in each fraction. Values mentioned on blocks correspond to ratio between the number of cells present in a specific phenotypic subset after 7 days of culture and the number of cells initially present in the same subset. Results are the mean of 3 independent experiments.

### **Figure 2. Comparison of the expansion rate of CFCs and pre-CF in various O<sub>2</sub> and cytokines conditions**

**A-** The CFCs expansion rates were determined by calculating the ratios between the number of CFCs after 7 days of LC1 or after 14 days of LC2 (in various culture conditions) and their number in the freshly isolated CD34<sup>+</sup> cells sample. For this purpose, the number of colonies issued from semi-solid cultures performed at the end of LC1 (*LC1 7 days*) and after LC2 (*LC2 14 days*) were added and divided by the number of colonies present at time 0. **B-** The kinetics of maintenance and expansion of pre-CFCs and primitive CFCs during each phase of the liquid cultures (LC1 or LC2) were evaluated by calculating the ratios between the number

of colonies present at the end of LC1 and those at time 0 (LC1 expansion rates) and between  
the

number of colonies present after 14 days of LC2 and at the end of LC1 (LC2 expansion rates). At time 0, the number of colonies counted on semi-solid medium was of about  $2.5 \times 10^4$  colonies/ml ( $\pm 0.12 \times 10^4$ ), which corresponds to a percentage of clonogenicity of 50%. Values are the mean of 3 independent experiments. \*  $P < 0.01$ .

### **Figure 3. Chimerism analysis of freshly or culture engrafted cells**

Cells recovered either in blood or injected/non-injected femurs were analysed by cytofluorimetry after human anti-CD45 labelling. Cells were also labelled with mouse anti-CD45 to discriminate them from mice cells and with human anti-CD13 and human anti-CD19 to determine the commitment lineage of human cells. Cells were analysed 7 weeks post-engraftment in peripheral blood (**Upper panel**) and after 13 weeks in injected femurs (**Lower panel**). For every group of 8 mice per condition (time 0, 20% O<sub>2</sub>, 0.1% O<sub>2</sub>, medium supplemented with IL-3 or SCF+TPO), chimerism for human CD45+ cells was presented for male (●) and female (○) subgroups and median was calculated for each gender.

### **Figure 4. Cell cycle distribution of cultured CD34+ cells after 7 days at 20 or 0.1% O<sub>2</sub>**

Results were obtained using an anti-CD34/anti-KI-67/Topro-3 iodide staining. Cells were analysed after 7 days of culture at 20 (■) or 0.1% (□) O<sub>2</sub>, in IMDM + 10% FBS with IL-3 (10 ng/ml). Values presented were determined specifically on the CD34+ cells subset. Results are the mean of 4 independent experiments and standard deviations are presented as error bars.

\*  $P < 0.01$ .

**Figure 5: Division status of cultured cells, under both normoxic and hypoxic conditions, by CFSE/anti-Ki-67 staining**

**A.** Cytometric profile of one independent experiment of cells cultured after CFSE staining during 7 days in IMDM + 10% FBS and SCF/TPO at 20 and 0.1% O<sub>2</sub>. Vertical and horizontal axes mean, respectively, the fluorescent intensity of anti-Ki-67-PE and CFSE. Black rectangles correspond to initial CFSE intensity (CFSE<sup>high</sup>) and to Ki-67<sup>neg</sup> cells. Percentage of KI-67<sup>neg</sup>/CFSE<sup>high</sup> cells include in the rectangle are presented in front of each graph. **B.** Percentage of KI-67<sup>neg</sup>/CFSE<sup>high</sup> cells after 7 days of culture in IMDM + 10% FBS and SCF/TPO or IL-3 at 20 and 0.1% O<sub>2</sub>. Values are the mean of 3 independent experiments.

**Figure 6: Hypothetic models for the maintenance of very primitive hematopoietic cells under low O<sub>2</sub> concentrations (0.1%)**

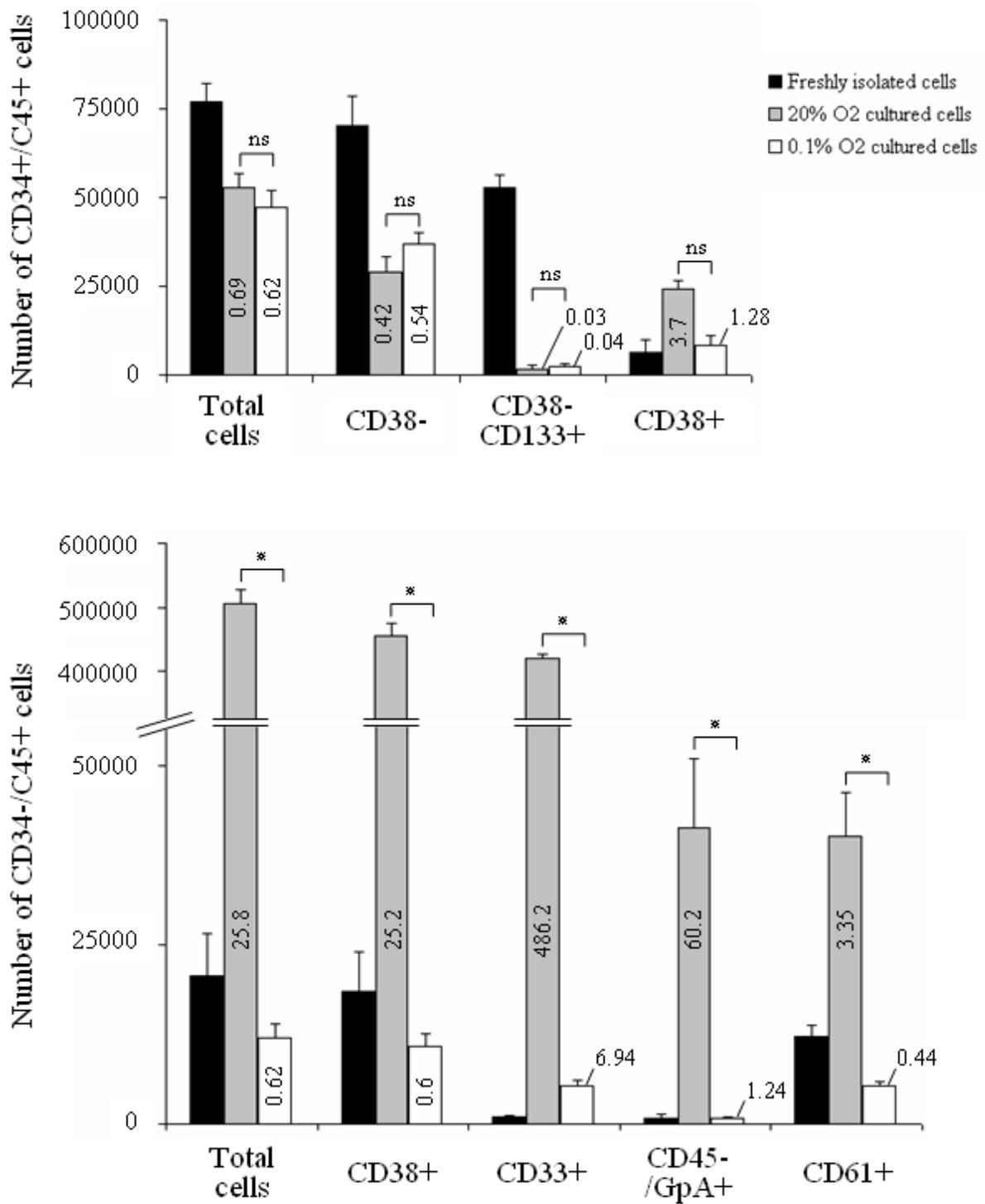


FIGURE 1.

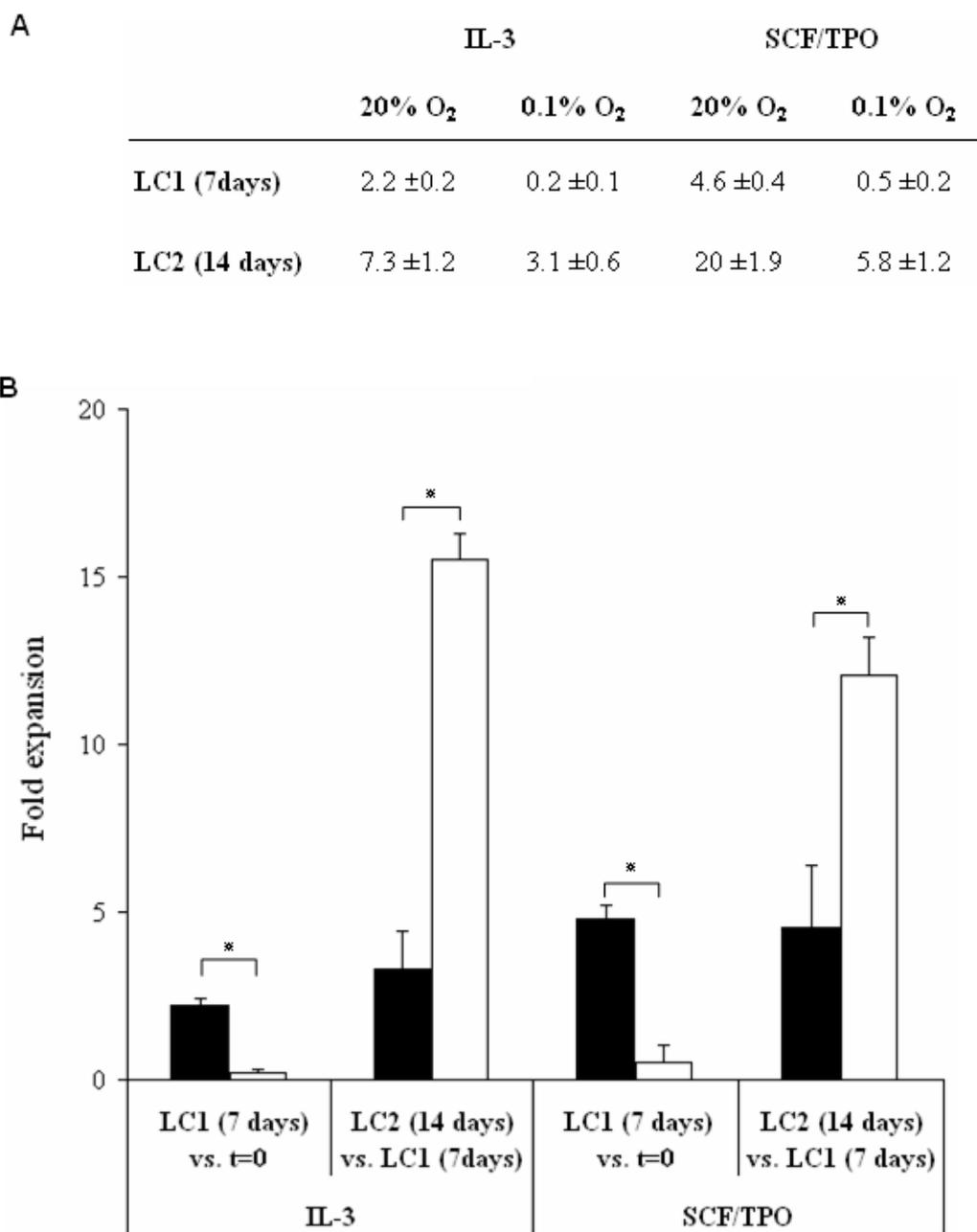


FIGURE 2.

Résultats - Etude de l'effet des basses concentrations d'O<sub>2</sub> sur les CSH adultes normales

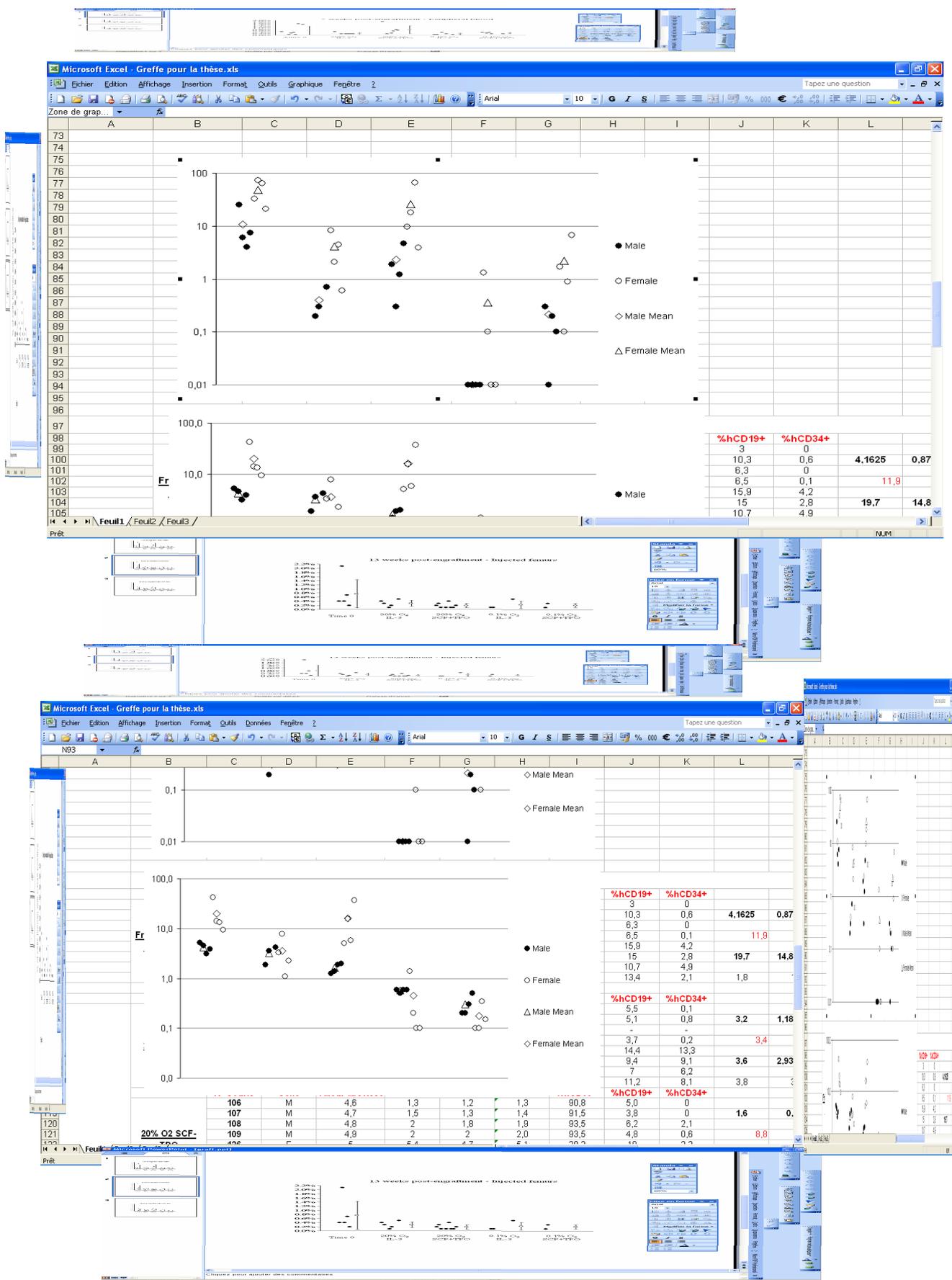


FIGURE 3.

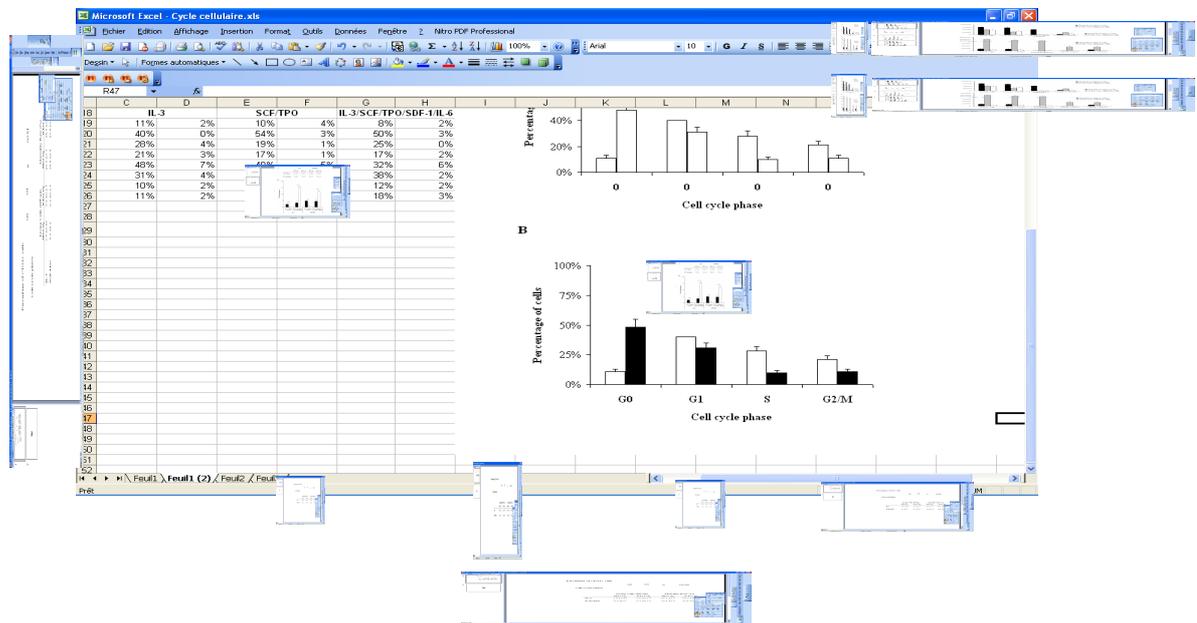
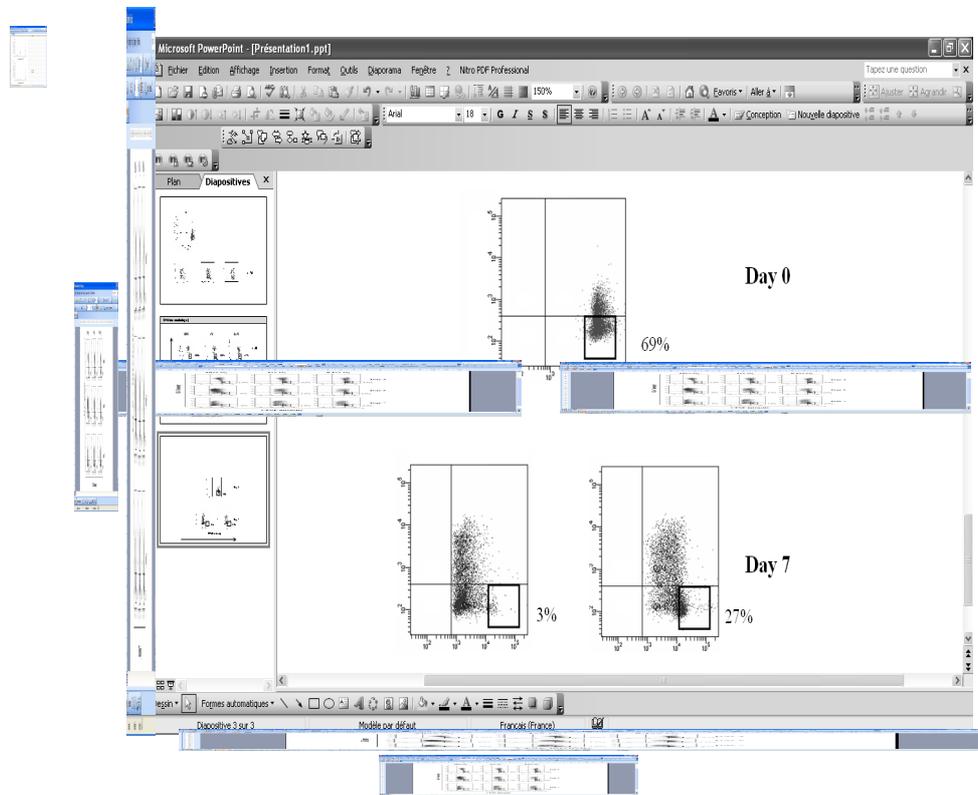


FIGURE 4.



