UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS

DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SST

ÉQUIPE UPRES-EA3855

THÈSE présentée par :

Tatiana RIBEIRO-FLEURY

soutenue le : **16 Décembre 2010**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Évaluation *in vitro* de la fonction hématopoïétique des cellules souches mésenchymateuses médullaires au cours de leur différenciation

THÈSE dirigée par :

M. DOMENECH Jorge	Professeur, Université François – Rabelais Tours

RAPPORTEURS :

Mme KIEDA Claudine	Directrice de Recherche, CNRS, Orléans
Mr BERGER Marc	Professeur, Université Clermont-Ferrand

JURY :

M. TURHAN Ali	Professeur, Université de Poitiers
M. HÉRAULT Olivier	Professeur, Université François – Rabelais Tours
M. DOMENECH Jorge	Professeur, Université François – Rabelais Tours
Mme KIEDA Claudine	Directrice de Recherche, CNRS, Orléans

UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS

DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SST

ÉQUIPE UPRES-EA3855

THÈSE présentée par :

Tatiana RIBEIRO-FLEURY

soutenue le : **16 Décembre 2010**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Évaluation *in vitro* de la fonction hématopoïétique des cellules souches mésenchymateuses médullaires au cours de leur différenciation

THÈSE dirigée par :

M. DOMENECH Jorge	Professeur, Université François – Rabelais Tours

RAPPORTEURS :

Mme KIEDA Claudine	Directrice de Recherche, CNRS, Orléans
Mr BERGER Marc	Professeur, Université Clermont-Ferrand

JURY :

M. TURHAN Ali	Professeur, Université de Poitiers
M. HÉRAULT Olivier	Professeur, Université François – Rabelais Tours
M. DOMENECH Jorge	Professeur, Université François – Rabelais Tours
Mme KIEDA Claudine	Directrice de Recherche, CNRS, Orléans

Dedico esta tese ….

……a ene maite

…… a meus amados pais

…… a memória de meus queridos avôs, na esperança de que eles estão orgulhosos de mim

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en tout premier Monsieur le Professeur **Jorge Domenech** pour m'avoir accueilli et avoir dirigé mon travail au sein de son laboratoire d'hématopoïèse "Microenvironnement de l'Hématopoïèse et Cellules Souches" à la faculté de Médecine de Tours, équipe EA3855. Ses conseils précieux et ses connaissances ont rendu ces années de thèse très enrichissantes tant au plan scientifique que personnel. Merci pour votre encadrement scientifique, votre rigueur, votre passion pour la recherche et pour mon apprentissage de l'hématologie, j'ai beaucoup appris à vos côtés. Ce travail est également le vôtre. Veuillez y trouvez ici toute ma gratitude.

Je tiens à témoigner ma reconnaissance à Madame le Docteur **Claudine Kieda** et à Monsieur le Professeur **Marc Berger**, pour avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse et d'avoir consacré leur temps à l'analyse et à la critique de ce travail.

Je remercie sincèrement Monsieur le Professeur **Ali Thuran** de me faire l'honneur d'être le président de jury de ma thèse, qu'il trouve ici toute ma reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Professeur **Oliver Hérault** d'avoir accepté d'être membre du jury de ma thèse, mais également d'avoir toujours eu un œil critique sur mon travail. Cela a été particulièrement bénéfique pendant mes quatre années de thèse, qu'il soit assuré ici de toute la reconnaissance que je lui porte.

Je tiens à remercier les techniciens des Cultures Cellulaires du Service d'Hématologie du CHRU de Tours, **Annie**, **Anne**, **Emilie**, **Danièle**, **Manu** et **Julien**, pour leur aide à la fois en biologie cellulaire et moléculaire, et leur gentillesse, ainsi que Madame le Docteur **Marie-Hélène Estienne** pour avoir fait partie du quotidien du laboratoire. Je remercie enfin l'ensemble du personnel du Service d'Hématologie du CHRU de Tours pour leur aide pendant ma thèse.

Je remercie tout le personnel du bloc Opératoire d'Orthopédie du CHRU de Tours, en particulier Monsieur le Professeur **Philipe Rosset** ainsi que tous les internes qui ont fait partie intégrante du laboratoire **Patrick**, **Emilie**, **Julien**, **Guillaume** et **Louis-Romée** pour avoir

effectués les prélèvements de moelle osseuse chez les patients sains de toute maladie hématologique.

Je remercie tous les membres de l'EFS, en particulier Monsieur le Docteur **Luc Sensébé** pour ces conseils mais également **Valérie Chabot** et **Fréderic Deschaseaux** pour toutes leurs réflexions scientifiques ainsi que les techniciens **Angélique**, **Anaïs**, **Audrey** et **Julien** pour leur soutien sans faille. Je remercie **Alain** et **Harris**, pour tous leurs conseils et toute l'aide qu'ils ont apportée à la réalisation de ce travail.

Un grand merci au Docteur **Sophie Iochmann** et au Professeur **Pascale Reverdiau** pour leur aide sur le travail des protéases ainsi que pour l'intérêt qu'elles donnent à mon travail.

Je souhaite remercier le département de génie biologique de l'IUT de Tours pour m'avoir accueilli, et plus particulièrement Monsieur le Professeur **Antoine Touzé** de m'avoir initié à l'enseignement, ainsi qu'à la recherche scientifique lors de mes stages du DEUG SV2 au M2R. Je te remercie pour ton soutien et ton amitié sans faille, trouve ici toute ma reconnaissance.

Je remercie **Christine Vignon** pour son aide à la cytométrie en flux et à la réalisation des qRT-PCT, merci d'avoir pris autant de temps à réaliser ce travail.

Je tiens à remercier vivement nos techniciennes sans qui rien ne serait possible **Elfi Ducrocq** et **Marie-Christine Bernard** pour votre très grande disponibilité, vos connaissances techniques qui ont éclairé mes doutes, votre bonne humeur, pour votre sympathie, votre amitié et pour avoir supporté mon stress, trouvez ici toute l'estime et l'amitié que je vous porte.

Mes remerciements vont également à tous mes anciens stagiaires du laboratoire **Aurélie Picard**, **Marie Boutet**, **Fanny Boursin** et **Hélène Jaudel** sans qui cette thèse n'aurait pas été le même.

Je remercie l'ensemble des membres actuels et anciens du laboratoire pour leur soutien et leur sympathie **Thomas**, **Joan**, **Christelle**, **Bruno**, **Noémie**, **Nathalie** et **Adriana**.

Merci à tous mes amis thésards d'avoir partagé avec moi l'épreuve fatidique de la thèse et plus particulièrement à **Viny** « ma copine » qui a su me soutenir et me réconforter tout au long de cette thèse même si les kilomètres et la frontière belge nous séparaient, attention c'est bientôt ton tour ! Mais également merci à tous mes amis non scientifiques **Willy**, **Aurélie** et **Séverine**, ceux qui m'ont supportée pendant ces 4 ans, et dieu sait que cela n'a pas été évident, merci beaucoup, je vous aime.

Je remercie très chaleureusement mes parents, ce travail vous est particulièrement dédié. Aucun mot ne saurait exprimer à sa juste valeur ma reconnaissance pour vos encouragements et vos sacrifices qui ont consenti à faire de moi ce que je suis. Que ce modeste travail soit le témoignage de mon profond respect et de mon grand amour.

Je ne peux terminer ces remerciements sans avoir une pensée très particulière pour mon époux **Maxime Fleury**. Je ne peux exprimer à travers ses lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers toi. Ton aide, ta générosité, ton soutien ont été pour moi une source de courage et de confiance. Comme tu avais écrit dans une thèse en 2006 « tant de chemins parcourus et aucun n'aurait pu l'être sans toi à mes cotés mais ce n'est rein comparé à tous ceux à venir que nous allons parcourir ensemble », et bien aujourd'hui en 2010 j'aurais pu réécrire ces mêmes mots, cette thèse symbolise un autre chemin parcours ensemble, et il nous en reste encore beaucoup... *je t'aime*

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à la **Société Française d'Hématologie** qui a financé les six derniers mois de ma thèse pour me permettre de terminer ce travail dans de bonnes conditions.

RÉSUMÉ

Les cellules sanguines proviennent d'une cellule souche hématopoïétique (CSH), présente dans la moelle osseuse chez l'homme adulte, qui nécessite d'être en contact étroit avec une zone particulière du microenvironnement médullaire (appelée niche hématopoïétique) pour sa différenciation et son autorenouvellement. La nature exacte des cellules qui composent cette niche (appelée cellules stromales) n'est pas encore bien connue, en particulier concernant sa relation avec les cellules souches mésenchymateuses (CSM). Le but de cette thèse a été d'étudier le rôle des CSM dans la régulation de l'hématopoïèse en fonction de leur type et leur stade de différenciation mésenchymateuse et d'évaluer leur rôle dans la migration des progéniteurs hématopoïétique (PH). Nous montrons que les CSM non différenciées possèdent la capacité de soutien de l'hématopoïèse primitive la plus importante (par culture à long terme pendant 5 semaines) et que cette capacité est rapidement perdue dès 3 jours de différenciation adipogénique, otéogénique et vasculaire musculaire lisse. Par ailleurs, nous montrons que le G-CSF agit directement sur les CSM pour augmenter la migration des CSH/PH hors de la niche (par un test de migration trans-stromale) via un mécanisme MMP-2 dépendant.

Mots clés : CSM, CSH, niche hématopoïétique, régulation de l'hématopoïèse, domiciliation, différenciation, G-CSF, MMP-2.

ABSTRACT

Blood cells arise from a hematopoietic stem cell (HSC), present into bone marrow (BM) in adult humans, which needs close contacts with a special zone of BM microenvironment (named hematopoietic niche) for its differentiation and self-renewal. The precise nature of the niche-forming cells (named stromale cells) are not yet well known, particularly in their relationship with mesenchymal stem cells (MSCs). The aim of the study was to investigate further the role of the MSCs in the hematopoiesis control according to their differentiation pathway and state and to evaluate their role in the migration process of hematopoietic progenitor cells (HPC). We show that non-differentiated MSCs display the best hematopoietic supporting activity (using 5-week long term cultures) that is completely lost after *in vitro* differentiation into adipocytes, osteoblasts and vascular smooth muscle cells. In addition, we show that G-CSF stimulation of BM MSCs promotes HSC/HPC migration (using trans-stromal migration assay) via a MMP-2-dependent mechanism.

Key words: MSC, HSC, hematopoietic niche, hematopoiesis control, domiciliation, differentiation, G-CSF, MMP-2.

ABREVIATIONS

0-9

5-FU	5-fluorouracil

A

A	Adipogénique (voie de différenciation)
α MEM	*Alpha- Minimum Essential Medium*
Ac	Anticorps
ACD	Acide Citrique Dextrose
ADAM	*A Disintegrin And Metalloprotease domain*
ADAM-TS	*A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin type I motif*
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AGM	Aorto-Gonado-Mesonephros
AH	Acide Hyaluronique
ALDH	*Aldéhyde Déshydrogénase*
AMPc	*Adénosnle MonoPhosphate cyclique*
Ang-1	Angiopoïétine 1
APC	Allophycocyanine
APS	Ammonium PerSulfate
ARN	Acide Ribonucléique

B

BFU-E	*Burst Forming Units Erythroid*
BMP	*Bone Morphogenic Protein*
BMPR1A	*récepteur de type 1A à la BMP*
BMPR1B	*récepteur de type 1B à la BMP*
BSA	*Bovin Serum Albumin*

C

C	Chondrocytaire (voie de différenciation)
CAFC	*Cobblestone Area Forming Cell*

CBD	*Collagen Binding Domain*
CD	Cluster de Différenciation
CDK	*Cycline Kinase Dépendante*
cDNA	ADN complémentaire
CFU Eo	*CFU-Eosinophil*
CFU	*Colony-Forming Units*
CFU-Baso	CFU-*Basophil*
CFU-Blasts	CFU-Blastes
CFU-E	*CFU-Erythroid*
CFU-F	CFU-*Fibroblast*
CFU-G	CFU-Granulocyte
CFU-GM	CFU-Granulocyte Macrophage
CFU-M	CFU-Macrophage
CFU-Meg	CFU-Megakaryocyte
CFU-Mix	CFU-Mixte
CFU-MK	
CFU-S	CFU *in the Spleen*
CG	Cathepsine G
CLT	Culture à Long Terme
CS	Cellule Souche
CSF	*Colony Stimulating Factor*
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques
CXCR4	*Chemokine (C-X-C) Receptor 4*
CY	Cyclophosphamide

D

DAPI	4',6' DiAmidino-2-Phényl Indole
DARC	Duffy Antigen Receptor for Chemokines ou Duffy Antigen Red Cells
DHH	*Desert Hedgehog*
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMSO	Diméthylsulfoxide
DPPIV	Dipeptidylpeptidase IV

E

EDTA *EthyleneDiamineTetraacetic Acid*

EGF *Epidermal Growth Factor*

ELISA *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

ELTC-IC *Extended- LTC-IC*

EPO Erythropoïétine

ES *Embryonic Stem cell*

F

FCH Facteur de Croissance Hématopoïétique

FGF *Fibroblast Growth Factor*

FGFR Récepteur aux FGF

FITC Fluoroesceine Iso Thio Cyanate

Flt3 *Fms-like* tyrosine kinase-3

FLT3-L Flt-3 ligant

Fn Fibronectine

Fzd *Frizzleds*

G

GAGs GlycosAminoGlycanes

G-CSF *Granulocyte-Colony-Stimulating Factor*

G-CSFR *G-CSF Receptor*

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

GPI GlycosylPhosphatidylInositol

GRO-β Growth Regulated Oncogen-β

H

HBSS *Hank's Buffered Salt Solution*

HCC Haemofiltrate CC chemiokine

HER *Human Epidermal growth factor Receptor*

HLA-DR	*Human Leucocyte Antigen-D Related*
HRP	*Horse Radish Peroxidase*
HUVEC	*Human Umbilical Vein Endothelial Cell*

I

IBMX	3-IsoButyl-1-Méthyl Xanthine
ICAM-1	*Intercellular Cell Adhesion Molecule-1*
IFN	InterFéroN
Ig	Immunoglobulines
IHH	*Indian Hedgehog*
IL	Interleukine
ITS	Insuline Transférine Sélénium

J

Jag1	*Jagged 1*

K

KDR	*Kinase Domain containing Receptor*
KO	*Knock-Out*

L

LB	Luria Bertani
LFA-1	*Lymphocyte Function-associated Antigen*-1
LIF	*Leukemia Inhibitory Factor*
LRP	*Low density lipoprotein Receptor-related Protein*
LTBMC	*Long Term Bone Marrow Culture*
LTC-IC	*Long Term Culture-Initiating Cell*
LT-HSC	*Long Term Repopulating Hematopoietic Stem Cells*

M

MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
M-CSF	Monocyte Colony-Stimulating Factor
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MIP-1	*Macrophage Inflammatory Protein-1*
MMP	*Matrix Metalloproteinase*
MO	Moelle Osseuse
MPCs	*Mesodermal progenitor Ce*ll

N

NE	Neutrophile Elastase
NK	*Natural Killer*
NOD-SCID	*Non Obese Diabetic Severe Combine Immuno-Deficiency*

O

O	Ostéogénique (voie de différenciation)
OPG	Ostéoprotégérine
OPN	Ostéopontine

P

P2	Passage numéro 2
PA	*Plasminogen Activator*
PBS	*Phosphate Buffer Saline*
PBST	*Phosphate Buffer Saline Tween*
PE	PhycoErythrine
PECAM-1	*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*
PH	Progéniteurs hématopoïétiques
PMSF	Phenylmethylsulfonide Fluoride
PN-1	Protéase-Nexine 1
PSGL-1	P-*Selectin Glycoprotein Ligand*-1

PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
PTH	hormone para-thyroïdienne
PVDF	PolyVinyliDene Fluoride

R

RANK	*Receptor Activator of Nuclear factor Kappa beta*
RANK-L	*Receptor Activator of Nuclear factor Kappa beta Ligand*
Rb	Rétinoblastome
RCPG	Récepteurs à 7 domaines transmenbranaire Couplés aux Protéines G
RECK	*REversion inducing Cysteine Rich protein with Kazal motif*
RHAMM	*Receptor for Hyaluronate-Mediated Motility*
Rho123	Rhodamine 123
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute medium*

S

SCF	*Stem Cell Factor*
SCID	*Severe Combined Immuno-Deficiency*
SDF-1	*Stromal Cell Derived Factor-1*
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Sélectine E	Sélectine endothéliale
Sélectine L	Sélectine leucocytaire
Sélectine P	Sélectine plaquettaire
SHH	*Sonic Hedgehog*
shRNA	short hairpin RNA
SLAM	*Signaling Lymphocyte Activation Molecule*
Smo	Smoothened
SP	*Side Population*
SRC	*SCID Repopulating Cell*
SVF	Sérum de veau foetal

T

TEMED NNN'N' tetramethylethylene diamine

TFPI-2 *Tissue Factor Pathway Inhibitor-2*

TGF-β *Transforming Growth Factor-β*

TIMP *Tissue Inhibitors of Matrix metalloProteinases*

TNF *Tumor Necrosis Factor*

TNF-α *Tumour Necrosis Factor-α*

TPO Thrombopoïétine

TPO-R *Thrombopoïétine Receptor*

TrHBMEC *Transformed Human Bone Marrow Endothelial Ce*lls

Tris Tri-(hydroxymethyl)-aminométhane

UVWXYZ

V ou VML Vasculaire Musculaire Lisse (voie de différenciation)

VCAM-1 *Vascular Cell Adhesion Molecule*-1

VE-Caderin *Vascular Endothelial Cadherin*

VEGF *Vascular Endothelial Growth Factor*

VLA *Very Late Antigen*

Vol Volume

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des annexes

INTRODUCTION GENERALE **27**

RÉGULATION DE L'HÉMATOPOÏÈSE PAR LE MICRO-ENVIRONNEMENT **31**

A- L'HEMATOPOÏESE ET SON MICROENVIRONNEMENT **32**

1. DEFINITION DE L'HEMATOPOÏESE 32
2. NOTION DE CELLULE SOUCHE 35
3. LES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES 38
3.1. Tests fonctionnels *38*
3.2. Isolement des cellules hématopoïétiques primitives et caractérisation phénotypique *40*
3.3. Physiologie des CSH : balance entre autorenouvellement et différenciation *44*
4. LE MICROENVIRONNEMENT MEDULLAIRE CELLULAIRE 47
4.1. Structure de la moelle osseuse humaine *47*
4.2. Rôle fonctionnel des cellules du microenvironnement médullaire in vivo *51*
4.3. Le microenvironnement médullaire cellulaire in vitro *51*
5. LA NOTION DE CELLULE SOUCHE MESENCHYMATEUSE ET LA NICHE HEMATOPOÏETIQUE 56
5.1. Définition *56*
5.2. Localisation *56*
5.3. Propriété biologiques *57*
5.4. Signature moléculaire *62*
5.5. Les CSM et la niche hématopoïétique *63*
6. LE MICROENVIRONNEMENT MEDULLAIRE MOLECULAIRE 71
6.1. Les molécules d'adhérence *71*
6.2. Les cytokines produites par le microenvironnement *76*
6.3. Le rôle des facteurs de croissance dans la régulation de l'hématopoïèse *81*
6.4. Les chimiokines et leurs récepteurs *82*

B-ROLE DU MICROENVIRONNEMENT HEMATOPOÏETIQUE DANS LA MIGRATION DES CELLULES SOUCHES ET DES PROGENITEURS HEMATOPOÏETIQUES **89**

1. LA DOMICILIATION DES CSH 89
1.1. L'extravasation par l'endothélium et migration à travers le stroma *90*
1.2. Logement dans la niche *93*
2. LA MOBILISATION DES CSH/PH 94
2.1. Les différents inducteurs de la mobilisation des CSH/PH *95*
2.2. Rôle des protéases dans la mobilisation *99*
2.3. Les intéractions moléculaires majeures intervenant dans la mobilisation *111*

OBJECTIFS **114**

MATERIELS ET METHODES **115**

1. CELLULES UTILISEES 116
1.1. Les cellules souches mesenchymateuses *116*
1.2. Les cellules hématopoïétiques *117*
1.3. Les cellules stromales murines *118*
1.4. Les lignées d'osteosarcomes *119*
1.5. Les cellules vasculaires *119*
1.6. Les cellules endothéliales *120*
1.7. Les cellules de tératocarcinome embryonnaire *120*
2. INDUCTION DES CSM EN DIFFERENCIATION 121
2.1. Culture *121*
2.2. Caracterisation de l'efficacite de différenciation *122*
2.3. Caractérisation de la perte d'immaturite *128*
3. ZYMOGRAPHIE : ACTIVITE GELATINOLYTIQUE DES MMP-2 ET -9 129
4. ANALYSE DE LA PRODUCTION DE CYTOKINES PAR ELISA 131
5. CYTOMETRIE 131
5.1. Principe *131*

5.2. Préparation des cellules et analyse cytométrique 132
6. QUANTITATIVE REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION: QRT-PCR 132
6.1. Extraction d'ARN 132
6.2. Purification de l'ARN total 134
6.3. Dosage de l'ARN total 134
6.4. Techniques de réaction de polymérisation en chaines 134
7. CO-CULTURE CSM-CSH 137
7.1. Co-culture à long terme à concentration saturante 137
7.2. Co-culture à long terme en dilution limite (test CAFC) 139
7.3. Culture clonogenique (progeniteurs) 140
8. MIGRATION TRANSTROMALE DES CELLULES HEMATOPOÏETIQUES 140
8.1. Principe du test 140
8.2. Préparation des inserts recouverts de cellules stromales 142
8.3. Migration trans-stromale des cellules hématopoïétiques 142
8.4. Blocage de la MMP-2 143
9. L'ARN INTERFERENCE 144
9.1. Amplification des shrna 144
9.2. Transfection des csm 145

RÉSULTATS ET DISCUSSION 146

A- ETUDE PHENOTYPIQUE ET FONCTIONNELLE DES CSM AU COURS DE LEUR DIFFERENCIATION 147

1. EVALUATION DE LA MULTIPOTENCE ET DU PHENOTYPE DES CSM 147
1.1. Capacité de différenciation mésenchymateuse des CSM 147
1.2. Expression des marqueurs d'immaturite des CSM 155
1.3. Evaluation du phénotype membranaire des CSM 160
1.4. Expression des transcrits des protéines potentiellement impliquées dans la niche 162
2. EVALUATION DE LA FONCTION HEMATOPOÏETIQUE DES CSM 165
2.1. Capacité de soutien de l'hématopoïèse 165
2.2. Capacité de migration des PH 172
2.3. Evaluation des molécules impliquées dans le soutien de l'hématopoïèse 184

B- CONTROLE DE LA MIGRATION DES CELLULES HEMATOPOÏETIQUES PAR LES CELLULES STROMALES MEDULLAIRES 190

1. LA STIMULATION DES CSM PAR LE G-CSF PERMET LA MIGRATION DES CELLULES CD34+ 191
2. LA STIMULATION DES CSM PAR LE G-CSF EST ABOLIE PAR ARN INTERFERENCE (SHRNA) DIRIGÉ CONTRE LE G-CSFR 192
2.1. Les différentes techniques d'ARN interférence 192
2.2. Modes d'action des shRNA 193
2.3. Résultats 193
3. LA STIMULATION DES CSM PAR LE G-CSF PERMET LA MIGRATION DES CD34+ VIA UN MECANISME MMP2-DEPENDANT 196
4. CONCLUSION 200

DISCUSSION PERSPECTIVES 201

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 213

ANNEXES 237

TABLEAU I : MARQUEURS DE SURFACE DES CSM *D'APRES DEANS ET MOSELEY, 2000 ET PITTENGER ET MARTIN, 2004* 58
TABLEAU II : PRINCIPALES VOIES DE DIFFERENCIATION DES CSM ET LEURS INDUCTEURS 60
TABLEAU III : INTEGRINES EXPRIMEES PAR LES CELLULES HEMATOPOÏETIQUES 73
TABLEAU IV : CARACTERISTIQUES DES PRINCIPALES CYTOKINES 78
TABLEAU V : NOMENCLATURE DE CHIMIOKINES D'APRES *PEASE&WILLIAMS*, 2006. 83
TABLEAU VI : LISTE DES MMP ET DE LEURS SUBSTRATS 103
TABLEAU VII : LISTE DES ANTICORPS UTILISES EN WESTERN-BLOT 127
TABLEAU VIII : LISTE DES ANTICORPS UTILISES EN IMMUNOFLUORESCENCE 129
TABLEAU IX : LISTE DES ANTICORPS UTILISES EN CMF 133
TABLEAU X : LISTE DES AMORCES UTILISEES EN QRT-PCR 136