**B**

		Days of culture		
		3 <sup>rd</sup> day	5 <sup>th</sup> day	7 <sup>th</sup> day
<b>IL-3</b>	<b>20% O<sub>2</sub></b>	15.2 ±0.6	8.1 ±0.7	4.2 ±1.2
	<b>0.1% O<sub>2</sub></b>	50.2 ±5.2	41 ±3.1	23.4 ±2.7
<b>SCF/TPO</b>	<b>20% O<sub>2</sub></b>	13.4 ±1.4	5.6 ±0.7	2.9 ±0.3
	<b>0.1% O<sub>2</sub></b>	47.2 ±2.1	36.6 ±1.1	26.8 ±0.7

FIGURE 5.

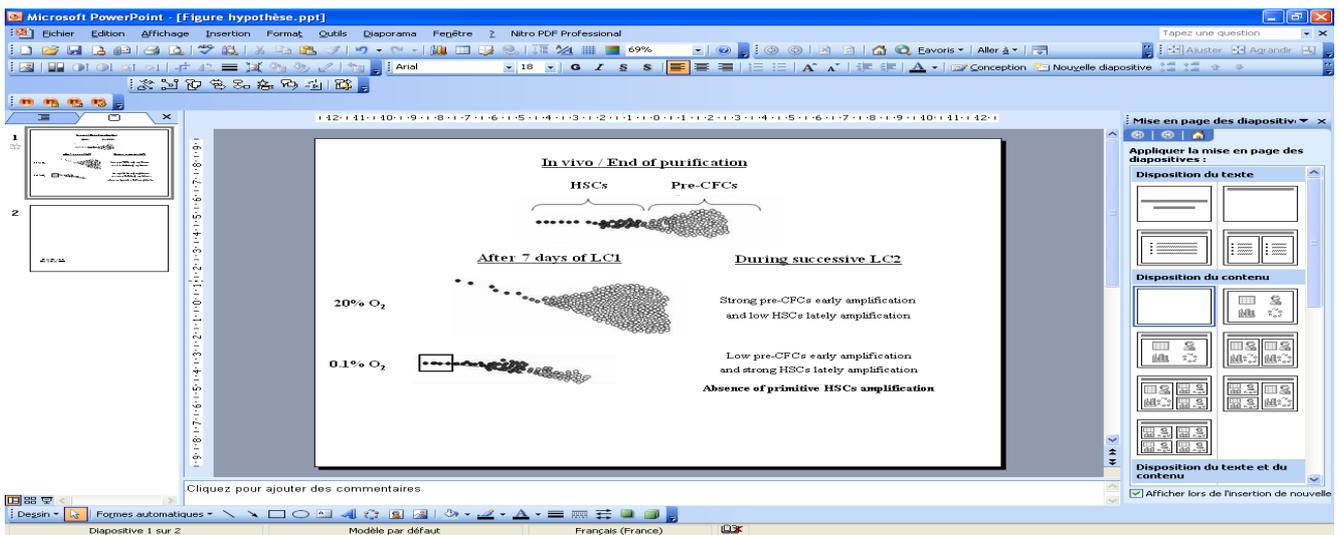
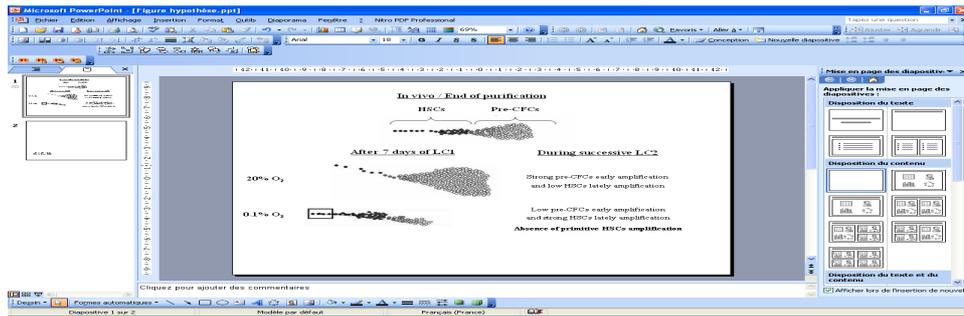


FIGURE 6.

### **III- Etude de l'effet des basses concentrations d'O<sub>2</sub> sur la quiescence d'une lignée cellulaire de leucémie myéloïde chronique (K562)**

Cette dernière section est consacrée aux résultats obtenus dans le cadre d'un stage de six mois (décembre 2010 - juin 2011) dans l'équipe du Pr. Dello Sbarba, au sein du Dipartimento di Patologia e Oncologia Sperimentali de l'Université de Florence (Italie). Ce séjour a été effectué dans le cadre d'une thèse co-dirigée par le Pr. Dello Sbarba et le Pr. Vincent Praloran (co-tutelle entre l'Université de Florence et l'Université Bordeaux Segalen). Depuis le début des années 1990, cette équipe s'intéresse à l'étude de l'effet des basses concentrations d'O<sub>2</sub> sur les cellules souches hématopoïétiques leucémiques (CSL) et normales et, plus particulièrement, aux phénomènes de résistance de certaines populations cellulaires au traitement actuel de première intention de la leucémie myéloïde chronique (LMC) : l'imatinib mésylate (IM).

#### **III.1- Contexte et objectifs des travaux**

La LMC est une maladie hématopoïétique néoplasique, caractérisée par l'expansion maligne de CSH pluripotentes dans la moelle osseuse. Trois stades cliniques sont couramment décrits (phase chronique, phase d'accélération et phase blastique). Une mutation somatique, entraînant une translocation chromosomique spécifique, est considérée comme la cause de la maladie. Cette translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22 [t(9;22)] génère l'oncogène *bcr-abl* (breakpoint cluster region-abelson murine leukemia viral oncogene homolog) à l'origine de la protéine hybride **BCR-Abl**. Cette oncoprotéine possède une activité tyrosine kinase dérégulée par rapport à la forme constitutive de Abl (Lugo, 1990) et son expression entraîne une prolifération anormale des cellules, une inhibition de l'apoptose

et une hyper-phosphorylation des résidus tyrosines de certaines protéines cibles (Deininger, 2000). Le traitement des patients atteints de LMC a connu d'importantes améliorations au cours des dernières décennies. Aux traitements non spécifiques (hydroxyurée, interféron- $\alpha$ , ou allogreffe de cellules souches), ont succédé des thérapies ciblées mettant en jeu des inhibiteurs de tyrosine kinase (**ITK**). Le premier ITK approuvé en clinique a été l'**IM** (ou STI571), commercialisé sous le nom de Gleevec®. Il représente actuellement le traitement de première intention des patients atteints de LMC, mais des molécules de seconde génération ont également vu le jour depuis quelques années (dasatinib, nilotinib). Malgré l'efficacité de l'IM il persiste des cellules leucémiques résistantes à l'IM, à l'origine de la maladie minimale résiduelle (**MMR**) et des rechutes de la maladie. Ces mécanismes de résistance sont actuellement inexpliqués.

Concernant l'étude de l'effet des basses concentrations d'O<sub>2</sub> sur les cellules de LMC *in vitro* et de l'importance de ce paramètre *in vivo*, peu de travaux ont jusqu'à présent été réalisés. Notre équipe a montré qu'une culture de 8 jours à 1% d'O<sub>2</sub> de cellules CD34<sup>+</sup> issues de patients atteints de LMC inhibait leur prolifération et préservait le nombre de pré-CFC, ainsi que l'expression du marqueur CD34, comparativement à des cultures à 20% d'O<sub>2</sub> (Desplat, 2002). La culture de ces cellules à 1% d'O<sub>2</sub> pendant 24 heures a permis de révéler également une diminution de l'hyper-phosphorylation des résidus protéiques tyrosines.

Par la suite, l'équipe de P. Dello Sbarba a mis en évidence qu'une culture de 7 jours à 0,1% d'O<sub>2</sub> réduisait fortement le nombre de cellules viables de plusieurs lignées cellulaires de LMC et notamment de la K562, comparativement à des cultures à 20% d'O<sub>2</sub> (Giuntoli, 2006). Le transfert des cellules issues de ces LC1 à 0,1% d'O<sub>2</sub> vers des LC2 à 20% d'O<sub>2</sub> a permis de mettre en évidence une meilleure préservation des CRC (pour mémoire, culture repopulating

cells) et une augmentation du nombre de CFC, par rapport aux résultats obtenus suite à une LC1 à 20% d'O<sub>2</sub>. Parallèlement au maintien des CRC résistantes aux faibles concentrations

d'O<sub>2</sub>, cette étude a montré que la faible oxygénation permettait de maintenir des CRC résistantes à l'IM, non retrouvées lors de cultures à 20% d'O<sub>2</sub>, suggérant que ces cellules résistantes pourraient être à l'origine de la MMR. En effet, l'étude de l'oncogène *bcr-abl* a révélé que l'expression de la protéine BCR/Abl était totalement inhibée lors de cultures à basses concentrations d'O<sub>2</sub>, alors que la transcription de *bcr-abl* n'était pas affectée de manière significative. La sensibilité à l'IM et l'expression de BCR/Abl sont recouvrées lors du transfert des cellules cultivées en LC1 faiblement oxygénées, vers des LC2 à 20% d'O<sub>2</sub>.

Plus récemment, de manière à déterminer si les basses concentrations d'O<sub>2</sub> assurent, seules, la sélection des populations de progéniteurs de LMC résistantes à l'IM ou si celle-ci est liée à d'autres facteurs environnementaux/métaboliques, le rôle de la disponibilité en glucose et du métabolisme glycolytique a été étudié, lors de cultures de cellules de patients atteints de LMC ou de cellules K562 en condition de faible oxygénation (Giuntoli, 2011). La disponibilité en glucose semble réguler l'expression de BCR/Abl dans les cellules cultivées à faible concentration d'O<sub>2</sub>. Elle interviendrait également dans l'équilibre entre maintien des progéniteurs et sélection des cellules souches, au sein de la population résistante à ces faibles concentrations d'O<sub>2</sub>. Lors de cultures à haute densité cellulaire (**HD**), la concentration en glucose atteint rapidement une valeur nulle et ce, à 20 et à 0,1% d'O<sub>2</sub>. Cette consommation est considérablement ralentie lors de cultures à faible densité cellulaire (**LD**) et l'absence totale de glucose n'est révélée que tardivement à 20% d'O<sub>2</sub>, puis plus tardivement encore à 0,1% d'O<sub>2</sub>. Ces résultats, couplés aux cinétiques de prolifération, établissent un lien direct entre la diminution de cellules vivantes, l'augmentation du pourcentage de cellules mortes et la consommation de glucose. Concernant l'expression de BCR/Abl, elle est inhibée consécutivement à la consommation totale du glucose dans les cultures à 0,1% d'O<sub>2</sub>. Ceci suggère un rôle important, mais non encore défini, de l'interaction entre la concentration en glucose et la concentration d'O<sub>2</sub> sur la régulation de l'expression de BCR/Abl.

L'objectif principal de ce stage a été de déterminer le positionnement des cellules leucémiques dans le cycle cellulaire lors de culture à faibles concentrations d'O<sub>2</sub>, afin d'établir un lien possible entre leur quiescence et les différents phénomènes de résistance précédemment décrits. En effet, les rares travaux dédiés à l'étude de ce phénomène ont montré que la résistance des progéniteurs quiescents de LMC pouvait contribuer à leur maintien chez des patients traités à l'IM et que ceux-ci pourraient être à l'origine de la MMR (Holtz, 2005). Cependant, ces travaux, réalisés à 20% d'O<sub>2</sub>, n'ont pas permis d'établir de liens directs entre la quiescence de ces cellules en condition de faible oxygénation et le maintien d'une population BCR/Abl-résistante. Les différentes techniques utilisées lors de ce séjour, ainsi que les résultats obtenus et leur analyse seront présentés dans les sections suivantes.

### **III.2- Matériels et méthodes**

La lignée cellulaire K562, dérivée d'une patiente de 53 ans en phase blastique, est la première lignée immortalisée de leucémie myéloïde humaine à avoir été établie (Lozzio, 1975). Pour notre étude, ces cellules non adhérentes exprimant l'oncogène *bcr-abl* ont été cultivées en milieu RPMI 1640 (+ FBS [10%, v/v] + pénicilline [50 unités/ml] + streptomycine [50 µg/ml], [EuroClone, Paington, UK]). Les travaux ont été réalisés à partir de cellules en phase de croissance exponentielle, implantées à 3.10<sup>5</sup> (HD) ou 3.10<sup>4</sup> (LD) cellules/ml et incubées respectivement pendant 7 ou 14 jours, à 37°C dans une atmosphère saturée en eau et contenant 0,1% d'O<sub>2</sub> et 5% de CO<sub>2</sub> (Concept 400, Anaerobic Workstation, Ruskin Technology Ltd, Bridgend, UK). La viabilité des cellules et leur positionnement dans le cycle cellulaire après différentes périodes d'incubation ont été analysés selon des techniques précédemment décrites (**cf. p.82**).

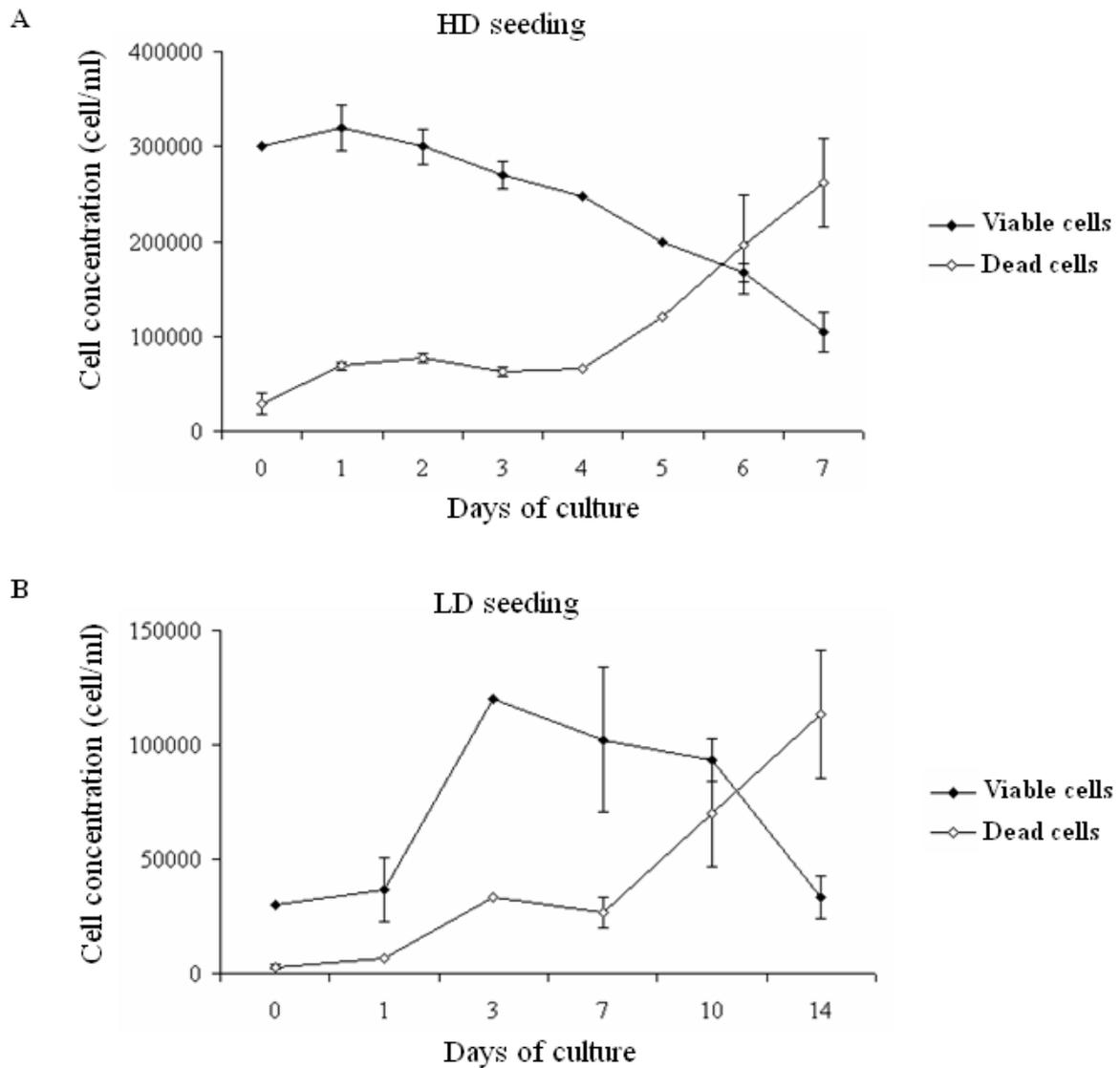


Figure 26 : Croissance de la lignée cellulaire K562 à 0,1% d'O<sub>2</sub> en fonction de la concentration initiale d'implantation

Les quantités de cellules vivantes (viable cells) et mortes (dead cells) ont été déterminées lors de cultures de cellules K562 à 0,1% d'O<sub>2</sub>, initialement implantées à  $3 \cdot 10^5$  (HD, **A**) ou  $3 \cdot 10^4$  (LD, **B**) cellules/ml. Ces cultures ont été réalisées pendant 7 et 14 jours, respectivement. Les valeurs correspondent à la moyenne de 4 expériences indépendantes et les écarts types calculés sont figurés par des barres d'erreur.

Pour la détection des protéines, des lysats protéiques ont été réalisés suite au lavage des cellules ( $5 \cdot 10^6$ , PBS + 100  $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) et à leur incubation, pendant 10 minutes à 95°C, dans un tampon Laemmli (Tris/HCl 62.5 mM, pH 6.8, 10% glycérol, 0.005% bleu de bromophénol, 2% SDS). Après centrifugation (20000 g, 10 minutes, RT) et détermination de la concentration protéique dans les surnageants (méthode BCA), des aliquots (30  $\mu$ g/échantillon) ont été placés à 95°C pendant 10 minutes en présence de 2-mercaptoethanol (100 mM). Les protéines ont été séparées par à une électrophorèse sur gels de polyacrilamide (7,5 et 15%), puis transférées sur membrane PVDF (polyvinylidene difluoride, Millipore Corporate, Billerica, USA). Suite à la fixation des membranes dans un tampon OBB/PBS (Odyssey Blocking Buffer), celles-ci ont été incubées, « overnight » à 4°C, en présence des différents anticorps primaires, dilués au 1/1000<sup>e</sup> dans un tampon PBS + 0,1% Tween : anti-phospho-c-Abl, anti-c-Abl, anti-phospho-Crkl, anti-p21<sup>Cip1</sup>, anti-p27<sup>Kip1</sup>, anti-p57<sup>Kip2</sup> et anti-GAPDH (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). L'incubation en présence des anticorps secondaires (IRDye<sup>®</sup>800CW- ou IRDye<sup>®</sup>680-conjugated, LI-COR<sup>®</sup> Biosciences, Lincoln, NE, U.S.A.) a permis la révélation de bandes protéiques grâce au système de détection Odyssey Infrared Imaging System Densitometry (LI-COR<sup>®</sup>).

### **III.3- Résultats**

La culture de cellules K562 à 0,1% d'O<sub>2</sub> a confirmé les résultats précédemment établis concernant l'influence des concentrations cellulaires d'implantation sur les cinétiques de prolifération (**Figure 26**). En effet, lors d'une implantation à forte densité cellulaire (HD), la prolifération cellulaire est abolie dès le deuxième jour et le nombre de cellules retrouvées au bout de 7 jours est 3 fois plus faible que la quantité initialement implantée. Ce phénomène est également observé lorsque les cellules sont implantées à faible densité (LD). Cependant, un décalage dans le temps est observé par rapport à la condition HD et les quantités de cellules obtenues après 14 jours de culture sont similaires aux valeurs d'implantation. Dans les deux

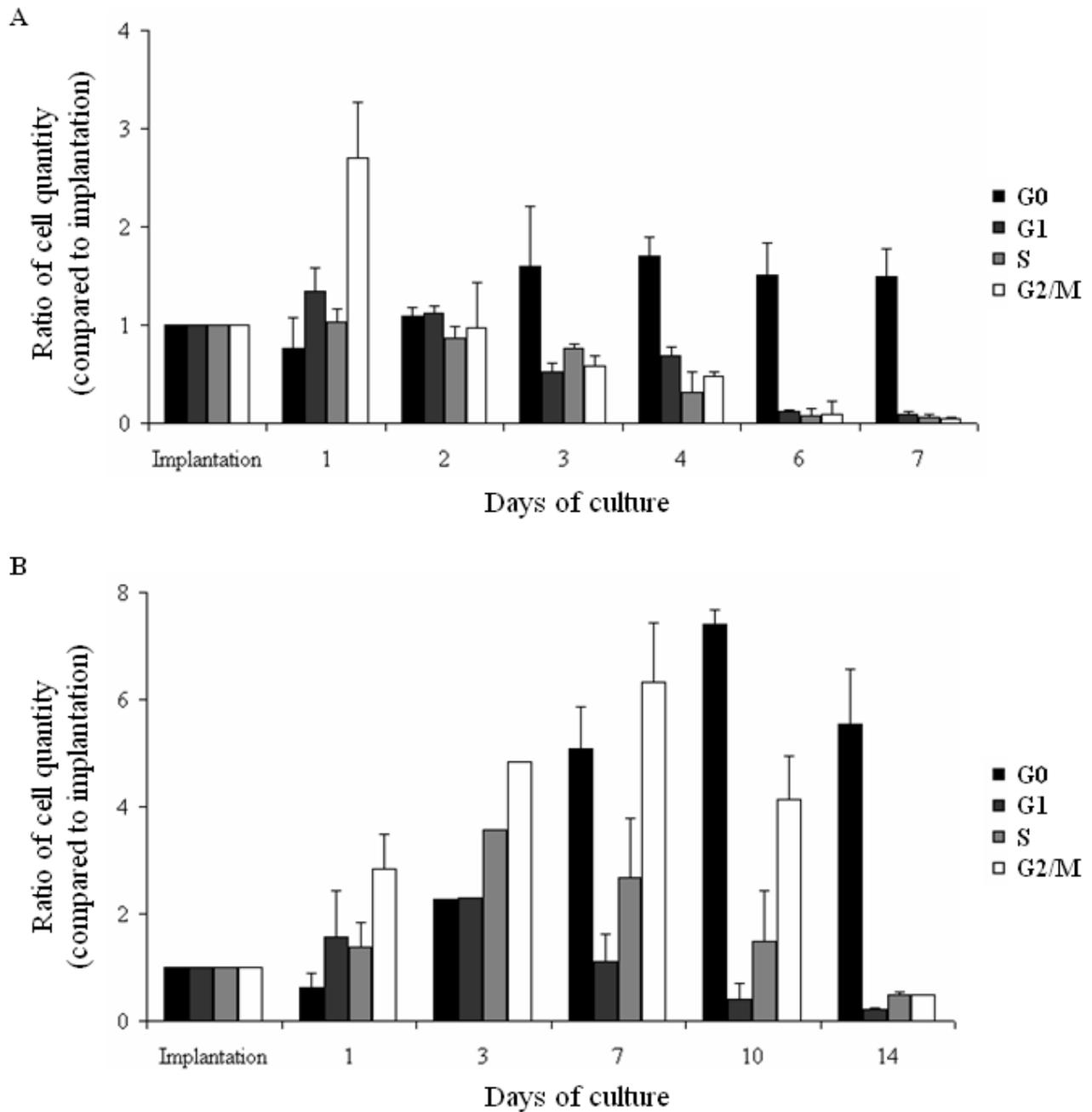


Figure 27 : Evolution des quantités de cellules K562 dans les phases du cycle cellulaire lors de culture à 0,1% d'O<sub>2</sub>

L'analyse du positionnement des cellules dans le cycle cellulaire lors de cultures à 0,1% d'O<sub>2</sub>, initialement implantées à forte (A) ou faible (B) densité cellulaire durant 7 et 14 jours respectivement, a permis d'établir des ratios entre la quantité de cellules dans une phase donnée du cycle à un temps x et la quantité de cellules initialement retrouvées dans cette phase. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes et les écarts types calculés sont figurés par des barres d'erreur.

cas, une forte augmentation de la mortalité cellulaire est observée dès le 4 et le 7<sup>ème</sup> jour, pour les conditions HD et LD respectivement.

Parallèlement, le calcul des ratios entre la quantité de cellules dans une phase donnée du cycle cellulaire et la quantité de cellules initialement présentes dans cette phase avant culture montre que la quantité de cellules en phase G<sub>0</sub> augmente, quelles que soient les conditions d'implantation, au cours de la culture à 0,1% d'O<sub>2</sub> et ce malgré l'augmentation de la mortalité cellulaire (**Figure 27**). D'autre part, malgré une augmentation du nombre de cellules en phase S/G2/M lors du premier jour de culture dans la condition HD corrélée à l'augmentation de la prolifération cellulaire, peu de cellules sont retrouvées dans les phases actives du cycle cellulaire dès le 2<sup>ème</sup> jour d'incubation. Dans les conditions de faible densité d'implantation, l'augmentation du nombre de cellules en phase S/G2/M est observée jusqu'au 7<sup>ème</sup> jours de culture et diminue fortement durant les derniers jours de culture. Ceci est en lien direct avec les cinétiques de prolifération observées pour cette condition.

La réalisation de lysats protéiques, lors de cultures de 7 jours à 0,1% d'O<sub>2</sub> et implantées à forte densité cellulaire, ainsi que l'analyse par Western Blot de différentes protéines d'intérêt montrent que dans ces conditions de culture, BCR/Abl est fortement exprimée jusqu'au 3<sup>ème</sup> jour et que son expression est ensuite abolie dans les cellules de K562. L'expression de pCrkl, protéine régulée positivement par BCR/Abl, présente des variations similaires à BCR/Abl (**Figure 28**). L'analyse de protéines régulant le cycle cellulaire (p57<sup>KIP2</sup>, p27<sup>KIP1</sup>, p21<sup>CIP1</sup>) a également été réalisée. Il apparaît que l'expression de p57<sup>KIP2</sup> diminue tout au long de la culture, de manière identique à p27<sup>KIP1</sup>; cependant, un niveau d'expression résiduel est retrouvé pour cette dernière après 7 jours d'incubation. Il apparaît également que l'expression de p21<sup>CIP1</sup> augmente dès le 2<sup>ème</sup> jour de culture et ce jusqu'à la fin de la période d'incubation à 0,1% d'O<sub>2</sub>. L'ensemble de ces résultats préliminaires, non figurés ici, doit être reproduit afin de confirmer notre analyse.

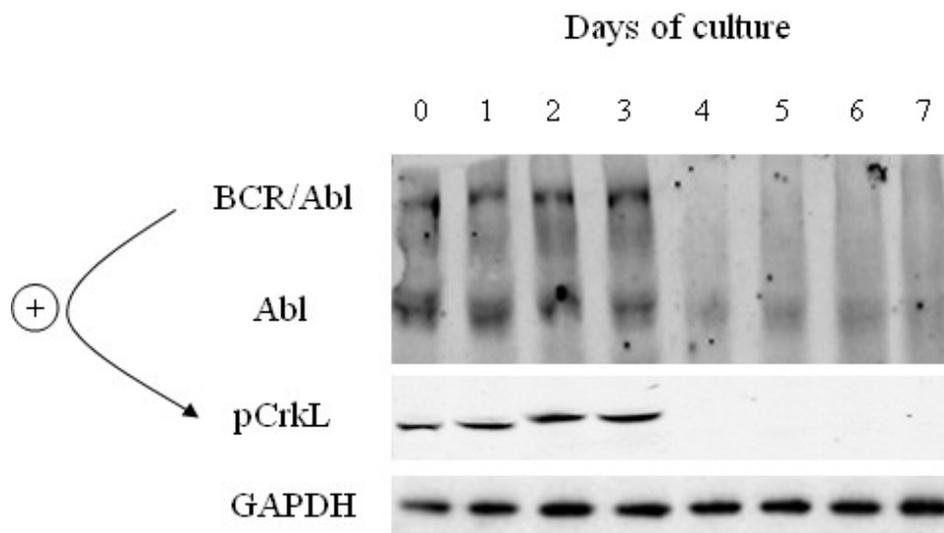


Figure 28 : Evolution des quantités protéiques de BCR/Abl, Abl et pCrkl en fonction de la durée d'incubation des cellules K562 à 0,1% d'O<sub>2</sub>

Les lysats protéiques ont été réalisés, chaque 24 heures, lors de cultures de 7 jours, initialement implantées à  $3.10^5$  cellules/ml (condition HD). La protéine pCrkl est utilisée comme témoin positif de l'expression de BCR/Abl et la GAPDH comme témoin de charge, du fait de l'invariance de son expression lors de cultures à basse concentration d'O<sub>2</sub>.

Enfin, l'influence de nouveaux ITK, favorisant l'apoptose des cellules de lignées leucémiques de manière synergique en combinaison avec l'IM à 20% d'O<sub>2</sub> (résultats non publiés), sur la résistance des populations leucémiques primitives a également été explorée lors de cultures à 0,1% d'O<sub>2</sub>. Pour cela, trois agents ont été testés sur les cellules de la lignée K562 - l'ABT-737, l'ABT-263 et l'obatoclox mésylate - combinés ou non à l'IM. Cependant, les premières expériences de mise au point n'ont pas permis d'observer, en comparaison avec les résultats obtenus par traitement avec l'IM seule, de différences significatives en terme d'augmentation synergique de l'apoptose, de modification des profils de positionnement dans le cycle cellulaire ou de maintien de la capacité des cellules à repeupler des cultures liquides secondaires et ne seront donc pas présentés ici.

### **III.4- Discussions et perspectives**

Les résultats obtenus durant ce stage ont d'abord confirmé les résultats du groupe concernant notamment les cinétiques de prolifération des cellules K562, lors de cultures à 0,1% d'O<sub>2</sub> (Giuntoli, 2006). Ces faibles concentrations d'O<sub>2</sub> assurent ainsi la sélection de progéniteurs résistants, doués d'une capacité CRC. Nous avons pu mettre en évidence que cette sélection était couplée, d'une part, à l'apoptose des cellules sensibles aux faibles concentrations d'O<sub>2</sub> et d'autre part à l'inhibition de l'expression de BCR-Abl. J'ai montré que la culture à faible concentration d'O<sub>2</sub> augmente le nombre de cellules en G<sub>0</sub> comme pour les cellules CD34<sup>+</sup> de LRF. Cependant, ces résultats ne permettent pas de savoir si le retour en quiescence de ces cellules est lié uniquement aux faibles concentrations d'O<sub>2</sub>, ou si la modulation de certains gènes cibles de BCR-Abl intervient dans ce mécanisme. D'autre part, les précédents résultats de l'équipe montrent l'importance de la consommation de glucose dans ces phénomènes de sélection de progéniteurs résistants à l'IM et aux faibles concentrations d'O<sub>2</sub> (Giuntoli, 2011). Les liens entre la résistance, la quiescence, la chute du niveau protéique de BCR-Abl et le métabolisme glycolytique restent à étudier.

Dans cette optique, des travaux préliminaires, réalisés dès mon retour à Bordeaux et non présentés ici, ont déjà montré que les cellules cultivées à 0,1% d'O<sub>2</sub> consommaient 4 fois plus de glucose qu'à 20% d'O<sub>2</sub>, avec une augmentation en parallèle des taux de lactate.

Compte tenu de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que la sélection des cellules de LMC résistantes résulte de plusieurs phénomènes successifs et/ou associés :

1- les basses concentrations d'O<sub>2</sub> entraînent l'apoptose rapide d'un nombre important de cellules, correspondant à des progéniteurs engagés (Tanturli, 2011),

2- la carence en glucose, qui accélère l'entrée en G0 des cellules primitives, capables de repeupler des cultures secondaires à 20% d'O<sub>2</sub> et ainsi protégées par ce retour en quiescence,

3- les molécules produites lors du catabolisme du glucose (notamment l'acide lactique) et/ou la diminution du pH.

La comparaison des cinétiques d'entrée en quiescence des cellules CD34<sup>+</sup> normales et des cellules leucémiques K562 montre des différences importantes : une quiescence rapide des CD34<sup>+</sup> normales, corrélée à des concentrations de glucose élevées dans le milieu en fin de culture et une quiescence plus lente des cellules K562, qui semble être liée à la diminution de la concentration en glucose. Cela nous a amené à émettre l'hypothèse suivante : pour les cellules normales, seule la faible oxygénation interviendrait dans les phénomènes de sélection de populations résistantes ; alors que dans le cas des cellules K562, l'expression de BCR/Abl et l'hyperphosphorylation de certaines protéines cibles importantes pour la prolifération et le métabolisme, permettraient de maintenir une croissance cellulaire, même à très basse concentration d'O<sub>2</sub> d'où le faible retour en G0 observé durant les phases précoces de culture. La carence en glucose serait responsable de l'extinction de la protéine BCR-Abl et donc du stimulus prolifératif et favoriserait ainsi le retour en quiescence et la survie cellulaire. De nouvelles études sont indispensables pour comprendre ces phénomènes et confirmer ou infirmer les hypothèses formulées.

*Réflexion et  
Perspectives*

Comprendre les mécanismes moléculaires et environnementaux intervenant en condition physiologique dans la régulation des cellules souches hématopoïétiques humaines normales apparaît actuellement comme un des enjeux essentiels à une utilisation optimale de ces cellules *ex vivo*, notamment lors de l'élaboration de protocoles cliniques à but thérapeutique. Dans cette optique, il devient indispensable de considérer le rôle et l'importance de chacun des paramètres constituant le microenvironnement de ces cellules. C'est pourquoi notre laboratoire s'intéresse plus particulièrement aux faibles concentrations d'O<sub>2</sub> et à l'étude de leurs effets sur la biologie des CSH.

Ainsi, au sein de cette équipe, les travaux réalisés durant ces trois années de thèse en lien avec l'effet des faibles concentrations d'O<sub>2</sub> sur les cellules CD34<sup>+</sup> de sang périphérique en condition d'homéostasie, ont permis d'établir ou de suggérer plusieurs points importants synthétisés ici :

- les filtres de leucoréduction, quotidiennement éliminés par les centres de transfusion suite à la préparation de concentrés de globules rouges, représentent une source potentielle de cellules CD34<sup>+</sup> utilisables à des fins de recherche. En effet, nous avons pu montrer que les quantités obtenues à partir d'un seul filtre et la possibilité de coupler plusieurs échantillons étaient adaptées à nos travaux. De plus, l'analyse phénotypique et fonctionnelle de ces cellules a permis leur validation en tant que modèle d'étude pour l'hématopoïèse, en comparaison avec d'autres sources plus conventionnelles.

- La culture des cellules CD34<sup>+</sup> issues de LRF dans des conditions de très faible oxygénation (0,1% d'O<sub>2</sub>) a permis de confirmer des résultats précédemment obtenus par notre groupe (Hermitte, 2006) et d'étendre ces conclusions, concernant les durées de culture *in vitro* et le type de cellules utilisées. Ainsi, ces cellules, retrouvées physiologiquement dans le sang

périphérique en condition d'homéostasie et peu caractérisée dans la littérature, ont pu être maintenues lors de cultures 0,1% d'O<sub>2</sub>.

Ainsi, depuis plusieurs années mon laboratoire d'accueil, en collaboration avec d'autres équipes, cherche à caractériser et à reproduire en culture l'effet d'un de ces paramètres, la faible disponibilité en oxygène, considérée comme un des facteurs majeurs intervenant dans la régulation des CSH *in vivo*. Le choix des conditions de faible oxygénation utilisées a été orienté vers celles mimant au plus près la réalité physiologique. Des études ont en effet établi que les CSH résidaient, majoritairement, dans des structures spécifiques au sein de la moelle osseuse présentant de très faibles teneurs en O<sub>2</sub> (Cipolleschi, 1993 ; Chow, 2001 ; Parmar, 2007). Plusieurs théories s'affrontent sur les valeurs d'O<sub>2</sub> réellement retrouvées dans ces niches. En effet, leur proximité possible avec des capillaires sanguins laisserait croire à une disponibilité plus ou moins élevée de l'O<sub>2</sub> au sein de ces structures. Cependant, aucune étude n'a encore permis de mesurer les valeurs physiologiques exactes d'O<sub>2</sub> réellement disponibles pour ces cellules et les différents résultats du laboratoire et de la littérature sont majoritairement en accord avec un rôle bénéfique de ces faibles concentrations d'O<sub>2</sub> sur la biologie des CSH, qui conforterait l'existence de telles concentrations en condition d'homéostasie.