FIGURE 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'HEMATOPOÏESE. 33
FIGURE 2 : PRINCIPES DE LA DIVISION ASYMETRIQUE ET SYMETRIQUE DES CELLULES SOUCHES (D'APRES SPRADLING 2001). 37
FIGURE 3 : PHENOTYPE DES DIFFERENTES CELLULES HEMATOPOÏETIQUES LORS DE LA DIFFERENCIATION. 42
FIGURE 4 : LES DIFFERENTES THEORIES DE LA REGULATION DE L'HEMATOPOÏESE 46
FIGURE 5 : STRUCTURE DE LA MOELLE OSSEUSE. 48
FIGURE 6 : LES NICHES DES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES DANS LA MOELLE. 50
FIGURE 7 : POTENTIELS DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES. 59
FIGURE 8 : SCHEMA DES INTERACTIONS ENTRE LES CSH ET LES OSTEOBLASTES DE LA NICHE ENDOSTEALE (D'APRES WILSON & TRUMP, 2006). 65
FIGURE 9 : STRUCTURE DES CHIMIOKINES: LES DIFFERENTES CLASSES DE CHIMIOKINES ET LEURS RECEPTEURS (D'APRES BAJETTO, *ET AL* 2002) 85
FIGURE 10 : STRUCTURE DES RECEPTEURS DE CHIMIOKINES ET LEURS VOIES DE SIGNALISATION 88
FIGURE 11 : CLASSIFICATION STRUCTURALE DES MMP SECRETEES ET MEMBRANAIRES. (D'APRES EGEBLAD & WERB, 2002) 101
FIGURE 12 : MECANISME D'ACTIVATION DE LA PRO-MMP-2 PAR LE COMPLEXE MT-1-MMP/TIMP-2 A LA SURFACE CELLULAIRE 108
FIGURE 13 : LES INHIBITEURS DIRECTS DE MMP. 109
FIGURE 14 : PRINCIPE D'ACTIVATION DES MMP PENDANT LA ZYMOGRAPHIE 130
FIGURE 15 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA QPCR REALISEE A L'AIDE DU SYBR® GREEN APRES LA REVERSE TRANSCRIPTION DES ANR TOTAUX EN ADNC. 135
FIGURE 16 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA TLDA (TAQMAN LOW DENSITY ARRAY) QUI EST UNE QPCR TAQMAN® REALISEE SUR DES PLAQUES MICROFLUIDIQUES APRES LA REVERSE TRANSCRIPTION DES ANR TOTAUX EN ADNC. 138
FIGURE 17 : MODELE *IN VITRO* DE MOBILISATION DES CELLULES HEMATOPOÏETIQUES. 141
FIGURE 18 : CONTROLE DE LA DIFFERENCIATION ADIPOCYTAIRE. 149
FIGURE 19 : CONTROLE DE LA DIFFERENCIATION OSTEOCYTAIRE. 151
FIGURE 20 : CONTROLE DE LA DIFFERENCIATION VASCULAIRE MUSCULAIRE LISSE. 153
FIGURE 21 : ETUDE HISTOLOGIQUE DES CSM INDUITES EN DIFFERENCIATION CHONDROGENIQUE. 154
FIGURE 22 : ORIGINE DES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES 155

FIGURE 23 : ETUDE DES MARQUEURS D'IMMATURITE. 159

FIGURE 24 : PHENOTYPE MEMBRANAIRE DES CSM AU COURS DES DIFFERENCIATIONS A, O OU V. 161

FIGURE 25 : ANALYSE DES GENES IMPLIQUES DANS L'HEMATOPOÏESE PAR QRT-PCR. 163

FIGURE 26 : CO-CULTURE A LONG TERME A CONCENTRATIONS SATURANTES. 167

FIGURE 27 : AIRE DE COBBLESTONE EN MICROSCOPIE INVERSE (X20). 169

FIGURE 28 : CO-CULTURE A LONG TERME EN DILUTION LIMITE. 171

FIGURE 29 : FREQUENCE DU NOMBRE DE CAFC OBTENUE PAR CO-CULTURE A LONG TERME. 171

FIGURE 30 : ETABLISEMENT DE LA COUCHE STROMALE OPTIMALE 173

FIGURE 31 : CONTROLE DE DIFFERENCIATION SUR INSERTS 174

FIGURE 32 : POURCENTAGE DE MIGRATION TRANS-STROMALE DES MO7E AU TRAVERS DE CSM NON DIFFERENCIEES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN SDF-1. 175

FIGURE 33 : MIGRATION TRANS-STROMALE DE MO7E AU TRAVERS DE CSM PLUS MOINS DIFFERENCIEES DANS LE VOIE A, O OU V. 177

FIGURE 34 : MIGRATION TRANS-STROMALE DES CD34+ AU TRAVERS DE CSM INDUITES EN DIFFERENCIATION. 178

FIGURE 35 : MIGRATION TRANS-STROMALE DE CELLULES CD34+ AU TRAVERS DE 3 LIGNEES CELLULAIRES CAL72 (CELLULES OSTEOBLASTIQUES), TRHBMEC (CELLULES ENDOTHELIALES) ET MRC5 (CELLULES A DIFFERENCIATION VASCULAIRE MUSCULAIRE LISSE). 179

FIGURE 36 : MIGRATION TRANS-STROMALE DES CFU AU TRAVERS DES CSM PLUS OU MOINS DIFFERENCIEES. 180

FIGURE 37 : QUANTIFICATION RELATIVE DES METALLOPROTEASES PAR INTEGRATIONS DES SIGNAUX OBTENUS PAR ZYMOGRAPHIE. 181

FIGURE 38 : INHIBITION DE LA MIGRATION TRANS-STROMALE DE CELLULES CD34+ AU TRAVERS DE CSM INDUITES DANS DIFFERENTES VOIES DE DIFFERENCIATION PAR INHIBITION DE LA MMP2 A L'AIDE D'ANTICORPS BLOQUANT ANTI-MMP2. 183

FIGURE 39 : CONCENTRATION DES CYTOKINES DANS LE SURNAGEANT DES CSM INDUITES EN DIFFERENCIATION. ANALYSE PAR ELISA. 185

FIGURE 40 : IMMUNOFLUORESCENCE DES CSM ENGAGEES DANS UNE VOIE DE DIFFERENCIATION 188

FIGURE 41 : EFFET DU G-CSF SUR LA MIGRATION TRANS-STROMALE DES CELLULES HEMATOPOÏETIQUES 192

FIGURE 42 : DETECTION DU G-CSFR PAR (**A**) CYTOMETRIE EN FLUX ET (**B**) WESTERN-BLOT 194
FIGURE 43 : INHIBITION DE G-CSFR PAR SHRNA 195
FIGURE 44 : ANALYSE DES PROTEASES 197
FIGURE 45 : EFFET DU G-CSF SUR L'ACTIVATION MEMBRANAIRE DE LA MMP-2 ANALYSE PAR ZYMOGRAPHIE 198
FIGURE 46 : ROLE DE LA MMP-2 DANS LA MIGRATION TRANS-STROMALE DES CELLULES HEMATOPOÏETIQUES. 199

ANNEXE 1 : Liste des publications ……...……238

ANNEXE 2 : Publication soumise……241

ANNEXE 3 : Publications accéptées……

INTRODUCTION GENERALE

Chez l'homme adulte, la fabrication des cellules sanguines, ou hématopoïèse, est localisée exclusivement dans la moelle osseuse. Ce processus intervient dans une région anatomique particulière appelée « niche hématopoïétique » au sein de laquelle des cellules primitives, ou cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont associées à un microenvironnement spécifique. Celui-ci constitue le support physique de l'hématopoïèse mais aussi un élément essentiel de sa régulation locale responsable du maintien, de la prolifération et de la différenciation des CSH en progéniteurs clonogéniques puis en cellules matures pour produire l'ensemble des lignages hématopoïétiques (myéloïdes et lymphoïdes) et assurer le renouvellement des cellules sanguines matures. Ce microenvironnement, composé de cellules stromales et sécrétant une matrice extracellulaire (MEC), nécessite pour exercer cette fonction régulatrice d'établir des contacts étroits avec les CSH par l'intermédiaire de molécules d'adhérence (intégrines), de facteurs solubles (cytokines et chimiokines) et de leurs récepteurs.

Parmi les composants du microenvironnement, les cellules endothéliales ont un rôle prédominant puisqu'en bordant les sinus veineux, celles-ci forment une barrière lors de la migration des CSH dans le sang circulant mais aussi lors de leur retour à la moelle osseuse (domiciliation). Ces phénomènes de migration sont également observés au cours des greffes à l'occasion (i) de la mobilisation périphérique des CSH avec des facteurs de croissance hématopoïétiques pour la collecte d'un greffon et (ii) du repeuplement de la moelle osseuse par les cellules greffées.

En ce qui concerne les cellules stromales, elles ont été décrites comme des cellules de nature conjonctive qui suivent une voie de différenciation vasculaire musculaire lisse (Galmiche *et al.*, 1993). Le caractère indispensable de ces cellules au soutien de l'hématopoïèse a été démontré depuis longtemps par des techniques de culture à long terme et ceci même en l'absence de cytokines exogènes (Dexter *et al.*, 1977; Gartner and Kaplan, 1980).

Plus récemment, plusieurs équipes ont souligné le rôle déterminant des ostéoblastes dans la stimulation de l'hématopoïèse primitive, observant que les CSH étaient en contact direct avec les ostéoblastes au niveau de l'endostéum via la N-cadhérine (Zhang *et al.*, 2003) ou que l'induction de l'ostéogénèse s'accompagnait d'une augmentation du pool de CSH (Calvi *et al.*, 2003). Ces données ont alors favorisé l'émergence du concept de "niche ostéogénique" ou "endostéale" dont l'exclusivité a été remise en cause récemment par le groupe de Morrison montrant même que les CSH quiescentes étaient plus nombreuses dans les zones périvasculaires que dans les zones endostéales (Kiel *et al.*, 2005). Ces mêmes auteurs indiquent que les CSH les plus primitives n'exprimeraient pas la N-cadhérine et seraient

présentes même lorsque l'ostéogénèse est altérée (Kiel *et al.*, 2007). Le groupe de Nagasawa a confirmé l'importance des vaisseaux dans la régulation de l'hématopoïèse en montrant une interaction très étroite des CSH primitives avec des cellules réticulaires, exprimant fortement SDF-1, retrouvées aussi bien près des cellules endothéliales que de l'endostéum (Sugiyama *et al.*, 2006).

Ainsi au concept de niche "endostéale" peut-être associé celui de niche "vasculaire".

Enfin, le rôle des adipocytes dans l'hématopoïèse au sein du microenvironnement n'est pas encore très clair. Si la présence d'adipocytes est associée chez la souris à un meilleur maintien *in vitro* des progéniteurs (Greenberger, 1978), ceci n'a pas été retrouvé chez l'homme (Touw and Lowenberg, 1983).

Le point commun entre les cellules du microenvironnement qui composent ces différentes niches est leur origine mésenchymateuse, toutes ces cellules dérivant très probablement d'une même cellule, la cellule souche mésenchymateuse (CSM). En effet, les CSM sont connues pour donner naissance à différents composants cellulaires du microenvironnement comme les ostéoblastes (O), les cellules vasculaires musculaires lisses (V) et les adipocytes (A). Elles peuvent aussi se différencier en chondrocytes et, dans certaines conditions, en cellules possédant des marqueurs non mésodermiques comme des marqueurs neuronaux ou hépatocytaires.

La nature des cellules stromales qui constituent ces niches dans les zones endostéales et vasculaires n'est pas très bien définie, en particulier concernant leur relation avec les CSM. Il n'a pas encore été démontré si ces niches étaient constituées de CSM non différenciées ou de cellules plus ou moins engagées dans ces voies de différenciation mésenchymateuse. Malgré le grand nombre de travaux publiés sur la capacité de différenciation des CSM, peu d'études ont cherché à établir un lien avec leur fonction hématopoïétique (Wagner *et al.*, 2007; Morad *et al.*, 2008). Le modèle des CSM nous offre l'opportunité d'évaluer *in vitro* ce lien en utilisant des cellules mésenchymateuses engagées dans différentes voies de différenciation et ceci à différents temps de cette différenciation.

L'objectif principal de ce travail est de comparer *in vitro* la fonction hématopoïétique de CSM non différenciées et de CSM induites à se différencier dans les voies A, O ou V. La fonction hématopoïétique des CSM à ces différents stades de différenciation est évaluée sur leur capacité de soutien de l'hématopoïèse primitive et différenciée, mais également sur leur capacité à laisser migrer des cellules enrichies en cellules souches/progéniteurs hématopoïétiques. L'étude des CSM différenciées dans les voies ostéogénique et vasculaire

musculaire lisse permet d'approcher leur rôle éventuel au sein des niches endostéales et vasculaires.

La première partie de ce manuscrit présente une mise au point bibliographique sur l'hématopoïèse et sa régulation par le microenvironnement médullaire. Elle introduit également la domiciliation et la mobilisation des CSH en indiquant les différents mécanismes et médiateurs pouvant être impliqués dans ces processus de migration des CSH.

La seconde partie est constituée par l'exposé des travaux réalisés au cours de notre étude pour l'évaluation du rôle des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse dans le soutien de l'hématopoïèse et la régulation de la migration des cellules souches hématopoïétiques.

RÉGULATION DE L'HÉMATOPOÏÈSE PAR LE MICRO-ENVIRONNEMENT

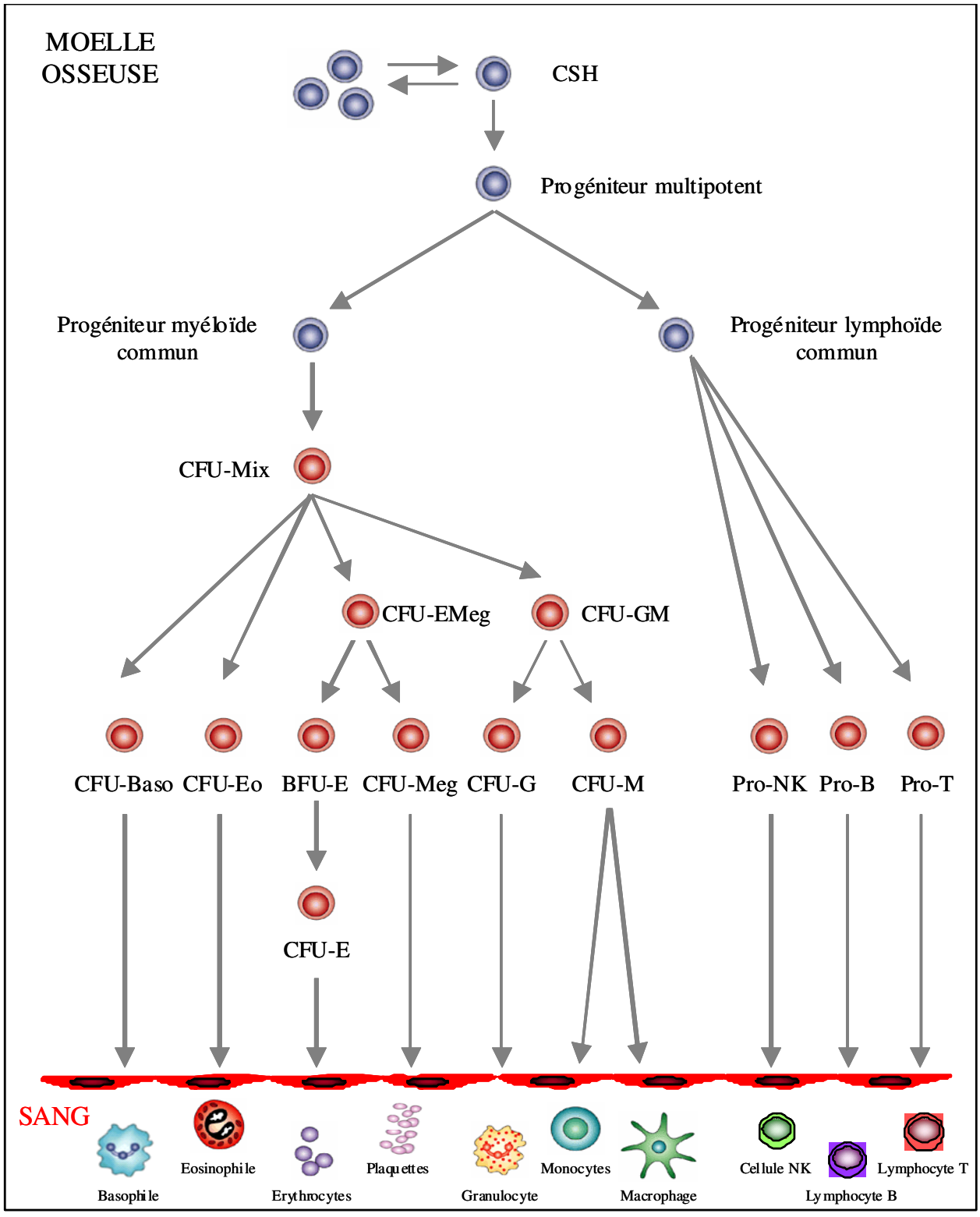
A- L'HEMATOPOÏESE ET SON MICROENVIRONNEMENT

1. DEFINITION DE L'HEMATOPOÏESE

L'hématopoïèse est définie comme l'ensemble des mécanismes qui assure le renouvellement des cellules sanguines tout au long de la vie. C'est un système cellulaire complexe qui, à partir de cellules primitives dites "souches", aboutit à la production permanente et régulée de cellules hématopoïétiques différenciées. En effet, les cellules sanguines ont une durée de vie limitée (par exemple 7 jours pour les plaquettes et 120 jours pour les hématies) et doivent être remplacées pour assurer le maintien de la fonction sanguine. Chez l'homme adulte, l'hématopoïèse a lieu dans la moelle osseuse (MO) des os plats (sternum, sacrum, côtes et vertèbres) et dans l'épiphyse des os longs, alors que chez le fœtus, les organes hématopoïétiques principaux sont la rate et le foie.

Le modèle hématopoïétique a été très étudié depuis 1960 et des progrès dans les techniques d'exploration ont permis de bien connaître son organisation. Il fait intervenir deux composantes essentielles : les cellules hématopoïétiques et le microenvironnement médullaire. La première est exclusivement cellulaire et comprenant des cellules à caractère "souche". Le caractère "souche" est défini par la présence de trois propriétés essentielles, l'auto-renouvellement, la différenciation et la capacité de régénérer *in vivo* l'ensemble des lignages hématopoïétiques. La deuxième est composée de cellules stromales sécrétant des facteurs solubles et d'une matrice extracellulaire. Le rôle du microenvironnement est à la fois de soutenir physiquement l'hématopoïèse mais aussi de réguler l'auto-renouvellement, la survie et la différenciation des cellules hématopoïétiques. La disposition spatiale particulière des cellules stromales permet une association physique étroite avec les cellules souches qui se prolonge par une sécrétion de molécules solubles (cytokines et chimiokines). Ce modèle proposé par Schofield en 1978 est appelé niche hématopoïétique et a pour rôle de contrôler le développement et la détermination des cellules souches hématopoïétiques (Schofield, 1978).

Les cellules hématopoïétiques sont organisées selon un système défini et hiérarchisé, depuis des cellules souches primitives jusqu'à des cellules matures fonctionnelles *(Figure 1)*.



<u>Figure 1 :</u> Représentation schématique de l'hématopoïèse.

L'organisation hiérarchique comprend les cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui sont à l'origine des lignages myéloïde et lymphoïde, puis les progéniteurs plus ou moins différenciés (*Colony-Forming Unit* ; CFU) et enfin les cellules matures qui passent dans le sang.

L'hématopoïèse médullaire peut être divisée en trois compartiments en fonction des capacités d'auto-renouvellement et de différenciation de ces cellules :

- **les Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH)** : ce sont des cellules à haut pouvoir d'auto-renouvellement, capables d'assurer à long terme la production de l'ensemble des lignages hématopoïétiques. C'est la population la plus rare du tissu, correspondant à des cellules non identifiables morphologiquement et majoritairement quiescentes.

- **les progéniteurs hématopoïétiques (PH)** : ce compartiment désigne une population de cellules également non identifiables et présentant des propriétés de différenciation variable. Parmi eux, les progéniteurs immatures possèdent une grande capacité de prolifération et sont multipotents, c'est-à-dire capables de générer plusieurs lignages. Les progéniteurs matures ont quant à eux, un potentiel de prolifération plus réduit et une différenciation restreinte à un lignage. Ils peuvent être mis en évidence *in vitro* par des cultures clonogéniques en milieu semi-solide où ils donnent naissance à des colonies de cellules morphologiquement reconnaissables. Plusieurs types de *Colony-Forming Units* (CFU) peuvent être distinguées dont :

  - les CFU-Mix : progéniteurs mixtes formant des colonies de cellules appartenant à plusieurs lignées
  - les *Burst Forming Units Erythroid* (BFU-E) : progéniteurs érythroïdes immatures donnant des CFU Erythroid (CFU-E), progéniteurs matures de la lignée
  - les CFU-Granulocyte Macrophage (CFU-GM) : progéniteurs granulomonocytaires bipotents se différenciant en progéniteurs granulocytaires (CFU-G) et progéniteurs monocytaires (CFU-M)
  - les CFU-Megakaryocyte (CFU-Meg) : progéniteurs mégacaryocytaires.

- **les précurseurs hématopoïétiques et les cellules matures** : Il s'agit des cellules appartenant aux lignées érythroblastique, mégacaryocytaire, granulo-monocytaire et lymphoïde visibles et parfaitement identifiables sur un myélogramme standard. Ces cellules ont acquis les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles spécifiques d'un lignage avec un haut pouvoir de maturation et de multiplication. Une fois différenciées, elles vont gagner la circulation pour assurer leur fonction dans le sang.

Dans la moelle osseuse, l'hématopoïèse intervient dans une région anatomique particulière appelée « niche hématopoïétique » au sein de laquelle les CSH sont associées à un microenvironnement spécifique. Celui-ci constitue le support physique de l'hématopoïèse mais aussi un élément essentiel de sa régulation locale responsable du maintien, de la prolifération et de la différenciation des CSH en progéniteurs clonogéniques puis en cellules matures. Ce microenvironnement, composé de cellules stromales et sécrétant une matrice extracellulaire (MEC), nécessite pour exercer cette fonction régulatrice d'établir des contacts étroits avec les CSH par l'intermédiaire de molécules d'adhérence (intégrines), de facteurs solubles (cytokines et chimiokines) et de leurs récepteurs.

2. NOTION DE CELLULE SOUCHE

C'est par l'intermédiaire du système hématopoïétique que le concept de cellule souche a été élaboré. Du fait du faible temps de survie de certaines cellules sanguines, il a été suggéré l'existence de cellules souches adultes multipotentes à grande capacité prolifération localisées dans la MO. Les cellules souches présentent trois caractéristiques essentielles :

- une très haute capacité d'auto-renouvellement,
- une capacité à se différencier pour donner naissance à l'ensemble des cellules matures du tissu concerné,
- une capacité à régénérer *in vivo* l'organe ou le tissu qui l'héberge.

La présence de cellules souches chez l'adulte a été montrée dans de nombreux tissus. La plupart des organes paraissent ainsi composés d'un ensemble de cellules différenciées et d'un contingent beaucoup plus faible de cellules souches capables d'assurer à long terme le maintien et la régénération des cellules. Chaque type de cellule souche se développe au sein d'une "niche" spécifique fournissant les signaux nécessaires à l'équilibre entre l'auto-renouvellement et l'engagement des cellules souches dans les voies de différenciation.

Deux hypothèses mécanistiques ont été proposées pour expliquer l'équilibre auto-renouvellement / détermination (Spradling *et al.*, 2001) *(Figure 2)* :

- un mécanisme de division asymétrique des cellules souches, dit "de lignage", par lequel les cellules souches, en se divisant, donnent naissance à deux cellules filles dont la destinée est différente. L'une des cellules fille conserve le caractère souche (en maintenant le contact à la niche), alors que la seconde, se détermine vers une voie de différenciation.

- le second mécanisme, dit "de population", propose une division symétrique des cellules souches par lequel une cellule souche en se divisant donnera naissance soit à deux cellules souches soit à deux cellules filles déterminées. Seul ce mécanisme peut expliquer l'amplification du compartiment des cellules souches nécessitée par des situations de stress à la suite d'agression de l'organisme. Ce mécanisme paraît validé, entre autres, pour les CSH.

Afin de palier à ce problème deux équipes ont identifié chez la souris quatre protéines jouant le rôle de facteurs de transcription suffisant pour reprogrammer une cellule adulte en cellule souche similaire aux cellules souches embryonnaires (Wernig *et al.*, 2007), permettant donc de ne plus utiliser de cellules embryonnaires. Les développements de ces travaux sur des cellules humaines, montrent qu'il est désormais possible de créer des cellules souches humaines, appelées pluripotentes induites (*induced pluripotent stem cells*, iPS), à partir des cellules adultes de tout un chacun (Takahashi and Yamanaka, 2006; Yu *et al.*, 2007). L'équipe de S. Yamanaka, a reprogrammé des cellules de la peau et de tissu conjonctif d'adultes en cellules souches pluripotentes induites. Cette équipe a utilisé des rétrovirus qui en infectant les cellules adultes, insèrent quatre gènes, Oct3/4, Sox2, Klf4, et c-Myc, et les font exprimer par la cellule, alors que l'expression endogène de ces gènes avait été perdue depuis que les cellules s'étaient différenciées de cellules embryonnaires en cellules somatiques (adultes). Apres plusieurs jours, ces cellules transfectées ressemblent à des cellules souches embryonnaires (Takahashi and Yamanaka, 2006). L'équipe de J. Thomson, a quant à elle reprogrammé des cellules de peau fœtales et de nouveau-né en cellules souches pluripotentes induites avec quatre facteurs légèrement différents, Oct3, Sox2, Nanog et Lin28 (Yu *et al.*, 2007).

Les deux équipes ont montré les analogies de ces cellules souches pluripotentes induites avec les lignées de cellules souches embryonnaires existantes. Comme ces dernières, ces nouvelles cellules iPS induisent des tumeurs (tératomes) chez des souris ne pouvant pas les rejeter lorsqu'elles sont greffées. Ces cellules sont également capables de former les trois types de cellules germinales retrouvées au stade embryonnaire. Leur profile d'expression de gènes est comparable, et plus éloigné des cellules de peau utilisées à l'origine. La morphologie, les antigènes de surface et les marqueurs épigénétiques de ces cellules iPS sont aussi comparables à ceux des cellules souches embryonnaires, ainsi que leur activité télomerase, l'enzyme responsable d'allonger les télomères et ainsi assurer l'immortalité des cellules. Ces travaux suggèrent donc que l'obtention de cellules souches ne passera peut-être désormais plus par l'obtention de cellules embryonnaires, évitant le problème éthique posé par l'utilisation de cellules embryonnaires et le moratoire sur ce type de recherche décrété par les gouvernements de nombreux pays.