Dès mon arrivée au laboratoire, le choix des très faibles concentrations d'O<sub>2</sub> a été motivé par les résultats de F. Hermitte (Hermitte, 2006) obtenus lors d'études portant sur des cellules de sang de cordon. De manière à compléter et étendre ces résultats, plusieurs objectifs ont été fixés en lien avec ces précédents travaux. Nous proposons de revenir ici sur les données importantes établies lors de mes travaux de recherche.

Tout d'abord, nous avons cherché à remédier au problème contraignant de disponibilité et d'accès à des sources de CSH humaines utilisables à des fins de recherche. Suite à des travaux précédents, ayant montré la récupération possible de cellules CD34<sup>+</sup>, les filtres de leucoréduction sont apparus être l'alternative possible à ces problèmes d'approvisionnement. Cependant, le traitement de ces filtres était difficilement adaptable à des protocoles de routine au laboratoire, du fait des grands volumes utilisés pour l'élution des cellules. Nous avons ainsi cherché à développer et optimiser une procédure rapide et simple à mettre en œuvre pour la récupération de cellules CD34<sup>+</sup> de sang périphérique en condition d'homéostasie. Les larges quantités de cellules obtenues et les taux de pureté adaptés à nos travaux ont fait de cette méthode de purification un élément clé de ma thèse. L'utilisation de ces filtres de leucoréduction ouvre également des possibilités réelles, mais encore peu exploitées, concernant leur utilisation lors du développement de protocoles destinés à la thérapie cellulaire. En effet, aux quantités importantes de cellules obtenues et validées fonctionnellement, s'ajoute le fait essentiel que des CSH soient présentes dans cette population cellulaire et bien qu'elles soient facilement récupérables et adaptées à des protocoles de recherche expérimentale, leur utilisation en recherche clinique reste à ce jour inexistante.

Ainsi, l'accès illimité à cette source, la facilité technique et éthique d'extraction, la validation fonctionnelle des cellules CD34<sup>+</sup> purifiées et leur nombre important font de ce matériel une cible thérapeutique potentielle. Pour conclure, cette partie technique dédiée au développement d'un protocole standardisé et optimisé correspondait parfaitement à une application directe de ma formation d'ingénieur.

En aval de ces travaux, la culture des cellules CD34<sup>+</sup> purifiées à partir des LRFs dans des conditions de très faible oxygénation (0,1% d'O<sub>2</sub>) a permis de confirmer les résultats

précédemment établis par notre groupe et d'étendre ces conclusions, concernant les durées de culture *in vitro* et le type de cellules utilisés. Ainsi, ces cellules, retrouvées physiologiquement dans le sang périphérique en condition d'homéostasie et peu caractérisées dans la littérature, ont pu être maintenues lors de cultures à 0,1% d'O<sub>2</sub>. De plus, nous avons pu observer le maintien d'une population résistante aux faibles conditions d'oxygénation, quiescente et capable de reconstituer une hématopoïèse dans des animaux receveurs.

Suite à l'établissement d'une collaboration entre l'Université de Bordeaux Segalen et l'Université de Florence, l'étude de cellules issues d'une lignée leucémique (K562) a permis de mettre en évidence un retour en G0 de ces cellules, lors de cultures prolongées à 0,1% d'O<sub>2</sub>. De plus, cette étude nous a apporté des informations potentiellement exploitables concernant la résistance de cette lignée leucémique en lien avec la carence en glucose, phénomène non observé chez des cellules normales cultivées dans les mêmes conditions. Ces différences de réponse à l'O<sub>2</sub>, mais également à certains acteurs métaboliques essentiels à la survie cellulaire, sont intéressantes, car elles pourraient constituer une éventuelle cible thérapeutique pour l'éradication des cellules souches leucémiques des LMC, qui reste en ce jour un point non résolu.

L'oxygène comme paramètre d'étude s'est inscrit dans la thématique du laboratoire qui étudie ce facteur depuis plus de 15 ans. Le choix d'une très faible concentration d'O<sub>2</sub> (0,1%) a eu pour but de correspondre au mieux avec la réalité physiologique, ce paramètre étant peu pris en compte dans la majorité des cas et devait permettre d'apporter des réponses lors de cultures plus longues que celles déjà réalisées par notre équipe. En plus de renforcer l'importance de l'influence des très faibles concentrations d'O<sub>2</sub> dans les niches hématopoïétiques, l'objectif était d'apporter des solutions à l'établissement de protocoles de conservation des cellules primitives à but thérapeutique. Une des questions soulevées par ces

travaux consiste à savoir quels sont les mécanismes intervenant dans la survie de ces cellules lors de leur culture en condition de faible oxygénation. Dans cette optique, les travaux à réaliser permettront d'établir un éventuel rôle majeur du métabolisme énergétique de ces cellules. Les modalités d'analyse seront basées essentiellement sur l'inhibition des voies majeures de production d'énergie. L'intérêt à plus long terme est d'être capable de favoriser certaines voies métaboliques lors de culture afin d'augmenter la préservation et l'amplification des cellules les plus primitives. La comparaison des mécanismes mis en jeu, lors de cultures à faible concentration d'O<sub>2</sub>, par les cellules leucémiques et les cellules normales doit permettre d'apporter des réponses quant à des différences de comportement exploitables pour la mise au point de thérapies ciblées.

Les travaux concernant l'étude de ces mécanismes sont encore au stade préliminaire, cependant une poursuite de 12 à 18 mois ayant été envisagée en collaboration avec l'EFS doit me permettre d'une part de consolider nos connaissances sur ces phénomènes, de finaliser le manuscrit en cours de rédaction. Cette période doit aussi permettre de revenir sur la mise au point des combinaisons cytokiniques dont certaines, déjà étudiées au cours de cette thèse, doivent être optimisées et adaptés à d'éventuels protocoles d'expansion clinique.

Pour conclure l'ensemble de ces travaux, il apparaît que certaines questions restent encore non abordées, bien que les réponses apportées permettraient de mieux comprendre la biologie des CSH et permettraient d'utiliser les mécanismes mis en évidence pour leur culture et leur expansion *ex vivo* : pourquoi des CSH sont-elles retrouvées physiologiquement dans le sang périphérique en condition d'homéostasie, quels sont leurs rôles et leur devenir ? Pourquoi ces cellules présentent une meilleure capacité de reconstitution hématopoïétique après une période de culture, même brève ?

*Références*

*Bibliographiques*

- Abkowitz J., Catlin S., McCallie M., Gutter P.** (2002). Evidence that the number of hematopoietic stem cells per animal is conserved in mammals. *Blood* **100**:2665-2667.
- Adams G., Chabner K., Alley I., Olson D., Szczepiorkowski Z., Poznansky M., Kos C., Pollak M., Brown E., Scadden D.** (2006). Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature* **439**:599-603.
- Adolfsson J., Mansson R., Buza-Vidas N., Hultquist A., Liuba K., Jensen C., Bryder D., Yang L., Borge O., Thoren L.** (2005). Identification of Flt3+ lymphomyeloid stem cells lacking erythromegacaryocytic potential, a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**:295-306.
- Akashi K., Traver D., Miyamoto T., Weissman I.** (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that give rise to all myeloid lineage. *Nature* **404**:193-197.
- Amsellem S., Pflumio F., Bardin D., Izac B., Charneau P., Romeo P., Dubart-Kupperschmitt A., Fichelson S.** (2003). Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nat Med* **9**:1423-1427.
- Arai F., Hirao A., Ohmura M., Sato H., Matsuoka S., Takubo K., Ito K., Koh G., Suda T.** (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* **118**(2):149-161.
- Arnold C., Tan R., Zhou B., Yue S., Schaffert S., Biggs J., Doyonnas R., Lo M., Perry J., Renault V., Sacco A., Somerville T., Viatour P., Brunet A., Cleary M., Li L., Sage J., Zhang D., Blau H., Chen C., Chen C.** (2011). MicroRNA programs in normal and aberrant stem and progenitor cells. *Genome Res* **21**(5):798-810.
- Auerbach R., Huang H., Lu L.** (1996). Hematopoietic stem cells in the mouse embryonic yolk sac. *Stem Cells* **14**:269-280.
- Auvray C.** (2010). Fonction des hémaprotéines HOXC4 et HOXB4 dans l'expansion des cellules souches hématopoïétiques humaines et étude de leurs cibles moléculaires. In *Biologie des cellules sanguines* - Thèse, Paris Diderot.
- Baba Y., Yokota T., Spits H., Garrett K., Hayashi S., Kincade P.** (2006). Constitutively active  $\beta$ -catenin promotes expansion of multipotent hematopoietic progenitors in culture. *J Immunol* **177**:2294-2303.
- Bailey N.** (1964). Elements of stochastic processes with applications to the natural sciences. *New York Wiley First Edition*.
- Barr R., Whang-Peng J., Perry S.** (1975). Hematopoietic stem cells in human peripheral blood. *Science* **190**:284-285.
- Becker A., McCulloch E., Till J.** (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* **197**:452-454.
- Berardi A., Wang A., Levine J., Lopez P., Scadden D.** (1995). Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. *Science* **267**:104-108.
- Berchner-Pfannschmidt U., Yamac H., Trinidad B., Fandrey J.** (2007). Nitric oxide modulates oxygen sensing by hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of prolyl hydroxylase 2. *Journal of Biological Chemistry* **282**(3):1788-1796.
- Berchner-Pfannschmidt U., Tug S., Kirsch M., Fandrey J.** (2010). Oxygen-sensing under the influence of nitric oxide. *Cell Signal* **22**(3):349-356.
- Berenson R., Andrews R., Bensinger W.** (1988). Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J Clin Invest* **81**:951-955.
- Bertoncello I., Hodgson G., Bradley T.** (1985). Multiparameter analysis of transplantable hemopoietic stem cells: I. The separation and enrichment of stem cells homing to marrow and spleen on the basis of rhodamine-123 fluorescence. *Exp Hematol* **13**:999-1006.
- Bhardwaj G., Murdoch B., Wu D., Baker D., Williams K., Chadwick K., Ling L., Karanu F., Bhatia M.** (2001). Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol* **2**:172-180.
- Bhatia M., Wang J., Kapp U., Bonnet D., Dick J.** (1997a). Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:5320-5325.

- Bhatia M., Bonnet D., Kapp U., Wang J., Murdoch B., Dick J.** (1997b). Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term ex vivo culture. *J Exp Med* **186**(4):619-624.
- Bhatia M., Bonnet D., Murdoch B., Gan O., Dick J.** (1998). A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med* **4**:1038-1045.
- Bhatia M., Bonnet D., Wu D., Murdoch B., Wrana J., Gallacher L., Dick J.** (1999). Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med* **189**(7):1139-1148.
- Bianco P.** (2011). Bone and the hematopoietic niche: a tale of two stem cells. *Blood* **19**;117(20):5281-5288.
- Bindra R., Vasselli J., Stearman R., Linehan W., Klausner R.** (2002). VHL-mediated hypoxia regulation of cyclin D1 in renal carcinoma cells. *Cancer Res* **62**(11):3014-3019.
- Bonnet D.** (2002). Haematopoietic stem cells. *J Pathol* **197**:430-440.
- Boye E., Skjolberg H., Grallert B.** (2009). Checkpoint regulation of DANN replication. *Methods Mol Biol* **521**:55-70.
- Bradley T., Metcalf D.** (1966). The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci* **44**:287-299.
- Bradley TR, Hodgson GS, Rosendaal M.** (1978). The effect of oxygen tension on haemopoietic and fibroblast cell proliferation in vitro. *J Cell Physiol* **97**(3 Pt 2 Suppl 1):517-522.
- Bray S.** (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**:678-689.
- Brecher G., Cronkite E.** (1951). Post-radiation parabiosis and survival in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* **77**:292-294.
- Broxmeyer H., Cooper S., Gabig T.** (1989). The effects of oxidizing species derived from molecular oxygen on the proliferation in vitro of human granulocyte-macrophage progenitor cells. *Ann N Y Acad Sci* **554**:177-184.
- Broxmeyer H., Cooper S., Lu L.** (1990). Enhanced stimulation of human bone marrow macrophage colony formation in vitro by recombinant human macrophage colony-stimulating factor in agarose medium and at low oxygen tension. *Blood* **76**:323-329.
- Bruchova H., Yoon D., Agarwal A., Mendell J., Prchal J.** (2007). Regulated expression of microRNAs in normal and polycythemia vera erythropoiesis. *Exp Hematol* **35**:1657-1667.
- Brunelle J., Bell E., Quesada N., Vercauteren K., Tiranti V., Zeviani M., Scarpulla R., Chandel N.** (2005). Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Meta* **1**(6):409-414.
- Brunet de la Grange P.** (2004). Régulation de l'hématopoïèse par les basses concentrations d'oxygène : Rôles de l'antigène CD34 et du facteur de croissance VEGF165. In *Sciences Biologiques et Médicales - Thèse n°1254* (Bordeaux, Victor Segalen Bordeaux 2).
- Brunet De La Grange P., Barthe C., Lippert E., Hermitte F., Belloc F., Lacombe F., Ivanovic Z., Praloran V.** (2006). Oxygen concentration influences mRNA processing and expression of the cd34 gene. *J Cell Biochem* **97**(1):135-144.
- Buerk D., Shonat R., Riva C., Cranstoun S.** (1993). O<sub>2</sub> gradients and countercurrent exchange in the cat vitreous humor near retinal arterioles and venules. *Microvasc Res* **45**:134-148.
- Bunger M., Wilsbacher L., Moran S., Clendenin C., Radcliffe L., Hogenesch J., Simon M., Takahashi J., Bradfield C.** (2000). Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* **103**(7):1009-1017.
- Buza-Vidas N., Antonchuk J., Qian H., Månsson R., Luc S., Zandi S., Anderson K., Takaki S., Nygren J., Jensen C., Jacobsen S.** (2006). Cytokines regulate postnatal hematopoietic stem cell expansion: opposing roles of thrombopoietin and LNK. *Genes Dev* **20**(15):2018-2023.
- Calvi L., Adams G., Weibrecht K., Weber J., Olson D., Knight M., Martin R., Schipani E., Divieti P., Bringham F.** (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**:841-846.
- Carbia-Nagashima A., Gerez J., Perez-Castro C., Paez-Pereda M., Silberstein S., Stalla G., Holsboer F., Arzt E.** (2007). RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1alpha during hypoxia. *Cell* **131**:309-323.

- Cavins J., Scheer S., Thomas E., Ferrebee J.** (1964). The recovery of lethally irradiated dogs given infusions of autologous leukocytes preserved at -80°C. *Blood* **23**(1):38-43.
- Chervenick P., Boggs D.** (1971). In vitro growth of granulocytic and mononuclear cell colonies from blood of normal individuals. *Blood* **37**:131-135.
- Cheng T., Rodrigues N., Shen H., Yang Y., Dombkowski D., Sykes M., Scadden D.** (2000b). Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* **287**:1804-1808.
- Cheng J., Kang X., Zhang S., Yeh E.** (2007). SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia. *Cell* **131**:584-595.
- Cheung A., Kwong Y., Liang R., Leung A.** (2006). Stem cell model of hematopoiesis. *Curr Stem Cell Res Ther* **1**:305-315.
- Chiche J., Brahimi-Horn M., Pouyssegur J.** (2010). Tumor hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J Cell Mol Med* **14**:771-794.
- Chow D., Wenning L., Miller W., Papoutsakis E.** (2001). Modeling pO(2) distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J* **81**:685-696.
- Chung U., Schipani E., McMahon A., Kronenberg H.** (2001). Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *J Clin Invest* **107**:295-304.
- Chung Y., Park B., Kang Y., Kim T., Eaves C., Oh I.** (2006). Unique effects of Stat3 on the early phase of hematopoietic stem cell regeneration. *Blood* **108**(4):1208-1215.
- Cipolleschi M., Dello Sbarba P., Olivotto M.** (1993). The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* **82**, 2031-2037.
- Cipolleschi M., D'Ippolito G., Bernabei P., Caporale R., Nannini R., Mariani M., Fabbiani M., Rossi-Ferrini P., Olivotto M., Dello Sbarba P.** (1997). Severe hypoxia enhances the formation of erythroid bursts from human cord blood cells and the maintenance of BFU-E in vitro. *Exp Hematol* **25**(11):1187-1194.
- Cipolleschi M., Rovida E., Ivanovic Z., Praloran V., Olivotto M., Dello Sbarba P.** (2000). The expansion of murine bone marrow cells preincubated in hypoxia as an in vitro indicator of their marrow-repopulating ability. *Leukemia* **14**:735-739.
- Civin C., Strauss L., Brovall C., Fackler M., Schwartz J., Shaper J.** (1984). Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* **133**:157-165.
- Comerford K., Leonard M., Karhausen J., Carey R., Colgan S., T. Taylor C.** (2003). Small ubiquitin-related modifier-1 modification mediates resolution of CREB-dependent responses to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:986-991.
- Conneally E., Cashman J., Petzer A., Eaves C.** (1997). Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/ scid mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:9836-9841.
- Cummins E., Taylor C.** (2005). Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch* **450**(6):363-371.
- Dakic A., Metcalf D., Di Rago L., Mifsud S., Wu L., Nutt S.** (2005). PU.1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis. *J Exp Med* **201**(9):1487-1502.
- Dahlberg A., Delaney C., Bernstein I.** (2011). Ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **117**(23):6083-6090.
- Danet G., Pan Y., Luongo J., Bonnet D., Simon M.** (2003). Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *J Clin Invest* **112**:126-135.
- Daniel C., Ponting I., Dexter T.** (1989). Growth and development of haemopoietic cells: a deterministic process? *Haematol Blood Transf* **32**:172-177.
- Dao M., Taylor N., Nolta J.** (1998). 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 USA* **95**(22):13006-13011.
- Dao M., Arevalo J., Nolta J.** (2003). Reversibility of CD34 expression on human hematopoietic stem cells that retain the capacity for secondary reconstitution. *Blood* **101**:112-118.