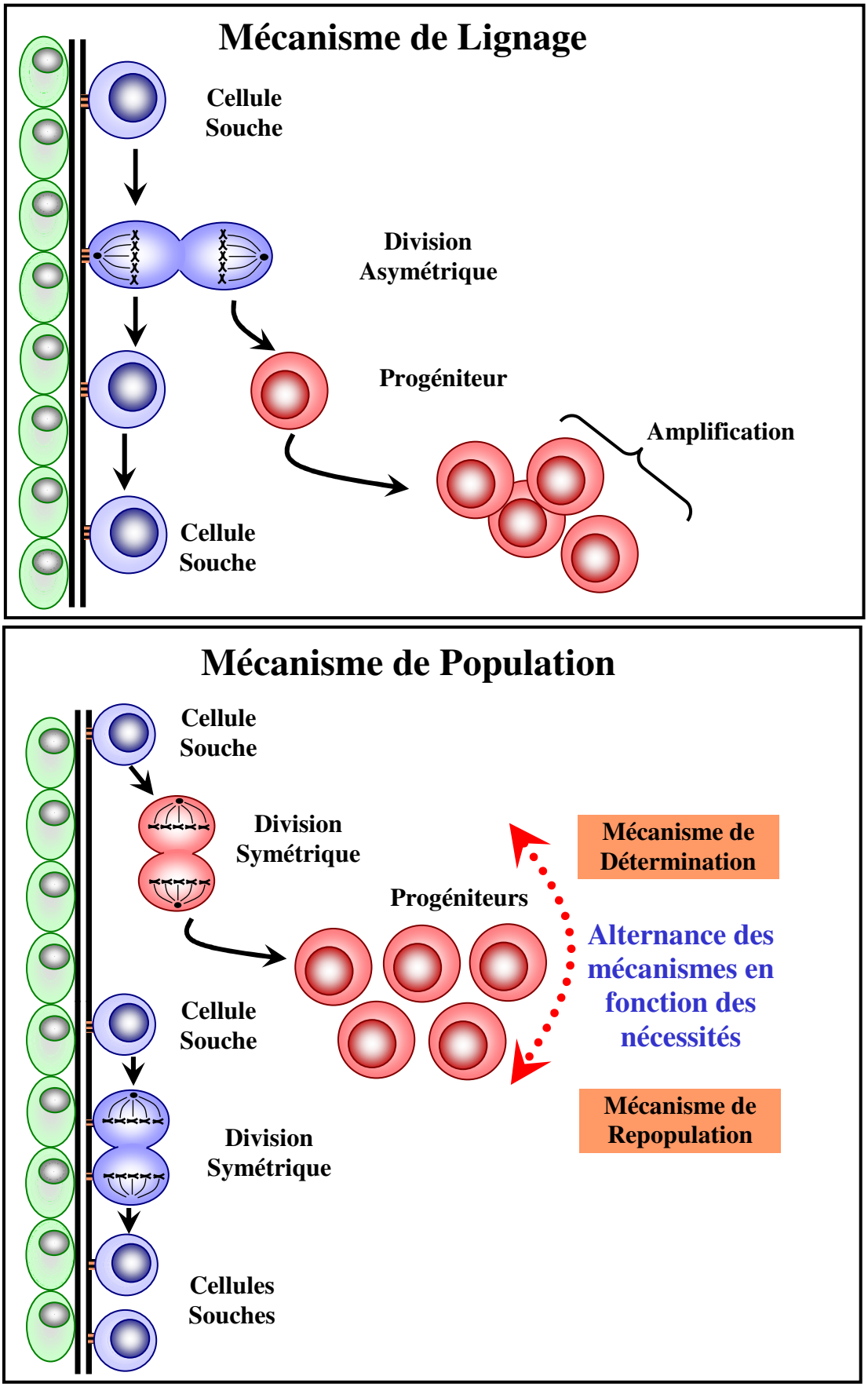


Figure 2 : Principes de la division asymétrique et symétrique des cellules souches (d'après Spradling 2001).

Nous nous intéresserons plus précisément dans cette étude aux cellules souches présentes dans la moelle osseuse adulte : les CSH qui sont des cellules multipotentes, c'est-à-dire déjà engagées dans une voie tissulaire spécifique et les cellules souches mésenchymateuses.

3. LES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES

L'existence de cellules souches multipotentes à grande capacité prolifération localisée dans la moelle osseuse a été suggérée par des expériences réalisées chez la souris. Ces travaux ont démontré que la restauration hématopoïétique d'une souris irradiée à dose létale et recevant la moelle d'une souris syngénique comporte une étape constante de développement de colonies cellulaires dans la rate, chacune de ces colonies provenant d'une cellules dite *CFU in the spleen* (CFU-S), avec une relation directe entre le nombre de cellules médullaires injectées et le nombre de CFU-S obtenues (Till and Mac Culloch, 1961).

Par définition une CSH doit répondre à trois caractéristiques :

- très haute capacité d'auto renouvellement
- capacité de se différencier pour donner naissance à l'ensemble des lignées myéloïdes et lymphoïdes
- capacité d'assurer la reconstitution hématopoïétique à long terme d'un animal irradié

Les CSH sont en très faible quantité dans la moelle osseuse par rapport aux précurseurs différenciés qui représentent 99 % des cellules médullaires, c'est pourquoi des tests biologiques simples *in vivo* et *in vitro* (cruciaux chez l'homme) ont été mis en œuvre pour les mettre en évidence et les quantifier.

3.1. TESTS FONCTIONNELS

Il s'agit de tests *in vitro* et *in vivo* fondés sur les propriétés biologiques et fonctionnelles des CSH qui peuvent être classés en deux groupes de méthodes.

3.1.1. Tests fonctionnels *in vitro*

Deux types de tests *in vitro* ont été développés. Les uns clonaux sont effectués en milieu liquide et sont directement inspirés des tests utilisés pour caractériser les progéniteurs hématopoïétiques (PH) clonogéniques déterminés.

Les autres sont basés sur le concept que les cellules les plus primitives ne clonent pas directement et sont des pré-CFU. Ces cultures à long terme comprennent une incubation initiale avec un équivalent de stroma qui permet la différenciation de ces cellules en progéniteurs, puis une deuxième phase de clonage en milieu semi-solide.

- Les cultures à long terme (CLT) en un temps : ce système permet d'étudier la différenciation des CSH au contact de cellules stromales reproduisant certaines conditions retrouvées *in vivo*. Les conditions de la culture, décrite par Dexter (voir Chapitre 4.4.) (Dexter *et al.*, 1977), favorisent l'individualisation d'un compartiment de cellules hématopoïétiques non adhérentes d'un compartiment de cellules adhérentes représentant le microenvironnement. La couche adhérente, constituée de cellules stromales secrétant une MEC, se forme progressivement au fond du flacon de culture et devient confluente au bout de 2 à 4 semaines. La production de CFU-GM, évaluée chaque semaine dans le surnageant, peut-être observée pendant plusieurs mois. Cette technique de culture à long terme en un temps ne permet pas de quantifier précisément les cellules souches primitives par la seule évaluation du nombre de progéniteurs qu'elles produisent chaque semaine dans le surnageant. Le recours à des techniques de CLT en deux temps ou en dilution limite sur une couche stromale préformée d'origine allogénique ou xénogénique permettent cette quantification.

- *Long-Term Culture-Initiating Cells* (LTC-IC) et les *Extended-LTC-IC* (ELTC-IC) : Il s'agit de cultures à long terme des CSH effectuées en présence d'une couche stromale médullaire et d'un milieu liquide approprié. Dans ces conditions dites de Dexter, les CSH sont capables de proliférer pendant plusieurs semaines et de générer des CFU. Ces cultures à long terme ont permis d'identifier et de quantifier des cellules hématopoïétiques primitives appelées après ensemencement en dilution limite. Les LTC-IC peuvent être quantifiées en estimant la proportion de puits présentant une pousse de CFU au bout de 5 à 8 semaines et 10 semaines de culture (Sutherland *et al.*, 1989; Hao *et al.*, 1995).

- *Cobblestone Area-Forming Cell* (CAFC) : Dans cette technique, les progéniteurs produits dans le surnageant de CLT proviennent de cellules souches plus primitives présentes dans la couche adhérente (Coulombel *et al.*, 1983). Des foyers d'hématopoïèse sont identifiables morphologiquement dans la couche adhérente sous la forme « d'aires pavées » ou « cobblestone areas » (Ploemacher *et al.*, 1989). En dilution limite, les « cobblestone areas » peuvent être quantifiées directement (Ploemacher *et al.*, 1991). Ces aires sont formées à partir de cellules souches appelées CAFC. Les CAFC d'apparition tardive (à partir de 4 semaines de culture) dérivent de cellules souches primitives ayant une capacité de reconstitution à long terme (Breems *et al.*, 1994).

3.1.2. Tests fonctionnels *in vivo*

Il s'agit de tests permettant d'évaluer la reconstitution hématopoïétique *in vivo* après transplantation de cellules hématopoïétiques chez l'animal afin de démontrer la présence de cellules souches dans l'échantillon cellulaire. Ce sont les seuls tests qui permettent d'identifier formellement la présence d'authentiques CSH. L'évaluation du potentiel de reconstitution de l'hématopoïèse des cellules souches humaines a nécessité le développement de systèmes de transplantation xénogénique dans lesquels les réactions immunitaires sont abolies. La souche de souris immunodéficientes la plus utilisée comme hôte de cellules souches humaines est la souris Non Obese Diabetic Severe Combine Immuno-Deficiency (NOD-SCID) qui présente une lymphopénie sévère (ni lymphocytes T, ni lymphocytes B, ni lymphocytes *Natural Killer* (NK)) et un déficit en macrophages et en complément sérique. Ces souris ne présentent donc pas de réponse immunitaire cellulaire et humorale. L'approche expérimentale consiste à injecter par voie intraveineuse des cellules hématopoïétiques humaines directement dans la souris NOD-SCID, irradiée à dose létale pour détruire l'hématopoïèse de l'animal. Plusieurs mois après la greffe, la présence de cellules humaines myéloïdes et lymphoïdes B est recherchée dans la moelle osseuse et celle des cellules lymphoïdes T dans le thymus.

3.2. ISOLEMENT DES CELLULES HEMATOPOÏETIQUES PRIMITIVES ET CARACTERISATION PHENOTYPIQUE

Les progéniteurs et surtout les CSH étant extrêmement minoritaires, il est donc important de les purifier pour comprendre leur hétérogénéité et étudier leur régulation avec précision. La caractérisation de nombreux antigènes, aussi bien chez l'homme que chez la souris, a permis d'utiliser des techniques de purification très reproductibles. Ces antigènes de surface sont actuellement répertoriés par leur appartenance à un cluster de différenciation (CD). L'utilisation de ces sondes immunologiques couplées à des techniques de sélection comme le tri cellulaire par cytomètre en flux (Sieff *et al.*, 1982), le panning immunologique (Wysocki and Sato, 1978), les billes magnétiques (Spangrude *et al.*, 1988) ou la cytotoxicité (Sparrow and Williams, 1986) a permis de déterminer la présence d'un certain nombre d'antigènes à la surface des PH *(Figure 3)*.

Chez la souris, le travail de l'équipe de Weissman a permis d'isoler une population enrichie en cellules primitives (Spangrude *et al.*, 1988). Ces cellules sont Lin^-, c'est-à-dire négatives pour des marqueurs présumés spécifiques de lignées (B220, Mac1, Gr1, CD4 et

CD8), faiblement positives pour Thy-1 et positives avec l'anticorps Sca reconnaissant l'antigène Ly-6A/E. Ces cellules Lin^- Sca^+ $Thy\text{-}1^{faible}$ représentent une population cellulaire très enrichie, voire quasiment pure en cellules multipotentes.

Chez l'homme, le marqueur de surface le plus utilisé pour la purification des cellules primitives est la sialomucine CD34 ; en effet, de nombreux travaux ont montré que son expression était d'autant plus forte que les CSH étaient primitives (Andrews *et al.*, 1986). Cependant la population $CD34^+$ est hétérogène et contient aussi des progéniteurs déjà engagés dans une voie de différenciation (Civin *et al.*, 1990). Il a donc été nécessaire d'associer l'expression de CD34 à d'autres marqueurs positifs ou négatifs pour identifier plus précisément les CSH. L'importance du marqueur CD38 a été démontrée par des expériences de greffes après tri cellulaire. La fraction $CD34^+$ $CD38^-$ est enrichie en *SCID Repopulating Cell* (SRC) alors que les cellules $CD34^+$ $CD38^+$ ne permettent qu'une repopulation à court terme (Bhatia *et al.*, 1997). De même, la fraction $CD34^+$ n'exprimant pas les antigènes d'histocompatibilité de classe II (Human Leucocyte Antigen-D Related$^-$ ($HLA\text{-}DR^-$)) contient plus de LTC-IC (Brandt *et al.*, 1988). Le CD133 ou prominine (AC133) est exprimé par la majorité des cellules $CD34^+$ (Yin *et al.*, 1997) et pourrait permettre d'identifier une population précoce de cellules souches (Bhatia *et al.*, 1997). Enfin, l'absence d'expression de l'antigène (Ag) CD33 permet de distinguer une population enrichie en LTC-IC ($CD34^+$ $CD33^-$) (Andrews *et al.*, 1989).