- Das J.** (2006). The role of mitochondrial respiration in physiological and evolutionary adaptation. *Bioessays* **28**:890-901.
- de Haan G., Weersing E., Dontje B., van Os R., Bystrykh L., Vellenga E., Miller G.** (2003). In vitro generation of long-term repopulating hematopoietic stem cells by fibroblast growth factor-1. *Dev Cell* **4**(2):241-251.
- Deininger M., Goldman J., Melo J.** (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* **96**(10):3343-56.
- Dello Sbarba P., Cipolleschi M., Olivetto M.** (1987). Hemopoietic progenitor cells are sensitive to the cytostatic effect of pyruvate. *Exp Hematol* **15**(2):137-142.
- Denker H.** (2006). Potentiality of embryonic stem cells: an ethical problem even with alternative stem cell sources. *J Med Ethics* **32**:665-671.
- Desplat V., Faucher J., Mahon F., Dello Sbarba P., Praloran V., Ivanovic Z.** (2002). Hypoxia modifies proliferation and differentiation of CD34(+) CML cells. *Stem Cells* **20**(4):347-354.
- Dexter T., Allen T., Lajtha L.** (1977). Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* **91**:335-344.
- DiGiusto D., Chen S., Combs J., Webb S., Namikawa R., Tsukamoto A., Chen B., Galy A.** (1994). Human fetal bone marrow early progenitors for T, B, and myeloid cells are found exclusively in the population expressing high levels of CD34. *Blood* **84**, 421-432.
- Douay L.** (2001). Experimental culture conditions are critical for ex vivo expansion of hematopoietic cells. *J Hematother Stem Cell Res* **10**(3):341-346.
- Douay L.** (2003). From control of hematopoiesis to cellular therapy: the perspectives for transfusion. *Ann Biol Clin (Paris)* **61**(3):259-267.
- Drew E., Huettner C., Tenen D., McNagny K.** (2005). CD34 expression by mast cells: of mice and men. *Blood* **106**:1885-1887.
- Dubois CM, Ruscetti FW, Palaszynski EW, Falk LA, Oppenheim JJ, Keller JR.** (1990). 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* **172**(3):737-744.
- Dubois CM, Ruscetti FW, Stankova J, Keller JR.** (1994). Transforming growth factor-beta regulates c-kit message stability and cell-surface protein expression in hematopoietic progenitors. *Blood* **83**(11):3138-3145.
- Duncan A., Rattis F., DiMascio L., Congdon K.** (2005). Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol* **6**:314-322.
- Dzierzak E., Medvinsky A.** (1995). Mouse embryonic hematopoiesis. *Trends Genet* **11**:359-366.
- Dzik S., Aubuchon J., Jeffries L., Kleinman S., Manno C., Murphy M., Popovsky M., Sayers M., Silberstein L., Slichter S., Vamvakas E.** (2000). Leukocyte reduction of blood components: public policy and new technology *Transfus Med Rev* **14**(1):34-52.
- Eaves C.** (2005). SDF-1 tells stem cells to mind their P's and Z's. *J Clin Invest* **115**:27-29.
- Eliasson P., Rehn M., Hammar P., Larsson P., Sirenko O., Flippin L., Cammenga J., Jönsson J.** (2010). Hypoxia mediates low cell-cycle activity and increases the proportion of long-term-reconstituting hematopoietic stemcells during in vitro culture. *Exp Hematol* **38**:301-310.
- Emerson S.** (1996). Ex vivo expansion of hematopoietic precursors, progenitors, and stem cells: the next generation of cellular therapeutics. *Blood* **15**;87(8):3082-3088.
- Engelhardt M., Lubbert M., Guo Y.** (2002). CD34(+) or CD34 (-): which is he more primitive? *Leukemia* **16**:1603-1608.
- Evans M., Kaufman M.** (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**(5819):154-6.
- Fleming H., Alpern E., Uchida N., Ikuta K., Spangrude G., Weissman I.** (1993). Functional heterogeneity is associated with the cell cycle status of murine hematopoietic stem cells. *J Cell Biol* **122**:897-902.
- Fontana L., Pelosi E., Greco P., Racanicchi S., Testa U., Liuzzi F., Croce C., Brunetti E., Grignani F., Peschle C.** (2007). MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopenia through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. *Nature Cell Biol* **9**:775-787.

- Friedenstein A., Chailakhyan R., Latsinik N., Panasyuk A., Keiliss-Borok I.** (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* **17**:331-340.
- Gammaitoni L., Bruno S., Sanavio F., Gunetti M., Kollet O., Cavalloni G., Falda M., Fagioli F., Lapidot T., Aglietta M., Piacibello W.** (2003). Ex vivo expansion of human adult stem cells capable of primary and secondary hemopoietic reconstitution. *Exp Hematol.* **31**(3):261-270.
- Gangaraju V. Lin H.** (2009). MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**:116-125.
- Gao J., Graves S., Koch U., Liu S., Jankovic V., Buonamici S., El Andaloussi A., Nimer S., Kee B., Taichman R.** (2009). Hedgehog signaling is dispensable for adult hematopoietic stem cell function. *Cell Stem Cell* **4**:548-558.
- Genestra M.** (2007). Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal* **19**(9):1807-1819.
- Georgantas R., Hildreth R., Morisot S., Alder J., Liu C., Heimfeld S., Calin G., Croce C., Civin C.** (2007). CD34 hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**:2750-2755.
- Giuntoli S., Rovida E., Barbetti V., Cipolleschi M., Olivotto M., Dello Sbarba P.** (2006). Hypoxia suppresses BCR/Abl and selects imatinib-insensitive progenitors within clonal CML populations. *Leukemia* **20**(7):1291-1293.
- Giuntoli S., Rovida E., Gozzini A., Barbetti V., Cipolleschi M., Olivotto M., Dello Sbarba P.** (2007). Severe hypoxia defines heterogeneity and selects highly immature progenitors within clonal erythroleukemia cells. *Stem Cells* **25**:1119-1125.
- Giuntoli S., Tanturli M., Di Gesualdo F., Barbetti V., Rovida E., Dello Sbarba P.** (2011). Glucose availability in hypoxia regulates the selection of chronic myeloid leukemia progenitor subsets with different resistance to imatinib-mesylate. *Haematologica* **96**(2):204-212.
- Glimm H., Eaves C.** (1999). Direct evidence for multiple self-renewal divisions of human in vivo repopulating hematopoietic cells in short-term culture. *Blood* **94**(7):2161-2168.
- Godin I., Garcia-Porrero J., Coutinho A., Dieterlen-Lievre F., Marcos M.** (1993). Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cells progenitors. *Nature* **364**:67-70.
- Goey H., Keller J., Back T., Longo D., Ruscetti F., Wiltrout R.** (1989). Inhibition of early murine hemopoietic progenitor cell proliferation after in vivo loco-regional administration of transforming growth factor- $\beta$  1. *J Immunol* **143**:877-880.
- Goldman D., Bailey A., Pfaffle D., Al Masri A., Christian J., Fleming W.** (2009). BMP4 regulates the hematopoietic stem cell niche. *Blood* **114**(20):4393-4401.
- Goodman J., Hodgson G.** (1962). Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. *Blood* **19**(6):702-714.
- Gordan J., Bertout J., Hu C., Diehl J., Simon M.** (2007). HIF-2 $\alpha$  promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell* **11**(4):335-47.
- Graf T., Trumpp A.** (2007). Haematopoietic stem cells, niches and differentiation pathways. *Nat Rev Immunol* **7**(6), poster.
- Gu Y., Moran S., Hogenesch J., Wartman L., Bradfield, C.** (1998). Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 $\alpha$ . *Gene Expr* **7**:205-213.
- Gu Y., Hogenesch J., Bradfield C.** (2000). The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**:519-561.
- Guenechea G., Gan O., Dorrell C., Dick J.** (2001). Distinct classes of human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential. *Nat Immunol* **22**:75-82.
- Guitart A.** (2009). Régulation du compartiment des progéniteurs hématopoïétiques par les faibles concentrations en oxygène. In *Sciences Biologiques et Médicales - Thèse n°1672* (Bordeaux, Victor Segalen Bordeaux 2).
- Guitart A., Hammoud M., Dello Sbarba P., Ivanovic Z., Praloran V.** (2010). Slow-cycling/quiescence balance of hematopoietic stem cells is related to physiological gradient of oxygen. *Exp Hematol* **38**(10):847-851.

- Guitart A., Debeissat C., Hermitte F., Villacreces A., Ivanovic Z., Boeuf H., Praloran V.** (2011). Very low oxygen concentration (0.1%) reveals two FDCEP-Mix cell subpopulations that differ by their cell cycling, differentiation and p27KIP1 expression. *Cell Death Differ* **18**(1):174-182.
- Gunsilius E., Gastl G., Petzer A.** (2001). Hematopoietic stem cells. *Biomed Pharmacother* **55**:186-194.
- Gustafsson M., Zheng X., Pereira T., Gradin K., Jin S., Lundkvist J., Ruas J., Poellinger L., Lendahl U., Bondesson M.** (2005). Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell* **9**(5):617-628.
- Guzy R., Hoyos B., Robin E., Chen H., Liu L., Mansfield K., Simon M., Hammerling U., Schumacker P.** (2005). Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab* **1**(6):401-408.
- Hammond E., Giaccia A.** (2006). Hypoxia-inducible factor-1 and p53: friends, acquaintances, or strangers? *Clin Cancer Res* **12**(17):5007-5009.
- Hammoud M., Vlaski M., Duchez P., Chevalerey J., Lafarge X., Boiron J., De La Grange P., Ivanovic Z.** (2011). Combination of low O<sub>2</sub> concentration and mesenchymal stromal cells during culture of cord blood CD34(+) cells improves the maintenance and proliferative capacity of hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol* doi: 10.1002/jcp.23019.
- Hattori K., Heissig B., Tashiro K., Honjo T., Tateno M., Shieh J., Hackett N., Quitarano M., Crystal R., Rafii S., Moore M.** (2001). Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* **97**(11):3354-3360.
- Hatzfeld J., Li M., Brown E., Sookdeo H., Levesque J., O'Toole T., Gurney C., Clark S., Hatzfeld A.** (1991). Release of early human hematopoietic progenitors from quiescence by antisense transforming growth factor beta 1 or Rb oligonucleotides. *J Exp Med* **174**(4):925-929.
- Hemphill J., Smith W., Sonne D., Morabito D., Manley G.** (2005). Relationship between brain tissue oxygen tension and CT perfusion: feasibility and initial results. *AJNR Am J Neuroradiol* **26**: 1095-1100.
- Hermitte F.** (2005). Rôle des variations des concentrations d'oxygène sur la prolifération, le cycle cellulaire et la fonctionnalité des cellules souches hématopoïétiques. In *Sciences Biologiques et Médicales - Thèse n°1254* (Bordeaux, Victor Segalen Bordeaux 2).
- Hermitte F., Brunet de la Grange P., Belloc F., Praloran V., Ivanovic Z.** (2006). Very low O<sub>2</sub> concentration (0.1%) favors G<sub>0</sub> return of dividing CD34+ cells. *Stem Cells* **24**(1):65-73.
- Herrera C., Sánchez J., Torres A., Bellido C., Rueda A., Alvarez M.** (2001). Early-acting cytokine-driven ex vivo expansion of mobilized peripheral blood CD34+ cells generates post-mitotic offspring with preserved engraftment ability in non-obese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Br J Haematol* **114**(4):920-930.
- Hess D., Meyerrose T., Wirthlin L., Craft T., Herrbrich P., Creer M., Nolte J.** (2004). Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood* **104**:1648-1655.
- Hewitson K., McNeill L., Riordan M., Tian Y., Bullock A., Welford R., Elkins J., Oldham N., Bhattacharya S., Gleadle J., Ratcliffe P., Pugh C., Schofield C.** (2002). Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J Biol Chem* **277**(29):26351-26355.
- Hicks C., Isaacs A., Wong R., Chong B.** (2011). CXCR4 expression on transplanted peripheral blood CD34+ cells: relationship to engraftment after autologous transplantation in a cohort of multiple myeloma patients. *Ann Hematol* **90**(5):547-555.
- Hock H., Hamblen M., Rooke H., Schindler J., Saleque S., Fujiwara Y., Orkin S.** (2004a). Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of hematopoietic stem cells. *Nature* **431**:1002-1007.
- Hock H., Meade E., Medeiros S., Schindler J., Valk P., Fujiwara Y., Orkin S.** (2004b). Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes Dev* **18**:2336-2341.

- Hoffmann A., Gloe T., Pohl U.** (2001). Hypoxia-induced upregulation of eNOS gene expression is redox-sensitive: a comparison between hypoxia and inhibitors of cell metabolism. *J Cell Physiol* **188**(1):33-44.
- Hofmann I., Stover E., Cullen D., Mao J., Morgan K., Lee B., Kharas M., Miller P., Cornejo M., Okabe R.** (2009). Hedgehog signaling is dispensable for adult murine hematopoietic stem cell function and hematopoiesis. *Cell Stem Cell* **4**:559-567.
- Hogan C., Shpall E., Keller G.** (2002). Differential long-term and multilineage engraftment potential from subfractions of human CD34+ cord blood cells transplanted into NOD/SCID mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:413-418.
- Holtz M., Forman S., Bhatia R.** (2005). Nonproliferating CML CD34+ progenitors are resistant to apoptosis induced by a wide range of proapoptotic stimuli. *Leukemia* **19**(6):1034-1041.
- Hosokawa K., Arai F., Yoshihara H., Iwasaki H., Nakamura Y., Gomei Y., Suda T.** (2010). Knockdown of N-cadherin suppresses the long-term engraftment of hematopoietic stem cells. *Blood* **116**(4):554-563.
- Hu C., Wang L., Chodosh L., Keith B., Simon M.** (2003). Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* **23**(24):9361-9374.
- Huang L., Arany Z., Livingston D., Bunn H.** (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* **271**:32253-32259.
- Huang L., Gu J., Schau M., Bunn H.** (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(14):7987-7892.
- Hur E., Chang K., Lee E., Lee S., Park H.** (2001). Mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor PD98059 blocks the trans-activation but not the stabilization or DNA binding ability of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Mol Pharmacol* **59**:1216-1224.
- Ichikawa M., Goyama S., Asai T., Kawazu M., Nakagawa M., Takeshita M., Chiba S., Ogawa S., Kurokawa M.** (2008). AML1/Runx1 negatively regulates quiescent hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *J Immunol* **180**(7):4402-4408.
- Iriuchishima H., Takubo K., Matsuoka S., Onoyama I., Nakayama K., Nojima Y., Suda T.** (2011). Ex vivo maintenance of hematopoietic stem cells by quiescence induction through Fbxw7 $\alpha$ ; overexpression. *Blood* **117**(8):2373-2377.
- Ishikawa F., Livingston A., Minamiguchi H., Wingard J., Ogawa M.** (2003). Human cord blood long-term engrafting cells are CD34+ CD38. *Leukemia* **17**:960-964.
- Isufi I., Seetharam M., Zhou L., Sohal D., Opalinska J., Pahanish P., Verma A.** (2007). Transforming growth factor $\beta$  signaling in normal and malignant hematopoiesis. *J Interferon Cytokine Res* **27**:543-552.
- Ito M., Hiramatsu H., Kobayashi K., Suzue K., Kawahata M., Hioki K., Ueyama Y., Koyanagi Y., Sugamura K., Tsuji K.** (2002). NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* **100**:3175-3182.
- Itoh K., Tezuka H., Sakoda H., Konno M., Nagata K., Uchiyama T., Uchino H., Mori K.** (1989). Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow. *Exp Hematol* **17**:145-153.
- Ivanovic Z.** (1997). Hemopoietic stem cell proliferation in Belgrade rats: to complete the parable. *Hematol Cell Ther* **39**(6):307-316.
- Ivanovic Z., Bartolozzi B., Bernabei P., Cipolleschi M., Milenkovic P., Praloran V., DelloSbarba P.** (1999). A simple, one-step clonal assay allows the sequential detection of committed (CFU-GM-like) progenitors and several subsets of primitive (HPP-CFC) murine progenitors. *Stem Cells* **17**(4):219-25.
- Ivanovic Z., Bartolozzi B., Bernabei P., Cipolleschi M., Rovida E., Milenković P., Praloran V., Dello Sbarba P.** (2000a). 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* **108**(2):424-429.

- Ivanovic Z., Dello Sbarba P., Trimoreau F., Faucher J., Praloran V.** (2000b). Primitive human HPCs are better maintained and expanded in vitro at 1 percent oxygen than at 20 percent. *Transfusion* **40**(12):1482-1488.
- Ivanovic Z., Belloc F., Faucher J., Cipolleschi M., Praloran V., Dello Sbarba P.** (2002). Hypoxia maintains and interleukin-3 reduces the pre-colony-forming cell potential of dividing CD34(+) murine bone marrow cells. *Exp Hematol* **30**(1):67-73.
- Ivanovic Z., Hermitte F., de la Grange P., Dazey B., Belloc F., Lacombe F., Vezon G., Praloran V.** (2004). Simultaneous maintenance of human cord blood SCID-repopulating cells and expansion of committed progenitors at low O<sub>2</sub> concentration (3%). *Stem Cells* **22**:716-724.
- Ivanovic Z.** (2009). Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *J Cell Physiol* **219**(2):271-275.
- Ivanovic Z., Duchez P., Chevaleyre J., Vlaski M., Lafarge X., Dazey B., Robert-Richard E., Mazurier F., Boiron J.** (2011). Clinical-scale cultures of cord blood CD34+ cells to amplify committed progenitors and maintain stem cell activity. Cell Transplant Epub ahead of print.
- Iwama A., Oguro H., Negishi M., Kato Y., Morita Y., Tsukui H., Ema H., Kamijo T., Katoh-Fukui Y., Koseki H.** (2004). Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1. *Immunity* **21**:843-851.
- Iwasaki H., Somoza C., Shigematsu H., Duprez E., Iwasaki-Arai J., Mizuno S., Arinobu Y., Geary K., Zhang P., Dayaram T., Fenyus M., Elf S., Chan S., Kastner P., Huettnner C., Murray R., Tenen D., Akashi K.** (2005). Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood* **106**(5):1590-1600.
- Iyer N., Kotch L., Agani F., Leung S., Laughner E., Wenger R., Gassmann M., Gearhart J., Lawler A., Yu A., Semenza G.** (1998). Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* **12**(2):149-162.
- Jaffredo T., Gautier R., Eichmann A., Dieterlen-Lievre F.** (1998). Intraortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development* **125**:4575-4583.
- Jain S., Maltepe E., Lu M., Simon C., Bradfield C.** (1998). Expression of ARNT, ARNT2, HIF1alpha, HIF2alpha and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. *Mech Dev* **73**:117-123.
- Jeannot G., Scheller M., Scarpellino L., Duboux S., Gardiol N., Back J., Kuttler F., Malanchi I., Birchmeier W., Leutz A.** (2008). Long-term, multilineage hematopoiesis occurs in the combined absence of  $\beta$ -catenin and  $\gamma$ -catenin. *Blood* **111**:142-149.
- Jeong J., Bae M., Ahn M., Kim S., Sohn T., Bae M., Yoo M., Song E., Lee K., Kim K.** (2002). Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* **111**:709-720.
- Jones D., Wagers A.** (2008). No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(1):11-21.
- Johnson P., Vandegriff K., Tsai A., Intaglietta M.** (2005). Effect of acute hypoxia on microcirculatory and tissue oxygen levels in rat cremaster muscle. *J Appl Physiol* **98**:1177-1184.
- Jungermann K., Kietzmann T.** (1997). Role of oxygen in the zonation of carbohydrate metabolism and gene expression in liver. *Kidney Int* **51**:402-412.
- Kaelin W.** (2005). Proline hydroxylation and gene expression. *Annu Rev Biochem* **74**:115-128.
- Kaelin W., Ratcliffe P.** (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* **30**(4):393-402.
- Kajiume T., Ninomiya Y., Ishihara H., Kanno R., Kanno M.** (2004). Polycomb group gene mel-18 modulates the self-renewal activity and cell cycle status of hematopoietic stem cells. *Exp hematol* **37**:857-866.
- Karanu F., Murdoch B., Gallacher L., Wu D., Koremoto M., Sakano S., Bhatia M.** (2000). The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med* **192**:1365-1372.
- Karanu F., Murdoch B., Miyabayashi T., Ohno M., Koremoto M., Gallacher L., Wu D., Itoh A., Sakano S., Bhatia M.** (2001). Human homologues of  $\delta$ -1 and  $\delta$ -4 function as mitogenic regulators of primitive human hematopoietic cells. *Blood* **97**:1960-1967.

**Karlsson G., Blank U., Moody J., Ehinger M., Singbrant S., Deng C., Karlsson S.** (2007). Smad4 is critical for selfrenewal of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* **204**:467-474.

- Katahira J., Mizoguchi H.** (1987). Improvement of culture conditions for human megakaryocytic and pluripotent progenitor cells by low oxygen tension. *International Journal of Cell Cloning* **5**:412-420.
- Kaushansky K.** (2006). Lineage-Specific Hematopoietic Growth Factors. *N Engl J Med* **354**:2034-2045.
- Ke Q., Costa M.** (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* **70**(5):1469-1480.
- Keith B., Adelman D., Simon M.** (2001). Targeted mutation of the murine arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (Arnt2) gene reveals partial redundancy with Arnt. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:6692-6697.
- Kessinger A., Armitage J., Landmark J., Weisenburger D.** (1986). Reconstitution of human hematopoietic function with autologous cryopreserved circulating stem cells. *Exp Hematol* **14**(3):192-196.
- Kessinger A., Smith D., Strandjord S., Landmark J., Dooley D., Law P., Coccia P., Warkentin P., Weisenburger D., Armitage J.** (1989). Allogeneic transplantation of blood-derived, T cell-depleted hemopoietic stem cells after myeloablative treatment in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Bone marrow transplantation* **4**(6):643-646.
- Kiel M., Yilmaz O., Iwashita T., Yilmaz O., Terhorst C., and Morrison S.** (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **121**:1109-1121.
- Kiel M., Morrison S.** (2008). Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* **8**(4):290-301.
- Kierszenbaum A.** (2007). Blood and hematopoiesis. In: Kierszenbaum A, editor. *Histology and cell biology*. St Louis: Mosby Inc., p.178.
- Kim M., Cooper D., Hayes S., Spangrude G.J.** (1998). Rhodamine-123 staining in hematopoietic stem cells of young mice indicates mitochondrial activation rather than dye efflux. *Blood* **91**:4106-4117.
- Kim M., Kwon H., Lee Y., Baek J., Jang J., Lee S., Moon E., Kim H., Lee S., Chung H.** (2001). Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med* **7**:437-443.
- Kim J., Sawada A., Tokimasa S., Endo H., Ozono K., Hara J., Takihara Y.** (2004). Defective long-term repopulating ability in hematopoietic stem cells lacking the Polycomb-group gene *rae28*. *Eur J Haematol* **73**:75-84.
- Kim J., Tchernyshyov I., Semenza G., Dang C.** (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* **3**(3):177-185.
- Kobari L., Pflumio F., Giarratana M., Li X., Titeux M., Izac B., Leteurtre F., Coulombel L., Douay L.** (2000). In vitro and in vivo evidence for the long-term multilineage (myeloid, B, NK, and T) reconstitution capacity of ex vivo expanded human CD34(+) cord blood cells. *Exp Hematol* **28**(12):1470-1480.
- Kobune M., Ito Y., Kawano Y., Sasaki K., Uchida H., Nakamura K., Dehari H., Chiba H., Takimoto R., Matsunaga T.** (2004). Indian hedgehog gene transfer augments hematopoietic support of human stromal cells including NOD/SCID- $\beta 2m^{-/-}$  repopulating cells. *Blood* **104**:1002-1009.
- Koch U., Wilson A., Cobas M., Kemler R., Macdonald H., Radtke F.** (2008). Simultaneous loss of  $\beta$ -catenin does not perturb hematopoiesis or lymphopoiesis. *Blood* **111**:160-164.
- Koivunen P., Hirsila M., Gunzler V., Kivirikko K., Myllyharju J.** (2004). Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J Biol Chem* **279**:9899-9904.
- Koller M., Bender J., Papoutsakis E., Miller W.** (1992). Beneficial effects of reduced oxygen tension and perfusion in long-term hematopoietic cultures. *Ann N Y Acad Sci* **665**:105-116.
- Kondo M., Scherer D., Miyamoto T., King A., Akashi K., Sugamura K., Weissman I.** (2000). Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines. *Nature* **407**:383-386.

- Kong N., Fotouhi N., Wovkulich P., Roberts J.** (2003). Cell cycle inhibitors for the treatment of cancer. *Drugs Fut* **28**(9):881.
- Koong A., Chen E., Giaccia A.** (1994). Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. *Cancer Res* **54**(6):1425-1430.
- Kopp H., AVECILLA S., Hooper A., Rafii S.** (2005). The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization, *Physiology* **20**:349-356.
- Körbling M., Fliedner T., Calvo W., Ross W., Nothdurft W., Steinbach I.** (1979). Albumin density gradient purification of canine hemopoietic blood stem cells (HBSC): Long-term allogeneic engraftment without GVH-reaction. *Exp Hematol* **7**:277-288.
- Körbling M., Dorken B., Ho A., Pezzutto A., Hunstein W., Fliedner T.** (1986). Autologous transplantation of blood-derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. *Blood* **67**:529-532.
- Koestenbauer S., Zisch A., Dohr G., Zech N.** (2009). Protocols for hematopoietic stem cell expansion from umbilical cord blood. *Cell Transplant* **18**(10):1059-68.
- Kovacević-Filipović M., Petakov M., Hermitte F., Debeissat C., Krstić A., Jovčić G., Bugarski D., Lafarge X., Milenković P., Praloran V., Ivanović Z.** (2007). Interleukin-6 (IL-6) and low O(2) concentration (1%) synergize to improve the maintenance of hematopoietic stem cells (pre-CFC). *J Cell Physiol* **212**(1):68-75.
- Kricun M.** (1985). Red-yellow marrow conversion: its effect on the location of some solitary bone lesions. *Skeletal Radiol* **14**:10-19.
- Kubota Y., Takubo K., Suda T.** (2008). Bone marrow long label-retaining cells reside in the sinusoidal hypoxic niche. *Biochem Biophys Res Commun* **366**:335-339.
- Kunisato A., Chiba S., Saito T., Kumano K., Nakagami-Yamaguchi E., Yamaguchi T., Hirai H.** (2004). Stem cell leukemia protein directs hematopoietic stem cell fate. *Blood* **103**(9):3336-3341.
- Lacorazza H., Yamada T., Liu Y.** (2006). The transcription factor MEF/ELF4 regulates the quiescence of primitive hematopoietic cells. *Cancer Cell* **9**:175-187.
- Laluppa J., Papoutsakis E., Miller W.** (1998). Oxygen tension alters the effects of cytokines on the megakaryocyte, erythrocyte, and granulocyte lineages. *Exp Hematol* **26**:835-843.
- Lando D., Peet D., Gorman J., Whelan D., Whitelaw M., Bruick R.** (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* **16**(12):1466-1471.
- Lane S., Sykes S., Al-Shahrour F., Shterental S., Paktinat M., Lo Celso C., Jesneck J., Ebert B., Williams D., Gilliland D.** (2010). The Apc(min) mouse has altered hematopoietic stem cell function and provides a model for MPD/MDS. *Blood* **115**:3489-3497.
- Lapidot T., Pflumio F., Doedens M., Murdoch B., Williams D., Dick J.** (1992). Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science* **255**:1137-1141.
- Lapidot T.** (2001). Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions. *Ann N Y Acad Sci* **938**:83-95.
- Lapidot T., Dar A., Kollet O.** (2005). How do stem cells find their way home? *Blood* **106**(6):1901-1910.
- Lataillade J., Clay D., Dupuy C., Rigal S., Jasmin C., Bourin P., Le Bousse-Kerdilès MC.** (2000). Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34+ cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood* **95**:756-768.
- Lataillade J., Domenech J., Le Bousse-Kerdilès M.** (2004). Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)\CXCR4 couple plays multiple roles on haematopoietic progenitors at the border between the old cytokine and new chemokine worlds: survival, cell cycling and trafficking. *Eur Cytokine Netw* **15**(3):177-188.
- Lataillade J., Brunet de la Grange P., Uzan G., Le Bousse-Kerdilès M.** (2010). Are stem cells as old as their niches ? The quest for eternal life. *Med Sci (Paris)* **26**:582-585.

- Lee Y., Miyake S., Wakita H., McMullen D., Azuma Y., Auh S., Hallenbeck J.** (2007). Protein SUMOylation is massively increased in hibernation torpor and is critical for the cytoprotection provided by ischemic preconditioning and hypothermia in SHSY5Y cells. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**:950–962.
- Lemischka I., Moore K.** (2003). Stem cells: interactive niches. *Nature* **42**(6960):778-779.
- Lerner C., Harrison D.** (1990). 5-fluorouracil spares hemopoietic stem cells responsible for long-term repopulation. *Exp Hematol* **18**:114-118.
- Levesque J., Liu F., Simmons P., Betsuyaku T., Senior R., Pham C., Link D.** (2004). Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice. *Blood* **104**(1):65-72.
- Levesque J., Winkler I.** (2011). Hierarchy of immature hematopoietic cells related to blood flow and niche. *Curr Opin Hematol* **18**(4):220-225.
- Li L., Xie T.** (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**:605-631.
- Lisy K., Peet D.** (2008). Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell Death and Differentiation* **15**:642–649.
- Lo Celso C., Wu J., Lin C.** (2009). In vivo imaging of hematopoietic stem cells and their microenvironment. *J Biophotonics* **2**(11):619-631.
- Lozzio C., Lozzio B.** (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* **45**(3):321-334.
- Lugo T., Pendergast A., Muller A., Witte O.** (1990). Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* **247**(4946):1079-1082.
- Lyman S., James L., Vanden Bos T., de Vries P., Brasel K., Gliniak B., Hollingsworth L., Picha K., McKenna H., Splett R.** (1993). Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell* **75**(6):1157-1167.
- Mackarehtschian K., Hardin J., Moore K., Boast S., Goff S., Lemischka I.** (1995). Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity* **3**(1):147-161.
- Magnusson M, Brun AC, Lawrence HJ, Karlsson S.** (2007). Hoxa9/hoxb3/hoxb4 compound null mice display severe hematopoietic defects. *Exp Hematol* **35**(9):1421-1428.
- Mahon P., Hirota K., Semenza G.** (2001). FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* **15**(20):2675-2686.
- Makino Y., Kanopka A., Wilson W., Tanaka H., Poellinger L.** (2002). Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus. *J Biol Chem* **277**(36):32405-32408.
- Manalo D., Rowan A., Lavoie T., Natarajan L., Kelly B., Ye S., Garcia J., Semenza G.** (2005). Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* **105**:659-669.
- Mansfield K., Guzy R., Pan Y., Young R., Cash T., Schumacker P., Simon M.** (2005). Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF-alpha activation. *Cell Metab* **1**(6):393-399.
- Marshall C., Trasher A.** (2001). The embryonic origins of human hematopoiesis. *Br J Hematol* **112**:838-850.
- Massabau J.** (2000). From low arterial- to low tissue-oxygenation strategy. An evolutionary theory. *Respir Physiol* **128**:249-261.
- Masson N., Willam C., Maxwell P., Pugh C., Ratcliffe P.** (2001). Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO* **20**:5197-5206.
- Masson N., Ratcliffe P.** (2003). HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O(2) levels. *J Cell Sci* **116**:3041-3049.
- Mauch P., Constine L., Greenberger J., Knopse W., Sullivan J., Liesveld J., Deeg H.** (1995). Hematopoietic stem cell compartment: acute and late effects of radiation therapy and chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **31**:1319-1139.
- Maurer A., Zhou B., Han Z.** (2006). Roles of platelet factor 4 in hematopoiesis and angiogenesis. *Growth Factors* **24**(4):242-252.

- Mazumdar J., O'Brien W., Johnson R., LaManna J., Chavez J., Klein P., Simon M.** (2010). O2 regulates stem cells through Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *Nat Cell Biol* **12**(10):1007-1013.
- Mazure N., Brahimi-Horn M., Berta M., Benizri E., Bilton R., Dayan F., Ginouvès A., Berra E., Pouysségur J.** (2004). HIF-1: master and commander of the hypoxic world. A pharmacological approach to its regulation by siRNAs. *Biochem Pharmacol* **68**(6):971-980.
- McCredie K., Hersh E., Freireich E.** (1971). Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. *Science* **171**:293-294.
- McCulloch E., Till J.** (1960). The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat Res* **13**:115-125.
- McKinley B., Butler B.** (1999). Comparison of skeletal muscle PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub>, and pH with gastric tonometric P(CO<sub>2</sub>) and pH in hemorrhagic shock. *Crit Care Med* **27**:1869-1877.
- Medvinsky A., Samoylina N., Muller A., Dzierzak E.** (1993). An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* **364**:64-67.
- Metcalf D.** (1970). Studies on colony formation in vitro by mouse bone marrow cells. Action of colony stimulating factor. *J Cell Physiol* **76**:89-99.
- Metzen E., Zhou J., Jelkmann W., Fandrey J., Brune B.** (2003). Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1 $\alpha$  by inhibition of prolyl hydroxylases. *Molecular Biology of the Cell* **14**(8):3470-3481.
- Mik E., van Leeuwen T., Raat N., Ince C.** (2004). Quantitative determination of localized tissue oxygen concentration in vivo by two-photon excitation phosphorescence lifetime measurements. *J Appl Physiol* **97**:1962-1969.
- Minet E., Michel G., Mottet D., Raes M., Michiels C.** (2001). Transduction pathways involved in Hypoxia-Inducible Factor-1 phosphorylation and activation. *Free Radic Biol Med* **31**:847-855.
- Ministère des Affaires Sociales de la Santé et de la Ville - Arrêté du 30 mars 1998.** Homologation du règlement de l'Agence française du sang relatif à la liste des produits sanguins labiles et pris en application de l'article L. 666-8 du code de la santé publique et modifiant l'arrêté du 5 avril 1994 modifié portant homologation du règlement de l'Agence française du sang relatif aux caractéristiques de certains produits sanguins labiles. *Journal Officiel* 1998, 5331-3.
- Miyamoto K., Araki K., Naka K., Arai F., Takubo K., Yamazaki S., Matsuoka S., Miyamoto T., Ito K., Ohmura M., Chen C., Hosokawa K., Nakauchi H., Nakayama K., Nakayama K., Harada M., Motoyama N., Suda T., Hirao A.** (2007). Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell* **1**(1):101-112.
- Moore M., Metcalf D.** (1970). Ontogeny of the hematopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* **18**:279-296.
- Moore K., Ema H., Lemischka I.** (1997). In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells. *Blood* **89**:4337-4347.
- Moore K., Lemischka I.** (2006). Stem cells and their niches. *Science* **311**(5769):1880-1885.
- Morrisson S., Weissman I.** (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* **1**:661-673.
- Morrison S., Prowse K., Ho P., Weissman I.** (1996). Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential. *Immunity* **5**:207-216.
- Mostafa S., Miller W., Papoutsakis E.** (2000). Oxygen tension influences the differentiation, maturation and apoptosis of human megakaryocytes. *Br J Haematol* **111**:879-889.
- Mostafa S., Papoutsakis E., Miller W.** (2001). Oxygen tension modulates the expression of cytokine receptors, transcription factors, and lineage-specific markers in cultured human megakaryocytes. *Exp Hematol* **29**:873-883.
- Nie Y., Han Y., Zou Y.** (2008). CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J Exp Med* **205**(4):777-783.
- Nilsson S., Johnston H., Whitty G., Williams B., Webb R., Denhardt D., Bertoncello I., Bendall L., Simmons P., Haylock D.** (2005). Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* **106**(4):1232-1239.
- Novelli E., Ramirez M., Civin C.** (1998). Biology of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> cells in lympho-hematopoiesis. *Leuk Lymphoma* **31**:285-293.

- Nwaigwe C., Roche M., Grinberg O., Dunn J.** (2000). Effect of hyperventilation on brain tissue oxygenation and cerebrovenous PO<sub>2</sub> in rats. *Brain Res* **868**:150-156.
- O'Connell M., Wlworth N., Carr A.** (2000). The G<sub>2</sub>-phs DNA-damage checkpoint. *Trends Cell Biol* **10**:296-303.
- Ogawa M.** (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* **81**:2844-2853.
- Orford K., Scadden D.** (2008). Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat Rev Genet* **9**:115-128.
- Orkin S., Shivdasani R., Fujiwara Y., McDevitt M.** (1998). Transcription factor GATA-1 in megakaryocyte development. *Stem Cell* **2**:79-83.
- Orkin S.** (2000). Diversification of hematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* **1**:57-64.
- Orkin S., Zon L.** (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* **132**(4):631-44.
- Pardanaud L., Yassine F., Dieterlen-Lievre F.** (1989). Relationship between vasculogenesis, angiogenesis, and haemopoiesis during avian ontogeny. *Development* **105**:473-485.
- Pardanaud L., Dieterlen-Lievre F.** (1999). Manipulation of the angiopoietic / hemangiopoietic commitment in the avian embryo. *Development* **126**:617-627.
- Park I., Qian D., Kiel M., Becker M., Pihalja M., Weissman I., Morrison S., Clarke M.** (2003). Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* **423**:302-305.
- Parmar K., Mauch P., Vergilio J., Sackstein R., Down J.** (2007). Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:5431-5436.
- Petzer A., Zandstra P., Piret J., Eaves C.** (1996). Differential cytokine effects on primitive (CD34+CD38-) human hematopoietic cells: novel responses to Flt3-ligand and thrombopoietin. *J Exp Med* **183**(6):2551-2558.
- Peytour Y., Guitart A., Villacreces A., Chevaleyre J., Lacombe F., Ivanovic Z., Praloran V.** (2010). Obtaining of CD34+ cells from healthy blood donors: development of a rapid and efficient procedure using leukoreduction filters. *Transfusion* **50**(10):2152-2157.
- Pflumio F., Izac B., Katz A., Shultz L., Vainchenker W., Coulombel L.** (1996). Phenotype and function of human hematopoietic cells engrafting immune-deficient CB17-severe combined immunodeficiency mice and non obese diabetic-severe combined immunodeficiency mice after transplantation of human cord blood mononuclear cells. *Blood* **88**:3731-3740.
- Ploemacher R., Brons N.** (1988). Cells with marrow and spleen repopulating ability and forming spleen colonies on day 16, 12 and 8 are sequentially ordered on the basis of increasing rhodamine-123 retention. *J Cell Physiol* **136**:531-536.
- Ploemacher R., Brons R.** (1989). Separation of CFU-S from primitive cells responsible for reconstitution of the bone marrow hemopoietic stem cell compartment following irradiation: evidence for a pre-CFU-S cell. *Exp Hematol* **17**:263-266.
- Pugh C., O'Rourke J., Nagao M., Gleadle J., Ratcliffe P.** (1997). Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* **272**(17):11205-11214.
- Radtke F., Fasnacht N., Macdonald H.** (2010). Notch signalling in the immune system. *Immunity* **32**:14-27.
- Rana T.** (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature Rev Mol Cell Biol* **8**:23-36.
- Rando T.** (2006). Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature* **441**:1080-1086.
- Ratajczak M., Pletcher C., Marlicz W., Machalinski B., Moore J., Wasik M., Ratajczak J., Gewirtz A.** (1998). CD34+, c-kit+, rhodamine123(low) phenotype identifies a marrow cell population highly enriched for human hematopoietic stem cells. *Leukemia* **12**:942-950.
- Rekhtman N., Radparvar F., Evans T., Skoultschi A.** (1999). Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev* **13**(11):1398-1411.