D'autres molécules membranaires, comme des récepteurs aux cytokines, peuvent définir des sous populations de CSH. Le *Kinase Domain containing Receptor* (KDR) ou *Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor 2* (VEGF-R2; CD309) a été décrit comme marqueur de CSH puisque la population $CD34^+$ KDR^+ reconstitue à long terme l'hématopoïèse de souris NOD-SCID (Ziegler *et al.*, 1999), et comprendrait des progéniteurs bipotents hématopoïétiques et endothéliaux (Peschle *et al.*, 2001). Le c-Kit (ou CD117), récepteur du *Stem Cell Factor* (SCF), est exprimé par une grande partie des cellules $CD34^+$ $CD38^-$ mais la population la plus primitive exprime probablement faiblement c-Kit. Ainsi la fraction $CD34^+$ $c\text{-}Kit^{low}$ présente une plus grande fréquence de CAFC que la population $CD34^+$ $c\text{-}Kit^{high}$ et une meilleure reconstitution médullaire (Gunji *et al.*, 1992; Kawashima *et al.*, 1996). Le récepteur de la thrombopoïétine (TPO-R, CD110 ou c-Mpl) semble également jouer un rôle dans l'hématopoïèse primitive : les cellules médullaires $CD34^+$ $CD38^-$ $c\text{-}Mpl^+$ ont une capacité de repopulation supérieure à celle de la population $CD34^+$ $CD38^-$ $c\text{-}Mpl^-$ (Solar *et al.*, 1998).

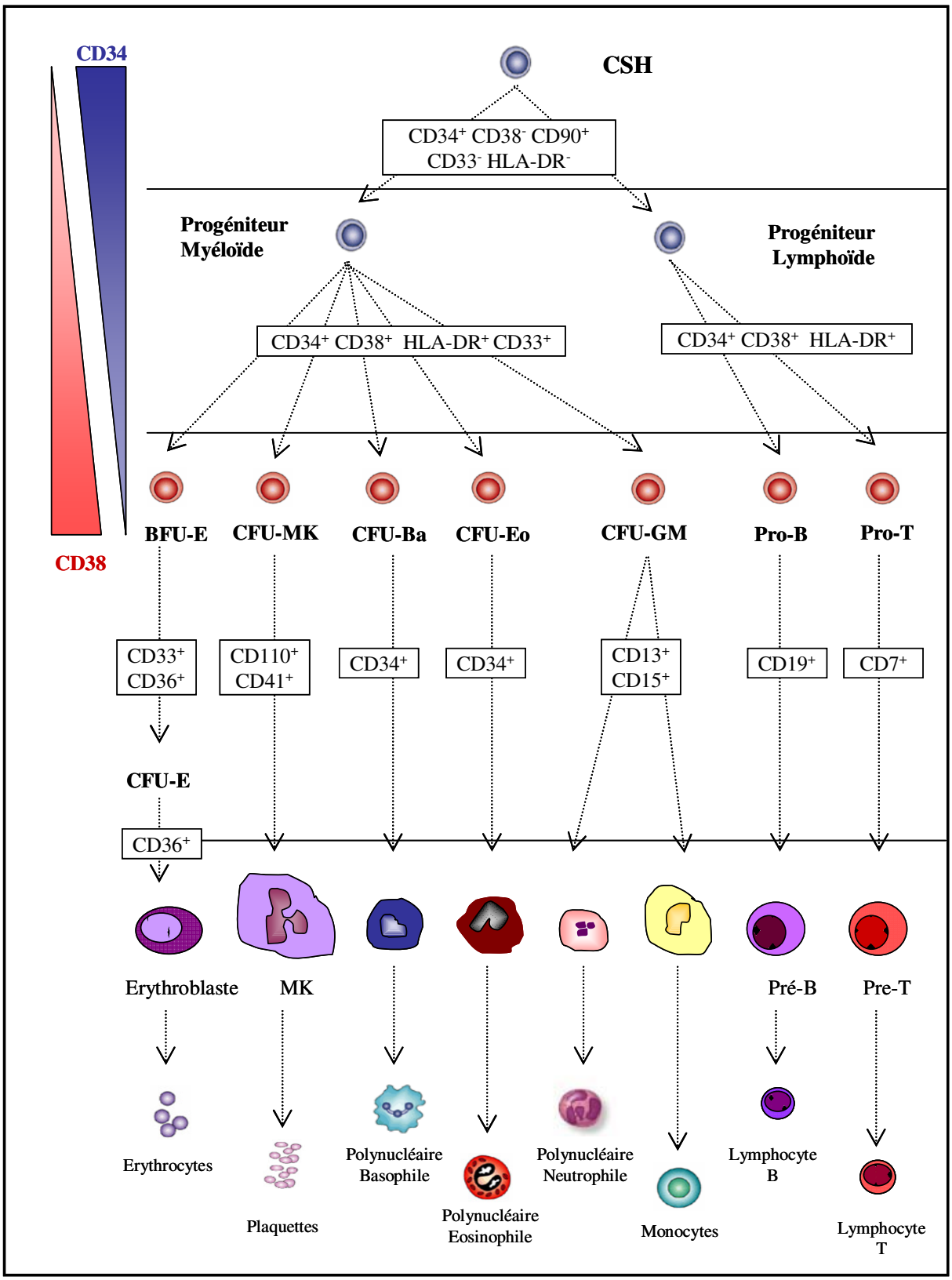


Figure 3 : Phénotype des différentes cellules hématopoïétiques lors de la différenciation.

L'expression des antigènes membranaires est détectée le plus souvent par un immunophénotypage par cytométrie en flux

Plusieurs équipes ont retrouvé une activité de la thrombopoïétine sur les progéniteurs et les CSH, avec une augmentation de la fréquence des LTC-IC et du nombre et de la taille des CAFC (Lane *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 1997). La thrombopoïétine (TPO) pourrait aussi inhiber l'apoptose des cellules primitives (Cui *et al.*, 1997).

Néanmoins, bien que ces marqueurs soient utilisés pour l'identification, la numération et la purification des cellules souches humaines ou murines, l'analyse de leurs fonctions et de leurs profils d'expression n'a pas permis d'identifier une molécule dont la présence serait strictement caractéristique d'une cellule souche, comme par exemple l'hémoglobine pour les globules rouges. Ainsi la relation entre l'expression de l'antigène CD34 et l'assimilation à une cellule souche n'est pas forcement évidente. En effet, alors qu'il a été bien établi que les cellules $CD34^+$ médullaires de primates avaient la capacité de reconstituer l'hématopoïèse de primates irradiés (Berenson *et al.*, 1988), d'autres études ont montré que les cellules $CD34^-$ présentaient une capacité de repeuplement chez la souris (Osawa *et al.*, 1996) comme chez l'homme (Zanjani *et al.*, 1998). Cependant, chez la souris, les cellules $CD34^+/Lin^-$ seraient responsable de la reconstitution à court et long terme de moelle de souris irradiées à dose létale alors que les cellules $CD34^-/Lin^-$ ne repeupleraient la moelle qu'à long terme (Donnelly *et al.*, 1999). Ces résultats controversés semblent être apparemment résolus par une étude montrant que l'antigène CD34 serait un marqueur des cellules souches activées et/ou en cycle, alors que les cellules souches $CD34^-$ seraient dans un état « quiescent » (Sato *et al.*, 1999)**.**

La majorité des CSH étant quiescente, en phase G0 ou G1 du cycle cellulaire (Uchida *et al.*, 1997), une méthode pour les identifier consiste à évaluer leur résistance à incorporer des colorants vitaux fluorescents comme la Rhodamine 123 (Rho123) et le Hoechst 33342. La Rho123, qui témoigne de l'activité métabolique cellulaire des mitochondries, et le Hoechst 33342, qui s'intercale dans l'ADN, permettent d'identifier les cellules en cycle ou au métabolisme actif. Ils sont donc exclus par les CSH (Bradley *et al.*, 1980; Fleming *et al.*, 1993). Cette stratégie a permis de mettre en évidence une population de cellules de la MO de souris, appelée *Side Population* (SP), caractérisées par leur résistance au Hoechst 33342 et capables de reconstituer à long terme l'hématopoïèse *in vivo* (Goodell *et al.*, 1996). Enfin, une autre propriété fonctionnelle des CSH utile à leur isolement est la présence de l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH), une enzyme intervenant dans le métabolisme des rétinoïdes. L'ALDH est capable de dégrader les agents alkylants tels que le cyclophosphamide et participe ainsi à la résistance des CSH à ces toxiques (Hess *et al.*, 2004). Elle est active dans certaines cellules $CD34^+$ (Kastan *et al.*, 1990) et définit une population capable de reconstitution à long terme (Hess *et al.*, 2006).

3.3. PHYSIOLOGIE DES CSH : BALANCE ENTRE AUTORENOUVELLEMENT ET DIFFERENCIATION

Trois grandes théories ont été avancées pour tenter d'expliquer les phénomènes les plus cruciaux, aussi bien précoces que tardifs, de l'hématopoïèse : mécanismes impliqués dans la régulation de l'auto-renouvellement ou, inversement, dans la détermination des cellules souches ou ceux impliqués dans l'expression coordonnée des protéines spécifiques d'une lignée cellulaire.

3.3.1. La théorie déterministe

Cette théorie sous-entend qu'il existe au sein de l'hématopoïèse des compartiments de cellules souches et qu'au cours de la différenciation cellulaire et de son « vieillissement », une cellule souche va parcourir ces divers compartiments de manière immuable avant de donner naissance à des cellules matures.

Ainsi, le premier compartiment serait celui d'une cellule souche très primitive à haut pouvoir d'auto-renouvellement capable de se différencier vers toutes les lignées myéloïdes et lymphoïdes. Elle ne correspond ni à la CFU-S classique ni aux CFU-Mix, mais pourrait être l'équivalent de la cellule qui donne des colonies composées de blastes *in vitro* (Nakahata *et al.*, 1982; Nakahata and Ogawa, 1982). Cette cellule au cours de chaque mitose va « vieillir » pour perdre progressivement à la fois une partie de ses capacités de multipotentialité et d'auto-renouvellement (Harrison *et al.*, 1978). La restriction de ses capacités à donner différentes lignées se ferait toujours dans le même ordre (Johnson and Metcalf, 1977).

En fait, la plupart des données issues des expériences *in vitro* et *in vivo* concernant la détermination des cellules souches multipotentes ne sont pas expliquées par cette théorie. En effet, il semble que presque toutes les combinaisons de restriction de potentialité existent au niveau des progéniteurs sans association préférentielle entre les lignées (Nakahata *et al.*, 1982; Nakahata and Ogawa, 1982; Leary *et al.*, 1984; Lemischka *et al.*, 1986).

3.3.2. La théorie instructive

La théorie instructive attribue un rôle fondamental au microenvironnement cellulaire et moléculaire dans la détermination et l'auto-renouvellement des cellules souches multipotentes *(Figure 4A)*. Deux cellules avec des fonctions équivalentes qui ont la capacité de s'engager

vers deux lignées potentielles (A et B) reçoivent des signaux extrinsèques différents, auxquelles elles répondent en s'engageant vers la lignée spécifiée par les signaux.

Ainsi, les cellules souches multipotentes pourraient avoir des récepteurs aux différents facteurs de croissance et la liaison d'un facteur de croissance spécifique d'une lignée déterminerait irréversiblement la cellule souche vers une seule lignée (Van Zant and Goldwasser, 1977; Van Zant and Goldwasser, 1979).

Une alternative au rôle des facteurs de croissance dans la détermination des différentes lignées hématopoïétiques est apportée par la théorie stochastique.

3.3.3. La théorie stochastique

Selon cette théorie, les facteurs de croissance joueraient un rôle dans la survie et dans la prolifération des cellules engagées mais pas dans la détermination de la lignée.

La théorie stochastique sous-entend que les phénomènes clefs de l'hématopoïèse sont apparemment aléatoires et sont intrinsèquement d'origine cellulaire *(Figure 4B)*. L'engagement vers une lignée hématopoïétique donnée est indépendant de signaux extrinsèques. Une cellule à double potentialité s'engage vers la lignée A ou la lignée B de façon aléatoire. À réception d'un signal de cytokines affilées à la lignée A, les cellules de type A survivent, prolifèrent et maturent. Les cellules de type B n'ont pas la capacité de répondre aux signaux de type A et meurent par apoptose.

Ainsi, l'équilibre entre renouvellement et détermination serait constamment déterminé avec la même probabilité autour de 0,50 car l'hématopoïèse doit rester stable (Nakahata *et al.*, 1982). De même, la détermination vers une lignée ou une autre serait également aléatoire avec pour corollaire tous les types possibles de cellules souches multipotentes. Ensuite, le programme de différenciation est entièrement programmé au niveau de la cellule et le rôle du facteur de croissance hématopoïétique serait purement permissif, permettant la survie des cellules (Suda *et al.*, 1985).