- Reiffers J., Bernard P., David B., Vezon G., Sarrat A., Marit G., Moulinier J., Broustet A.** (1986). Successful autologous transplantation with peripheral blood hemopoietic cells in a patient with acute leukemia. *Exp Hematol* **14**(4):312-315.
- Renström J., Kröger M., Peschel C., Oostendorp R.** (2010). How the niche regulates hematopoietic stem cells. *Chemico-Biological Interactions* **184**:7-15.
- Rich I., Kubanek B.** (1982). The effect of reduced oxygen tension on colony formation of erythropoietic cells in vitro. *Br J Haematol* **52**(4):579-588.
- Rich I.** (1986). A role for the macrophage in normal hemopoiesis. II. Effect of varying physiological oxygen tensions on the release of hemopoietic growth factors from bone-marrow-derived macrophages in vitro. *Exp Hematol* **14**(8):746-751.
- Richard D., Berra E., Gothie E., Roux D., Pouyssegur J.** (1999). p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* **274**:32631-32637.
- Richman C., Weiner R., Yankee R.** (1976). Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood* **47**:1031-1039.
- Rivard N., L'Allemain G., Bartek J., Pouyssegur J.** (1996). Abrogation of p27Kip1 by cDNA antisense suppresses quiescence (G0 state) in fibroblasts. *J Biol Chem* **271**:18337-18341.
- Rizo A., Vellenga E., de Haan G., Schuringa J.** (2006). Signaling pathways in self-renewing hematopoietic and leukemic stem cells: do all stem cells need a niche? *Human Molecular Genetics* **15**(2):210-219.
- Roy S., Khanna S., Wallace W., Lappalainen J., Rink C., Cardounel A., Zweier J., Sen C.** (2000). Characterization of perceived hyperoxia in isolated primary cardiac fibroblasts and in the reoxygenated heart. *J Biol Chem* **278**:47129-47135.
- Ruscetti F., Akel S., Bartelmez S.** (2005). Autocrine transforming growth factor- $\beta$  regulation of hematopoiesis: many outcomes that depend on the context. *Oncogene* **24**:5751-5763.
- Ryan H., Lo J., Johnson R.** (1998). HIF-1  $\alpha$  is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* **17**(11):3005-3015.
- Saltzman D., Toth A., Tsai A., Intaglietta M., Johnson P.** (2003). Oxygen tension distribution in postcapillary venules in resting skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**:H1980-H1985.
- Samokhvalov I., Samokhvalova N., Nishikawa S.** (2007). Cell tracing shows contribution of the yolk sac to adult hematopoiesis. *Nature* **446**, 1056-1061.
- Sauvageau G., Lansdorp P., Eaves C., Hogge D., Dragowska W., Reid D., Largman C., Lawrence H., Humphries R.** (1994). Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34<sup>+</sup> subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:12223-12227.
- Saxonhouse M., Rimsza L., Christensen R., Hutson A., Stegner J., Koenig J., Sola M.** (2003). Effects of anoxia on megakaryocyte progenitors derived from cord blood CD34<sup>pos</sup> cells. *Eur J Haematol* **71**(5):359-65.
- Scadden D.** (2006). The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* **441**, 1075-1079.
- Schofield R.** (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**:7-25.
- Schofield C., Ratcliffe P.** (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**:343-354.
- Scortegagna M., Ding K., Oktay Y., Gaur A., Thurmond F., Yan L., Marck B., Matsumoto A., Shelton J., Richardson J., Bennett M., Garcia J.** (2003). Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in Epas1<sup>-/-</sup> mice. *Nat Genet* **35**(4):331-340.
- Schwanbeck R., Schroeder T., Henning K., Kohlhof H., Rieber N., Erfurth M., Just U.** (2008). Notch signaling in embryonic and adult myelopoiesis. *Cells Tissues Organs* **188**:91-102.
- Semenza G.** (2001). HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* **107**(1):1-3.
- Semenza G.** (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**(10):721-732.

- Semenza G.** (2010). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* **29**:625-634.
- Seydoux G., Braun R.** (2006). Pathways to totipotency: lessons from germ cells. *Cell* **127**:891-904.
- Shantly N., Aruva M., Zhang K., Mathews B., Thakur L.** (2006). Stem cells: a regenerative pharmaceutical. *Q J Nucl Med Mol Imaging* **50**:205-16.
- Sharkis S., Collector M., Barber J., Vala M., Jones R.** (1997). Phenotypic and functional characterization of the hematopoietic stem cell. *Stem Cells* **15 Suppl 1**:41-45.
- Sharma M., Afrin F., Satija N., Tripathi R., Gangenahalli G.** (2011). Stromal-derived factor-1/CXCR4 signaling: indispensable role in homing and engraftment of hematopoietic stem cells in bone marrow. *Stem Cells Dev* **20**(6):933-946.
- Sherr C., Roberts J.** (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **9**:1149-1163.
- Shultz L., Schweitzer P., Christianson S., Gott B., Schweitzer I., Tennent B., McKenna S., Mobraaten L., Rajan T., Greiner D.** (1995). Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* **154**:180-191.
- Siminovitch L., McCulloch E., Till J.** (1963). The distribution of colony forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physiol* **62**:327-336.
- Simon M., Keith B.** (2008). The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(4):285-296.
- Simons B., Clevers H.** (2011). Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. *Cell* **145**(6):851-862.
- Simsek T., Kocabas F., Zheng J., Deberardinis R., Mahmoud A., Olson E., Schneider J., Zhang C., Sadek H.** (2010). The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell* **7**(3):380-390.
- Singbrant S., Karlsson G., Ehinger M., Olsson K., Jaako P., Miharada K., Stadtfeld M., Graf T., Karlsson S.** (2010). Canonical BMP signaling is dispensable for hematopoietic stem cell function in both adult and fetal liver hematopoiesis, but essential to preserve colon architecture. *Blood* **115**:4689-4698.
- Sodhi A., Montaner S., Patel V., Zohar M., Bais C., Mesri E., Gutkind J.** (2000). The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1alpha. *Cancer Res* **60**:4873-4880.
- Song X., Yuan Y., Shen H., Yu H., Xu F., Huang P., Shields D., Wang J., Cheng T.** (2006). Long-term engraftment of p18(INK4C)-deficient hematopoietic stem cells is enhanced in the sublethally-irradiated recipients. *Sci China C Life Sci* **49**(4):390-394.
- Song Y., Wu J., Oyesanya R., Lee Z., Mukherjee A., Fang X.** (2009). Sp-1 and c-myc mediate lysophosphatidic acid-induced expression of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer cells via a hypoxia-inducible factor-1 independent mechanism. *Clin Cancer Res* **15**:492-501.
- Spradling A., Drummond-Barbosa D., Kai T.** (2001). Stem cells find their niche. *Nature* **414**(6859):98-104.
- Srinivas V., Zhang L., Zhu X., Caro J.** (1999). Characterization of an oxygen/redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor alpha (HIF-alpha) proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **260**:557-561.
- Staal F., Luis T.** (2010). Wnt signaling in hematopoiesis: crucial factors for self-renewal, proliferation, and cell fate decisions. *J Cell Biochem* **109**:844-849.
- Stier S., Cheng T., Dombkowski D., Carlesso N., Scadden D.** (2002). Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood* **99**:2369-2378.
- Stolze I., Tian Y., Appelhoff R., Turley H., Wykoff C., Gleadow J.** (2004). Genetic analysis of the role of the asparaginyl hydroxylase factor inhibiting hypoxia-inducible factor (HIF) in regulating HIF transcriptional target genes. *J Biol Chem* **279**:42719-42725.
- Storb R., Graham T., Epstein R., Sale G., Thomas E.** (1977). Demonstration of hemopoietic stem cells in the peripheral blood of baboons by cross circulation. *Blood* **50**:537-542.

- Sugiyama T., Kohara H., Noda M., Nagasawa T.** (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* **25**:977-988.
- Sumbayev V., Budde A., Zhou J., Brüne B.** (2003). HIF-1 alpha protein as a target for S-nitrosation. *FEBS Lett* **535**(1-3):106-112.
- Sutherland H., Eaves C., Dragowska W., Lansdorp P.** (1989). Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* **74**:1563-1570.
- Sutherland H., Lansdorp P., Henkelman D., Eaves A., Eaves C.** (1990). Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:3584-3588.
- Sutherland H., Eaves C., Lansdorp P., Thacker J., Hogge D.** (1991). Differential regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term cultures maintained on genetically engineered murine stromal cells. *Blood* **78**:666-672.
- Suzuki H., Tomida A., Tsuruo T.** (2001). Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia. *Oncogene* **20**:5779-5788.
- Taichman R., Reilly M., Matthews L.** (2000). Human osteoblast-like cells and osteosarcoma cell lines synthesize macrophage inhibitory protein 1alpha in response to interleukin 1beta and tumour necrosis factor alpha stimulation in vitro. *Br J Haematol* **108**(2):275-283.
- Takubo K., Goda N., Yamada W., Iriuchishima H., Ikeda E., Kubota Y., Shima H., Johnson R., Hirao A., Suematsu M., Suda T.** (2010). Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **7**(3):391-402.
- Tanturli M., Giuntoli S., Barbetti V., Rovida E., Dello Sbarba P.** (2011). Hypoxia selects bortezomib-resistant stem cells of chronic myeloid leukemia. *PLoS One* **6**(2):e17008.
- Tavian M., Hallais M., Peault B.** (1999). Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo. *Development* **126**:793-803.
- Tavian M., Robin C., Coulombel L., Peault B.** (2001). The human embryo, but not its yolk sac, generates lympho-myeloid stem cells: mapping multipotent hematopoietic cell fate in intraembryonic mesoderm. *Immunity* **15**:487-495.
- Tavian M., Peault B.** (2005). Embryonic development of the human hematopoietic system. *Int J Dev Biol* **49**:243-250.
- Thomson J., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S., Waknitz M., Swiergiel J., Marshall V., Jones J.** (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**:1145-1147.
- Thorén L., Liuba K., Bryder D., Nygren J., Jensen C., Qian H., Antonchuk J., Jacobsen S.** (2008). Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells. *J Immunol* **180**(4):2045-2053.
- Tian H., McKnight S., Russell, D.** (1997). Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* **11**:72-82.
- Till J., McCulloch E.** (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* **14**:213-22.
- Till J., McCulloch E., Siminovitch L.** (1964). A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **51**:29-36.
- Tipping A., Pina C., Castor A.** (2009). High GATA-2 expression inhibits human hematopoietic stem and progenitor cell function by effects on cell cycle. *Blood* **113**:2661-2672.
- To L., Haylock D., Simmons P., Juttner C.** (1997). The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* **89**(7):2233-2258.
- Tondevoid E., Eriksen J., Jansen E.** (1979). Observations on long bone medullary pressures in relation to arterial PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub> and pH in the anaesthetized dog. *Acta Orthop Scand* **50**:645-651.
- Toschi A., Lee E., Gadir N., Ohh M., Foster D.** (2008). Differential dependence of hypoxia-inducible factors 1 alpha and 2 alpha on mTORC1 and mTORC2. *J Biol Chem* **283**(50):34495-34499.

- Tothova Z., Kollipara R., Huntly B., Lee B., Castrillon D., Cullen D., McDowell E., Lazo-Kallanian S., Williams I., Sears C., Armstrong S., Passegué E., DePinho R., Gilliland D.** (2007). FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* **128**(2):325-39.
- Trentin J.** (1971). Determination of bone marrow stem cell differentiation by stromal hemopoietic inductive microenvironments (HIM). *Am J Pathol* **65**:621-628.
- Trowbridge J., Scott M., Bhatia M.** (2006). Hedgehog modulates cell cycle regulators in stem cells to control hematopoietic regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:14134-14139.
- Tug S., Reyes B., Fandrey J., Berchner-Pfannschmidt U.** (2009). Non-hypoxic activation of the negative regulatory feedback loop of prolyl-hydroxylase oxygen sensors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **384**(4):519-523.
- Tuttle S., Maity A., Oprysko P., Kachur A., Ayene I., Biaglow J., Koch C.** (2007). Detection of reactive oxygen species via endogenous oxidative pentose phosphate cycle activity in response to oxygen concentration: implications for the mechanism of HIF-1 $\alpha$  stabilization under moderate hypoxia. *J Biol Chem* **282**(51):36790-36796.
- Uchida N., He D., Frieria A., Reitsma M., Sasaki D., Chen B., Tsukamoto A.** (1997). The unexpected G0/G1 cell cycle status of mobilized hematopoietic stem cells from peripheral blood. *Blood* **89**:465-472.
- Ueda T., Tsuji K., Yoshino H., Ebihara Y., Yagasaki H., Hisakawa H., Mitsui T., Manabe A., Tanaka R., Kobayashi K., Ito M., Yasukawa K., Nakahata T.** (2000). Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J Clin Invest* **105**(7):1013-1021.
- Van Zant G., Goldwasser E.** (1979). Competition between erythropoietin and colony-stimulating factor for target cells in mouse marrow. *Blood* **53**:946-965.
- Varnum-Finney B., Xu L., Brashem-Stein C., Nourigat C., Flowers D., Bakkour S., Pear W., Bernstein I.** (2000). Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med* **6**:1278-1281.
- Varnum-Finney B., Brashem-Stein C., Bernstein I.** (2003). Combined effects of Notch signaling and cytokines induce a multiple log increase in precursors with lymphoid and myeloid reconstituting ability. *Blood* **101**:1784-1789.
- Vasilatou D., Papageorgiou S., Pappa V., Papageorgiou E., Dervenoulas J.** (2010). The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Eur J Haematol* **84**, 1-16.
- Vasudevan S., Tong Y., Steitz J.** (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* **318**:1931-1934.
- Vlaski M., Lafarge X., Chevaleyre J., Duchez P., Boiron J., Ivanovic Z.** (2009). 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* **37**(5):573-584.
- Wang G., Semenza G.** (1993). Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* **82**(12):3610-3615.
- Wang J., Doedens M., Dick J.** (1997). Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay. *Blood* **89**:3919-3924.
- Wang Q., Huang Z., Xue H., Jin C., Ju X., Han J., Chen Y.** (2008). MicroRNA miR-24 inhibits erythropoiesis by targeting activin type I receptor ALK4. *Blood* **111**:588-595.
- Wang C., Jacob B., Sek G., Osato M.** (2010). Runx family genes, niche, and stem cell quiescence. *Blood Cells Molecules and Diseases* **44**:275-286.
- Warr M., Pietras E., Passegué E.** (2011). Mechanisms controlling hematopoietic stem cell functions during normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* doi: **10.1002/wsbm.145**.
- Weber J., Calvi L.** (2010). Notch signaling and the bone marrow hematopoietic stem cell niche. *Bone* **46**:281-285.

- Welch W., Baumgärtl H., Lübbers D., Wilcox C.** (2001). Nephron pO<sub>2</sub> and renal oxygen usage in the hypertensive rat kidney. *Kidney Int* **59**:230-237.
- Wenger R., Stiehl D., Camenisch G.** (2005). Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE* **2005**(306):re12.
- Whalen W., Ganfield R., Nair P.** (1970). Effects of breathing O<sub>2</sub> or O<sub>2</sub> þCO<sub>2</sub> and of the injection of neurohumors on the PO<sub>2</sub> of cat cerebral cortex. *Stroke* **1**:194-200.
- Wheater R., Young B., Healyh J.** (2001). Histologie fonctionnelle. *De Boeck Edition* (Harcourt Publishers Limited).
- Wierenga A., Schepers H., Moore M., Vellenga E., Schuringa J.** (2006). STAT5-induced self-renewal and impaired myelopoiesis of human hematopoietic stem/progenitor cells involves down-modulation of C/EBPalpha. *Blood* **107**(11):4326-4333.
- Wiesener M., Jürgensen J., Rosenberger C., Scholze C., Hörstrup J., Warnecke C., Mandriota S., Bechmann I., Frei U., Pugh C., Ratcliffe P., Bachmann S., Maxwell P., Eckardt K.** (2003). Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J* **17**(2):271-273.
- Wild J., Fischele S., Woodhouse N., Paley M., Kasuboski L., van Beek E.** (2005). 3D volume localized pO<sub>2</sub> measurement in the human lung with 3He MRI. *Magn Reson Med* **53**:1055-1064.
- Williams W., Nelson D.** (1995). Examination of the marrow. In: Beulter E, Lichtman M.A, Collier B.S, Kipps T.J, editors. *Hematology Williams, New York: McGraw-Hill*:15-22.
- Wolf N., Trentin J.** (1968). Hemopoietic colony studies. V. Effect of hemopoietic organ stroma on differentiation of pluripotent stem cells. *J Exp Med* **127**:205-214.
- Wölfle D., Jungermann K.** (1985). Long-term effects of physiological oxygen concentrations on glycolysis and gluconeogenesis in hepatocyte cultures. *Eur J Biochem* **151**:299-303.
- Yamaguchi M., Ikebuchi K., Hirayama F., Sato N., Mogi Y., Ohkawara J., Yoshikawa Y., Sawada K., Koike T., Sekiguchi S.** (1998). Different adhesive characteristics and VLA-4 expression of CD34(+) progenitors in G0/G1 versus S+G2/M phases of the cell cycle. *Blood* **92**:842-848.
- Yamazaki S., Iwama A., Takayanagi S., Eto K., Ema H., Nakauchi H.** (2009). TGF-β as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. *Blood* **113**:1250-1256.
- Yasinska I., Sumbayev V.** (2003). S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1alpha protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett* **549**(1-3):105-9.
- Yeoh J., van Os R., Weersing E., Ausema A., Dontje B., Vellenga E., de Haan G.** (2006). Fibroblast growth factor-1 and -2 preserve long-term repopulating ability of hematopoietic stem cells in serum-free cultures. *Stem Cells* **24**(6):1564-1572.
- Yilmaz O., Valdez R., Theisen B., Guo W., Ferguson D., Wu H., Morrison S.** (2006). Pten dependence distinguishes hematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature* **441**:475-482.
- Yin A., Miraglia S., Zanjani E.** (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **90**:5002-5012.
- Yin T., Li L.** (2006). The stem cell niches in bone. *J Clin Invest* **116**(5):1195-1201.
- Yoshida T., Ng S., Zuniga-Pflucker J., Georgopoulos K.** (2006). Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. *Nat Immunol* **7**(4):382-391.
- Yoshihara H., Arai F., Hosokawa K., Hagiwara T., Takubo K., Nakamura Y., Gomei Y., Iwasaki H., Matsuoka S., Miyamoto K., Miyazaki H., Takahashi T., Suda T.** (2007). Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell* **1**(6):685-697.
- Yu A., Frid M., Shimoda L., Wiener C., Stenmark K., Semenza G.** (1998). Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am J Physiol* **275**:818-826.
- Yu D., Cringle S.** (2005). Retinal degeneration and local oxygen metabolism. *Exp Eye Res* **80**:745-751.