C'est l'équipe de Till, grâce à ses travaux réalisés chez la souris, qui a proposé pour la première fois que l'engagement des CSH dans une lignée hématopoïétique donnée était contrôlé de façon stochastique. En effet, les colonies cellulaires issues de CFU-S (provenant de la moelle d'une souris syngénique) développées dans la rate d'une souris irradiée à dose létale, contienent des cellules sanguines différenciées, mais aussi une quantité très faible de cellules indifférenciées ayant conservé des potentialités de type CFU-S.

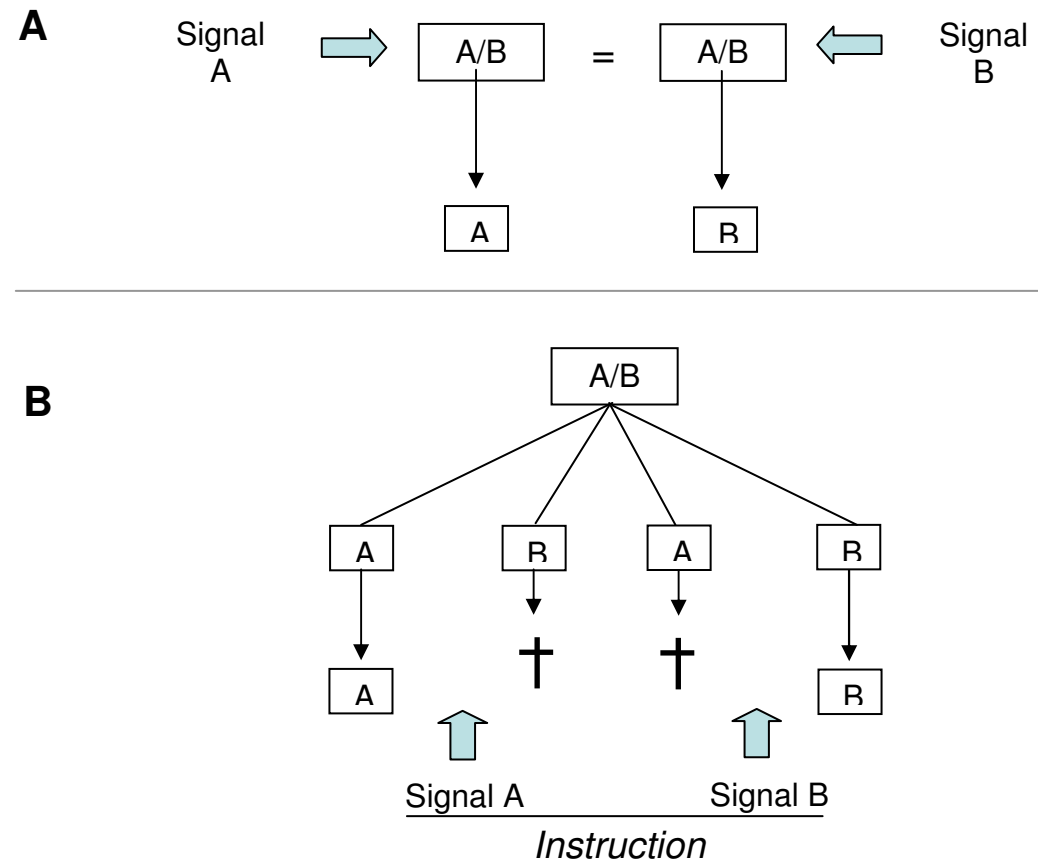


Figure 4 : Les différentes théories de la régulation de l'hématopoïèse

(Adapté de May and Enver 2001)

Ces CFU-S proviendraient probablement de l'auto-renouvellement de la CFU-S à l'origine des colonies présentes dans la rate (Till *et al.*, 1964). Le nombre de CFU-S par colonie étant extrêmement variable, ceci laissa suggérer que la décision entre renouvellement *versus* différenciation pour la CFU-S était aléatoire, permettant à Till et McCulloch de proposer la théorie stochastique.

Les expériences de transfert et de culture de cellules filles obtenues *in vitro* à partir de colonies blastiques ont ensuite apporté d'autres arguments en faveur d'un mécanisme aléatoire dans la détermination cellulaire (Nakahata *et al.*, 1982; Leary *et al.*, 1984; Suda *et al.*, 1984).

La plupart des données mettant en avant la théorie stochastique pour expliquer la différenciation des cellules sanguines sont apparues avant l'identification et le clonage moléculaire de la large gamme des cytokines hématopoïétiques et de leurs récepteurs. Ces données ne pouvaient pas exclure que les profils apparemment stochastiques ou aléatoires de l'engagement vers une lignée hématopoïétique donnée soient significativement influencés par des facteurs extrinsèques. Les données actuelles sur les cytokines et leurs récepteurs ont permis de proposer des modèles hybrides combinant des aspects des deux hypothèses instructives et stochastiques *(Figure 4C)*.

4. LE MICROENVIRONNEMENT MEDULLAIRE CELLULAIRE

Le microenvironnement médullaire peut être défini comme l'ensemble des constituants non hématopoïétiques de la moelle qui participe au contrôle de l'hématopoïèse *in situ*. Il est donc retrouvé dans les sites médullaires où s'effectue l'hématopoïèse, c'est-à-dire dans les os plats chez l'homme adulte. Les composants du microenvironnement hématopoïétique sont des cellules, des molécules solubles et des molécules insolubles constituants la matrice extracellulaire. Parmi les cellules du microenvironnement, les cellules stromales en sont la composante la plus importante et sont capables de produire la majeure partie des autres constituants.

4.1. STRUCTURE DE LA MOELLE OSSEUSE HUMAINE

La structure des sites hématopoïétiques médullaires peut être déterminée grâce à des biopsies osseuses réalisées au niveau des crêtes iliaques. Les échantillons prélevés sont décalcifiés, fixés puis colorés par des méthodes histochimiques permettant de mettre en

évidence les différents éléments médullaires. L'étude de ces biopsies montre que les cellules hématopoïétiques rondes sont localisées dans des logettes situées dans les trabécules osseux *(Figure 5)*.

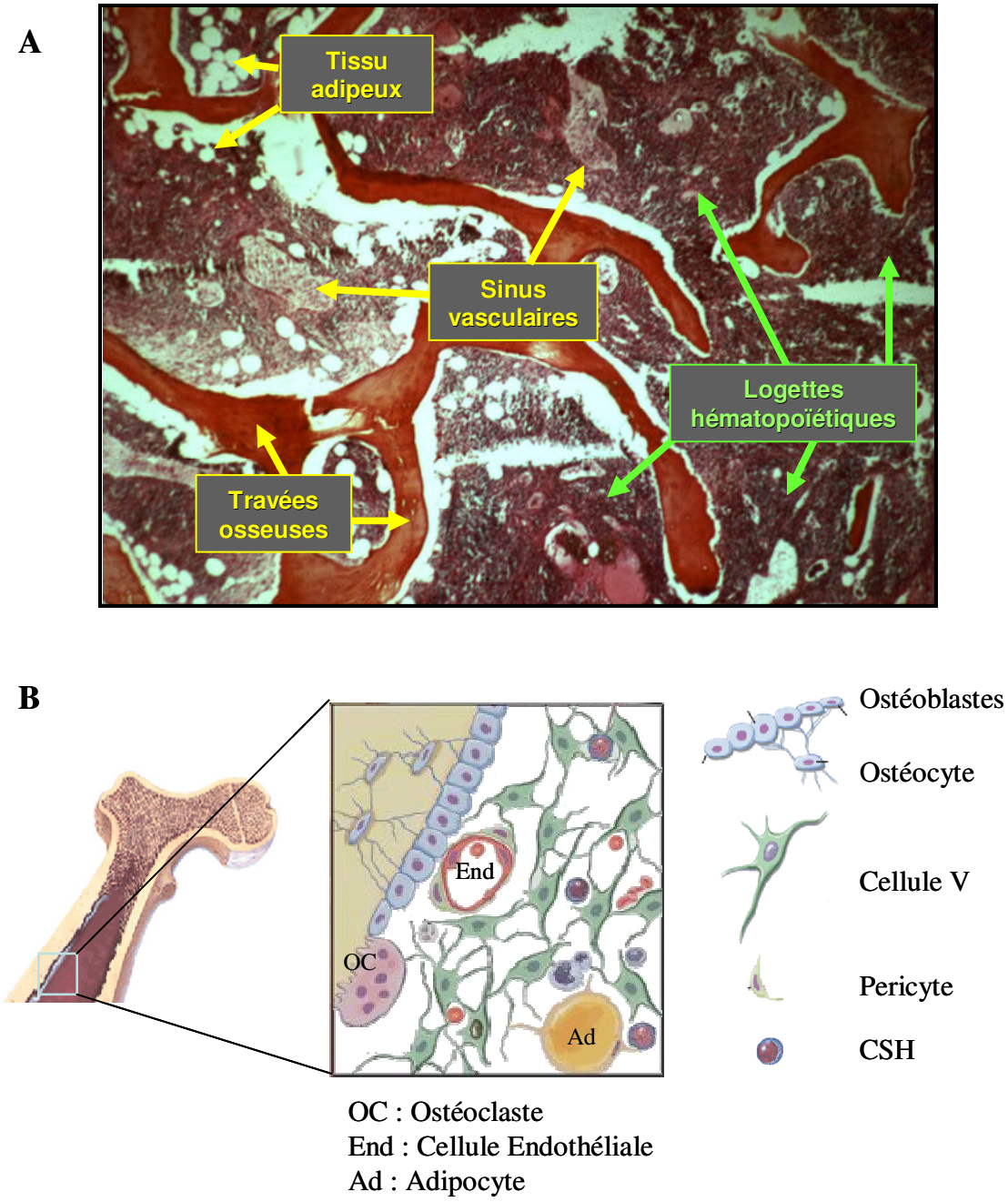
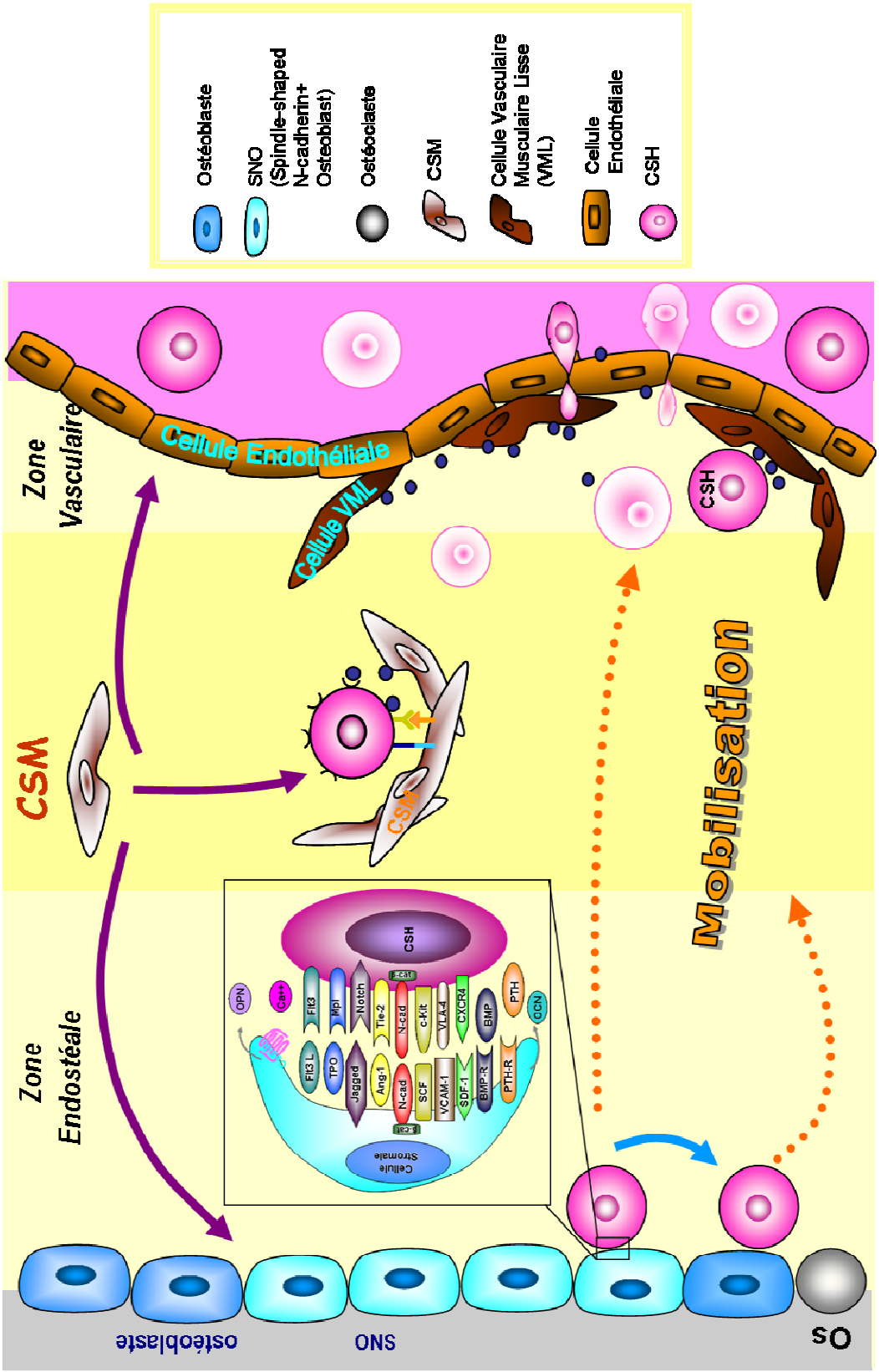


Figure 5 : Structure de la moelle osseuse.