- Yuan Y., Shen H., Franklin D., Scadden D., Cheng T.** (2004). In vivo self-renewing divisions of hematopoietic stem cells are increased in the absence of the early G1-phase inhibitor, p18INK4C. *Nat Cell Biol* **6**:436-442.
- Zanjani E., Almeida-Porada G., Livingston A., Flake A., Oga M.** (1998). Human bone marrow CD34<sup>-</sup> cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34<sup>+</sup> cells. *Exp Hematol* **26**:353-360.
- Zeng H., Yucel R., Kosan C., Klein-Hitpass L., Moroy T.** (2004) Transcription factor Gfi-1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells. *EMBO J* **23**:4116-4125.
- Zhang J., Niu C., Ye L., Huang H., He X., Tong W., Ross J., Haug J., Johnson T., Feng J., Harris S., Wiedemann L., Mishina Y., Li L.** (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**(6960):836-841.
- Zhang J., Grindley J., Yin T., Jayasinghe S., He X., Ross J., Haug J., Rupp D., Porter-Westpfahl K., Wiedemann L.** (2006b). PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. *Nature* **441**:518-522.
- Zhang J., and Li L.** (2008). Stem cell niche: microenvironment and beyond. *J Biol Chem* **283**:9499–9503.
- Zheng Y., Sun A., Han Z.** (2005). Stem cell factor improves SCID-repopulating activity of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells in xenotransplanted NOD/SCID mouse model. *Bone Marrow Transplant* **35**(2):137-142.
- Zhou B., Wang S., Mayr C., Bartel D., Lodish, H.** (2007). miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:7080-7085.
- Zhu J., Emerson S.** (2002). Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* **21**(21):3295-3313.
- Zon L.** (1995). Developmental biology of hematopoiesis. *Blood* **86**, 2876-2891.
- Zou Y., Kottmann A., Kuroda M., Taniuchi I., Littman D.** (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* **393**:595-599.

# *Annexes*

## Annexe 1 - Facteurs de transcription et régulation des CSH

### - Les facteurs de croissance intervenant dans l'auto-renouvellement et la quiescence des CSH

Ces processus sont régulés par un grand nombre de facteurs de transcription et de facteurs de transduction. Notons ici les facteurs les plus importants :

- **Gfi-1** (Growth Factor Independent 1) est un facteur de transcription à doigt de zinc impliqué dans l'auto-renouvellement des CSH en maîtrisant leur potentiel de prolifération (Hock, 2004a ; Zeng, 2004). Il agit en amont de la régulation dépendante de p21 et joue également un rôle important dans la reconstitution hématopoïétique à long terme des CSH.

- Plusieurs membres de la famille des **gènes homéotiques HOX** interviennent lors de l'hématopoïèse. **HoxB4** régule positivement l'auto-renouvellement des CSH (Amsellem, 2003) et les protéines **HOXA9** et **HOXA10** sont également régulatrice du maintien des CSH et de leur capacité de reconstitution hématopoïétique à long terme (Sauvageau, 1994 ; Magnusson, 2007).

- **Tel/Etv6** (Translocation Ets Leukemia/Ets variant gene 6) appartient à la famille des facteurs de transcription Ets. Bien que son inactivation conditionnelle provoque une perte des CSH dans la moelle osseuse, sans influencer l'engagement des progéniteurs, les mécanismes de contrôle de l'auto-renouvellement des CSH par ce facteur restent encore inconnus (Hock, 2004b).

- **Pten** (Phosphatase and Tension homolog deleted on chromosome ten) est un transducteur de signal, suppresseur de tumeur, impliqué dans la régulation positive de l'auto-renouvellement des CSH. Les CSH déficientes pour Pten sont incapables d'assurer une reconstitution hématopoïétique à long terme (Yilmaz, 2006 ; Zhang, 2006b).

- la famille des protéines **polycomb** est également essentielle dans la régulation de l'auto-renouvellement et de la quiescence des CSH. Trois membres du complexe PRC1, Bmi1, Me18 et Rae28, sont plus particulièrement impliqués. Une délétion de **Bmi1** diminue

fortement le nombre de CSH qui perdent rapidement leur potentiel de repopulation *in vivo*. Au contraire sa surexpression dans des cellules CD34<sup>+</sup> augmente l'auto-renouvellement des CSH et leur maintien à long terme (Park, 2003 ; Iwama, 2004). De la même manière, **Rae28** favorise l'auto-renouvellement des CSH et leur capacité de greffe à long terme (Kim, 2004). A l'inverse, **Mel18** régule négativement leur auto-renouvellement (Kajjume, 2004).

- **GATA-2** est un facteur de transcription appartenant à la famille GATA. Bien que son rôle dans l'hématopoïèse soit ambigu, il semble impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et dans le maintien en quiescence des CSH (Tipping, 2009).

- Les **FoxO** (FoxO1, FoxO3 et FoxO4) appartiennent à la famille des protéines Fox (Forkhead box). Elles assurent le maintien des CSH en quiescence en inhibant leur entrée en cycle et leur survie à un stress oxydatif. Une triple délétion de ces protéines entraîne l'augmentation de l'entrée en cycle et de l'apoptose des CSH (Miyamoto, 2007 ; Tothova, 2007).

- **Mef** (ou **ELF4**) appartient également à la famille des facteurs de transcription Ets et régule négativement la quiescence des CSH en favorisant leur entrée dans le cycle cellulaire (Lacorazza, 2006).

- **Runx1** (Runt-related transcription factor 1) ou **AML1** (Acute Myeloid Leukemia 1) régule également négativement la quiescence (Ichikawa, 2008). Toute dérégulation de ce facteur de transcription est à l'origine de pathologies. Le gène codant pour Runx1 est ainsi fréquemment retrouvé muté dans les leucémies humaines (Wang, 2010).

*- Les facteurs de croissance intervenant dans les premiers stades de l'engagement*

Plusieurs facteurs ont été identifiés comme régulateurs des processus d'engagement dans les voies myéloïdes et lymphoïdes. Notons ici les plus caractéristiques :

- **PU.1** intervient dans l'engagement des deux lignages lymphoïde et myéloïde, sa délétion entraîne une chute du nombre des CMP, GMP et des CLP (Dakic, 2005 ; Iwasaki, 2005).

- **Gata-1** régule la différenciation vers le lignage myéloïde et une augmentation de son expression favorise la différenciation vers les CMP (Orkin, 1998 ; Rekhtman, 1999). Gata-1 et PU.1 interagissent physiquement et se régulent négativement.
- **Ikaros** est impliqué dans l'engagement vers le lignage lymphoïde (Yoshida, 2006).
- **SCL** (Stem Cell Leukemia) ou **Tal1**, dont l'expression favorise la différenciation myéloïde sans affecter les propriétés d'auto-renouvellement des cellules immatures (Kunisato, 2004).

Taux d'expansion (valeur de référence : nombre de colonies/ml à T<sub>0</sub>)

	LCI (7 jours)		LCI (10 jours)		LCI (14 jours)		LC1 (7 jours)		LC2 (14 jours) issue de		
	20%	0,1%	20%	0,1%	20%	0,1%	20%	0,1%	20%	0,1%	
Concentration d'O <sub>2</sub>	2,22	0,22	1,14	0,08	1,28	0,2	7,34	3,06	8,06	2,11	3,7
IL-3 (10)	2,13	0,28	0,96	0,13	1,15	0,17	4,93	2,94	6,12	1,76	2,46
IL-3 (3)	1,06	0,16	0,67	0,08	0,81	0,14	4,75	2,75	4,25	1,09	2,33
IL-3 (1)	0,22	0,13	0,39	0,11	0,65	0,11	3,31	3,31	2,75	1,09	1,25
IL-6 (20)	0,13	0,34	1,5	0,07	0,89	0,06	2,44	1,56	-	0,77	2,02
SDF-1 (100)	2,34	0,16	1,75	0,14	1,46	0,06	2,34	0,16	9,73	1,34	2,43
SCF (100)	0,34	0,25	0,85	0,1	1,23	0,05	5,28	0,25	5,77	0,87	2,64
TPO (100)	0,06	0,41	0,36	0,05	0,78	0,14	0,44	2,53	4,07	0,71	1,69
TPO (10)	4,13	0,31	2,88	0,24	2,64	0,17	16,33	4,69	20,2	2,5	6,08
SCF (100) + TPO (100)	4,63	0,53	2,61	0,19	2,35	0,07	19,98	5,81	26,26	2,55	3,75
SCF (100) + TPO (10)	10,03	0,91	2,23	0,21	2,28	0,1	35,76	10,48	19,39	4,52	3,99
IL-3 (10) + SDF-1 (100)											
+ IL-6 (20) + SCF (100)											
+ TPO (10)											

Conditions cytokiniques  
(concentration en ng/ml)

Echelle arbitraire d'expansion

Tableau A1 : Influence des combinaisons cytokiniques, des temps de culture primaire et des conditions d'oxygénation sur l'expansion des cellules hématopoïétiques primitives en culture

Pour chaque condition, la valeur présentée correspond au taux d'expansion par rapport à T<sub>0</sub>, calculé comme le ratio entre le nombre de colonies/ml à l'instant donné et le nombre de colonies/ml à T<sub>0</sub>. Afin de comparer ces résultats une échelle arbitraire d'expansion a été déterminée, attribuant un code couleur à la qualité de l'expansion observée. Les valeurs correspondent à la moyenne calculée de 4 expériences indépendantes.

## **Annexe 2 : Sélection de conditions cytokiniques permettant le maintien et l'amplification des populations hématopoïétiques primitives lors de cultures à 0,1% d'O<sub>2</sub>**

Pour notre étude, les cellules CD34<sup>+</sup> issues de LRF ont été cultivées à 20 ou 0,1% d'O<sub>2</sub> et différentes combinaisons cytokiniques ont été réalisées afin d'évaluer leur influence sur le maintien et/ou l'amplification des cellules primitives (**Tableau A1**). Pour chaque condition cytokinique testée, des cultures primaires (LC1) ont été réalisées à 20 et 0,1% d'O<sub>2</sub> durant 7, 10 ou 14 jours, afin d'étudier l'influence des temps de culture sur ces phénomènes de maintien et/ou d'expansion.

Consécutivement à ces LC1, des cultures secondaires (LC2) de 14 jours ont été réalisées dans des conditions de culture identiques entre elles et dans un milieu permettant aux pré-CFC et aux progéniteurs primitifs de donner naissance à des CFC identifiables et comptables après culture en milieu semi-solide. Ces dernières ont été effectuées à toutes les étapes de ce processus (T0, fin de LC1, fin de LC2) et, après comptage des colonies, des taux d'expansion ont été calculés selon le ratio entre (nombre de colonies/ml)<sub>Tx</sub> et (nombre de colonies)<sub>T0</sub>. Afin de déterminer quelles conditions de culture étaient les plus favorables à un maintien et/ou une expansion des populations hématopoïétiques primitives, une échelle arbitraire a été établie.

La comparaison des taux d'expansion a tout d'abord permis de mettre en évidence que les temps de cultures réalisés lors des LC1 influençaient fortement sur les taux obtenus et que les durées plus courtes donnaient majoritairement de meilleurs résultats. De plus, nous avons pu observer qu'en terme d'expansion totale, les LC1 réalisées à 20% d'O<sub>2</sub> favorisaient dans tous les cas une meilleure expansion des cellules primitives, comparativement aux cultures réalisées à 0,1% d'O<sub>2</sub>. La comparaison des cinétiques d'expansion au cours des différentes étapes du processus, calculées comme le ratio entre (nombre de colonies/ml)<sub>LC2</sub> et (nombre de colonies)<sub>LC1</sub>, montre cependant que, comparativement aux cultures réalisées à 20% d'O<sub>2</sub>, les

cultures à 0,1% d'O<sub>2</sub> favorisent le maintien de populations plus primitives. En effet, ces populations sont à l'origine d'une meilleure expansion lors des étapes tardives du processus (LC2) et cette expansion n'est plus observée consécutivement aux LC1 réalisées à 20% d'O<sub>2</sub>. Enfin, certaines combinaisons cytokiniques et notamment l'**IL-3 (10 ng/ml)** et le **SCF (100 ng/ml) + TPO (10 ng/ml)** ont montré des taux et des cinétiques d'expansion favorables et ont ainsi été sélectionnées pour la suite de nos travaux.

## Riassunto

Ottenere un elevato numero di cellule staminali ematopoietiche (CSE) è una sfida importante per lo sviluppo di protocolli per la terapia cellulare delle neoplasie. L'espansione *ex vivo* di queste cellule coinvolge diversi attori (citochine, ambiente), specialmente le basse concentrazioni di ossigeno ( $O_2$ ), che riflettono le condizioni fisiologiche trovate nelle strutture specifiche del midollo osseo, dove risiedono le CSE e che il nostro gruppo ha studiato per diversi anni. Gli effetti benefici di basse concentrazioni di  $O_2$  sul mantenimento di cellule staminali sono ormai ben descritti in colture brevi di cellule di midollo osseo, di sangue del cordone ombelicale o mobilitate nel sangue. Abbiamo cercato di confermare ed estendere questi risultati a delle cellule scarsamente studiate, le cellule staminali presenti nel sangue periferico in situazione di omeostasi (CSSP-H). Queste cellule, infatti, rappresentano una potenziale source di cellule staminali per l'uso terapeutico, a causa della loro disponibilità e della loro facilità di accesso. Il nostro lavoro ci ha permesso di creare e ottimizzare un protocollo, veloce e semplice, di purificazione di cellule  $CD34^+$  usando dei filtri da leucoriduzione (LRF). La quantità e la purezza di queste cellule, adattate alla continuazione dei nostri lavori, e la loro validazione funzionale ci hanno permesso di usarle come modello per studiare gli effetti delle colture di 7 giorni a molto bassa concentrazione di  $O_2$  (0,1%). La determinazione delle combinazioni di citochine coinvolte nel mantenimento e l'espansione delle cellule primitive ha mostrato un ruolo benefico del IL-3 e dello SCF accoppiato con il TPO. Queste condizioni di coltura hanno evidenziato, rispetto a colture eseguite a 20% di  $O_2$ , il ruolo delle basse concentrazioni di  $O_2$  nel mantenimento di cellule quiescenti, indifferenziate, che non si dividono o poco e in grado di ricostruire ematopoiesi dopo il loro trapianto in topi NOG. I meccanismi metabolici e molecolari coinvolti in questi processi sono, tuttavia, ancora da stabilire.

## Résumé

L'obtention d'un nombre élevé de cellules souches hématopoïétiques (CSH) représente un enjeu majeur pour le développement de protocoles de thérapies cellulaires d'hémopathies ou de tumeurs solides. L'expansion *ex vivo* de ces cellules met en jeu différents acteurs (cytokiniques, environnementaux) et notamment les basses concentrations d'oxygène (O<sub>2</sub>), qui reflètent des conditions physiologiques retrouvées au sein de structures spécifiques de la moelle osseuse où résident les CSH et auxquelles notre équipe s'intéresse depuis plusieurs années. Les effets bénéfiques de ces basses concentrations d'O<sub>2</sub> sur le maintien des CSH sont actuellement bien établis lors de courtes cultures de cellules de moelle osseuse, de sang placentaire ou mobilisées dans le sang. Nous avons cherché à confirmer et à étendre ces résultats à des cellules peu étudiées, les cellules souches de sang périphérique en situation d'homéostasie (CSSP-H). Ces cellules représentent en effet une source possible de CSH à usage thérapeutique, du fait de leur disponibilité et de leur facilité d'accès. Nos travaux ont permis d'établir et d'optimiser un protocole, rapide et simple, de purification de cellules CD34<sup>+</sup> à partir de filtres de leucoréduction (LRF). La quantité et la pureté de ces cellules adaptées à la poursuite de nos travaux, ainsi que leur validation fonctionnelle, nous ont permis de les utiliser comme modèle pour l'étude des effets de cultures de 7 jours très faiblement oxygénées (0,1% d'O<sub>2</sub>). La détermination de combinaisons cytokiniques assurant le maintien et l'expansion des cellules primitives a révélé un rôle bénéfique de l'IL-3 et du SCF couplé à la TPO. Ces conditions de culture ont permis de révéler, comparativement à des cultures réalisées à 20% d'O<sub>2</sub>, le rôle majeur des faibles concentrations d'O<sub>2</sub> dans le maintien de cellules quiescentes, indifférenciées, ne se divisant pas ou très peu et capables de reconstituer une hématopoïèse, suite à leur injection dans des souris NOG. Les mécanismes moléculaires et métaboliques intervenant dans ces processus restent, cependant, encore à établir.

## Abstract

Obtaining a high number of hematopoietic stem cells (HSCs) is a major challenge for developing cell therapies for blood diseases. *Ex vivo* expansion of HSCs involves various factors (cytokines, environment), including low oxygen (O<sub>2</sub>) concentrations, that reflect the physiological conditions found in specific structures of the bone marrow where HSCs reside. Our team is interested with the study of these low O<sub>2</sub> levels for several years and their beneficial effects are currently well established during short-term cultures of cells from bone marrow, cord blood or mobilized in the blood. We sought to confirm and extend these results to poorly studied cells: stem cells from steady state peripheral blood (SSPB). Indeed, these cells represent a possible HSCs source devoted to the therapeutic use, because of their availability and their easy access. Our work has led to the establishment and the optimisation of a procedure, rapid and easy to set up, for CD34<sup>+</sup> cells purification from leukoreduction filters (LRFs). The cell quantities and purities, adapted to our further work, together with their functional validation, led us to use these cells as a model for 7-days *in vitro* cultures performed at very low O<sub>2</sub> concentration (0.1%). Cytokine combination assays, allowing the maintenance and the expansion of primitive cells, have revealed a beneficial influence of IL-3 or SCF + TPO additions. These cultures have revealed, comparatively to those performed at 20% O<sub>2</sub>, a major role of the very low O<sub>2</sub> concentrations in the maintenance of quiescent and undifferentiated cells, showing an un- or low-cycling status and able to reconstitute hematopoiesis, consecutively to their injection into NOG mice. However, the molecular and metabolic mechanisms involved in these processes remain unknown.