(A) Biopsie médullaire montrant le tissu adipeux en blanc, les travées osseuses en rouge et les logettes hématopoïétiques. **(B)** Schéma de l'organisation médullaire représentant les différentes cellules du microenvironnement (adapté du site du *National Institute of Health, http://stemcells.nih.gov*).

Ces logettes sont également constituées de grosses cellules chargées de graisse, les adipocytes, de cellules recouvrant les trabécules osseux, les cellules endostéales, ainsi que de structures vasculaires tels que des artérioles, capillaires, sinus et veinules (Burckardt, 1971). C'est au niveau des sinus que s'effectue le trafic des cellules entre le compartiment hématopoïétique et la circulation sanguine. Les cellules vasculaires comportent les cellules endothéliales qui limitent la lumière vasculaire et les cellules abluminales qui regroupent les cellules vasculaires musculaires lisses, péricytes péricapillaires et cellules myoïdes parasinusales et intrabéculaires. Les cellules myoïdes présentent des prolongements cytoplasmiques et sont capables de synthétiser des fibres réticulaires argentophiles, permettant une association physique et étroite avec les cellules hématopoïétiques et suggérant leur implication dans la régulation de l'hématopoïèse (Galmiche *et al.*, 1993). Les cellules abluminales sont la principale source de cellules de type fibroblastique dont l'importance dans le soutien de l'hématopoïèse à long terme sera montrée ultérieurement. Les cellules endothéliales qui bordent les sinus veineux forment quant à elles une barrière entre la logette hématopoïétique et le sang périphérique. Elles jouent un rôle crucial dans les échanges cellulaires entre la niche hématopoïétique et la circulation sanguine, que ce soit par la mise en circulation des cellules hématopoïétiques matures ou la domiciliation médullaire des CSH lors de greffes (Tavassoli and Hardy, 1990).

Une approche permettant l'étude de la distribution spatiale des CSH et des progéniteurs dans la MO de souris non irradiées (pour éviter l'altération du microenvironnement) a montré que ces deux types cellulaires présentaient des localisations distinctes. Après injection de cellules hématopoïétiques marquées à la *Carboxy Fluoresceine diacetate Succinimidyl Ester* (CFSE), les CSH étaient retrouvées dans la région endostéale tandis que les cellules filles migraient vers la région centrale de la cavité osseuse au fur et à mesure de leur maturation (Nilsson *et al.*, 1997; Nilsson *et al.*, 2001). Cette observation corrobore le modèle de division asymétrique dans lequel la descendance des CSH s'éloigne de la niche mère au cours des divisions successives pour entrer dans un environnement plus inducteur de la différenciation (Spradling *et al.*, 2001). Comme le montre la *Figure 6*, deux types de niche hématopoïétique pourrait être distinguer dans la MO, une niche endostéale et une niche vasculaire, dont la composition et leur rôle dans le soutien de l'hématopoïèse seraient distinctes. Cette dichotomie un peu schématique est actuellement discutée (voir Chapitre 5.4).



<u>Figure 6 :</u> Les niches des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle.

Dans la niche endostéale, les interactions avec les ostéoblastes favorisent le maintien de la quiescence des CSH. La niche vasculaire contrôle la migration des cellules vers le sang lors de la domiciliation ou de la mobilisation. CSH: cellule souche hématopoïétique, CSM: cellule souche mésenchymateuse.

4.2. ROLE FONCTIONNEL DES CELLULES DU MICROENVIRONNEMENT MEDULLAIRE IN VIVO

Les premières données fondamentales sur le rôle fonctionnel du microenvironnement chez l'animal ont été publiées dans les années 1970 par Friedenstein. Par culture de moelle de cobaye, il observe le développement de colonies de cellules adhérentes « fibroblastiques » appelées *Colony Forming Unit Fibroblast* (CFU-F). Lorsque ces colonies sont implantées sous la capsule rénale d'un animal receveur, un tiers d'entre elles donne du tissu fibreux et les deux autres tiers forment de l'os ou de la moelle osseuse. L'analyse chimérique montre que les cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse néoformée proviennent du receveur. Ces résultats suggèrent que les cellules fibroblastiques du donneur sont capables de recruter des CSH circulantes du receveur et d'induire leur développement (Friedenstein *et al.*, 1970). En parallèle, l'hypothèse de Till et McCulloch sur l'existence d'un microenvironnement « inductif de l'hématopoïèse » (Till and Mac Culloch, 1961) a été vérifiée par des expériences chez la souris. Ainsi, lorsque des cellules hématopoïétiques multipotentes sont injectées à des animaux irradiés à dose létale, elles ne forment des colonies que dans la moelle osseuse et la rate, organes hématopoïétiques chez la souris. De plus, les colonies présentes dans la moelle sont majoritairement granulocytaires alors que les colonies dans la rate sont majoritairement érythrocytaires.

Lorsque des fragments médullaires sont greffés sous la capsule splénique de souris irradiées à dose létale, les nodules spléniques des zones de jonction sont composés d'érythrocytes dans le tissu splénique et de granulocytes dans le tissu médullaire (Wolf and Trentin, 1968). Ces données suggèrent que, chez la souris, le microenvironnement splénique favorise l'érythropoïèse alors que le microenvironnement médullaire favorise la granulopoïèse.

Ainsi, la différenciation hématopoïétique pourrait être influencée par l'origine tissulaire du microenvironnement.

4.3. LE MICROENVIRONNEMENT MEDULLAIRE CELLULAIRE IN VITRO

Les techniques de culture *in vitro* ont permis de décomposer le microenvironnement hématopoïétique et de mieux comprendre les relations entre microenvironnement et CSH.

En 1976, l'équipe de Dexter présente pour la première fois un modèle de culture à long terme (*Long Term Bone Marrow Culture*, LTBMC) de moelle murine, qui fut validé un an

plus tard par la même équipe, pour étudier et rendre compte *in vitro* du microenvironnement hématopoïétique *in vivo* (Dexter *et al.*, 1977; Dexter and Moore, 1977). Dans ce modèle, la production de CFU pendant plusieurs mois est possible à condition que se développe une couche adhérente de cellules stromales médullaires. Dans ce système de co-culture, les cellules hématopoïétiques retrouvées sont, soit groupées en amas à la surface des cellules stromales (cellules réfringentes), soit sous les cellules stromales (cellules pavimenteuses ou *cobblestone areas*). Ploemacher, et plus récemment Eaves, ont montré qu'il existait une relation entre le niveau de maturité des cellules hématopoïétiques primitives mises en culture (évalué *in vivo* par leur capacité de repeuplement compétitive à long terme) et le délai d'apparition des colonies (évalué *in vitro*) ceci suggérant que ce système de culture *in vitro* pouvait donner des informations sur la hiérarchie des cellules souches murines (Ploemacher *et al.*, 1991; Lemieux *et al.*, 1995).

Le modèle de Dexter fut adapté à l'homme en premier par Kaplan (Gartner and Kaplan, 1980) ce qui a permis de caractériser précisément les cellules du microenvironnement et d'identifier les médiateurs du contrôle de l'hématopoïèse.

4.3.1. Les macrophages

Les macrophages présents dans la couche adhérente sont des cellules ovoïdes de 20 à 25 µm souvent isolées. Ils expriment des antigènes spécifiques de la lignée granulo-monocytaire tel que le CD14, mais également un antigène spécifique des cellules hématopoïétiques, le CD45. Ce sont les seules cellules d'origine hématopoïétique de la couche adhérente en culture. Souvent, la notion de microenvironnement hématopoïétique est restreinte aux éléments d'origine non hématopoïétique, les macrophages en sont donc exclus. Pour éliminer les macrophages de la culture à long terme, il faut repiquer la couche adhérente au minimum une fois après action de la trypsine.

4.3.2. Les adipocytes

La présence d'adipocytes médullaires est inversement reliée à l'activité hématopoïétique de la moelle : ils sont absents au cours du développement fœtal, rares dans la moelle des nouveau-nés et leur proportion croît avec l'âge. En effet, avec le vieillissement, les cellules adipeuses présentes dans l'espace médullaire deviennent majoritaires par rapport aux éléments hématopoïétiques (Hartsock *et al.*, 1965). Au niveau morphologique, les adipocytes sont reconnaissables par la présence de vacuoles lipidiques intra cytoplasmiques. Tout comme

leurs homologues extra-médullaires, ils possèdent des propriétés sécrétrices et endocrines, mais ils présentent comme particularité une activité estérasique et une sécrétion importante de leptine qui joue un rôle dans la différenciation érythrocytaire et granulo-monocytaire (Laharrague *et al.*, 1999). Les adipocytes médullaires constitueraient ainsi des réserves de précurseurs métaboliques ou d'énergie nécessaires à la prolifération et à la différenciation des précurseurs hématopoïétiques. Cependant, bien que la présence d'adipocytes est associée chez la souris à un meilleur maintien *in vitro* des progéniteurs (Greenberger, 1978), ceci n'a pas été retrouvé chez l'homme (Touw and Lowenberg, 1983; Corre *et al.*, 2004). Les adipocytes pourraient favoriser la différenciation terminale myéloïde et lymphoïde (et non le soutien des progéniteurs) (Corre *et al.*, 2004), ce qui pourrait être en rapport avec l'activité stimulatrice de la leptine rapportée sur l'hématopoïèse (Laharrague *et al.*, 1999).

4.3.3. Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont rarement observés en culture à long terme *in vitro*, alors qu'au sein de la moelle osseuse, ils sont en contact étroit avec les cellules souches hématopoïétiques. Ils interviennent de concert avec les précurseurs hématopoïétiques dans la résorption osseuse en induisant l'expansion, la maturation et l'activation des précurseurs ostéoclastiques. Pour cela, les ostéoblastes mettent en jeux des relations avec ces deux partenaires par l'intermédiaire de molécules d'adhérence telles que les intégrines (Taichman and Emerson, 1998). Les ostéoblastes seraient en contact étroit avec les cellules souches hématopoïétiques pour former ce qui est appellé la niche ostéogénique. À ce jour, les arguments en faveur du rôle des ostéoblastes dans la régulation de l'hématopoïèse, et plus particulièrement dans la survie et la mise en quiescence des CSH, reposent sur l'évaluation de leur sécrétion de cytokines pouvant activer (GM-CSF, G-CSF, IL-1β, IL-6, *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), *Tumor Necrosis Factor* α (TNFα), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)) ou inhiber (*Tumor Growth Factor* β, TGFβ) l'hématopoïèse. Enfin, il faut rappeler la localisation préférentiellement endostéale des cellules hématopoïétiques les plus primitives. Cependant la fonction hématopoïétique des ostéoblastes est actuellement discutée (Kiel *et al.*, 2007; Sacchetti *et al.*, 2007; Lymperi *et al.*, 2008).

4.3.4. Les cellules stromales

Les cellules stromales, au sens strict du terme, sont des cellules de nature conjonctive qui suivent une voie de différenciation vasculaire lisse (Galmiche *et al.*, 1993). Ces cellules

expriment la vimentine, la fibronectine EDa+, les laminines β1 et β2, les collagènes I, III et IV, la tropo-élastine, la tenascine, la thrombospondine et des glycosaminoglycanes correspondant à un profil de cellules V (héparane-, chondroïtine-, dermatane-sulfate et aide hyaluronique étant dans des proportions caractéristiques). Ces cellules expriment de nombreuses protéines spécifiques de l'appareil contractile des cellules musculaires lisses, telle que l'actine αSM, les chaînes lourdes de la myosine et la calponine (Charbord *et al.*, 1999). L'importance des cellules stromales à différenciation vasculaire musculaire lisse pour le soutien de l'hématopoïèse a été démontrée chez la souris et l'homme. Ces cellules, cultivées en présence de cellules $CD34^+/CD38^-$ permettent le maintien des CAFC (*Cobblestone area forming cell*) (Li *et al.*, 1995) et ceci en absence de cytokines exogènes. Les cellules stromales murines sont indispensables à l'expansion des précurseurs primitifs (Sitnicka *et al.*, 1995) et à l'établissement de la lymphopoïèse B en culture de Whitlock-Witte (Witte *et al.*, 1993; Funk *et al.*, 1994).

4.3.5. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales médullaires humaines sont des cellules microvasculaires particulières. Elles sont positives pour le facteur de von Willebrand, l'antigène CD31 et contiennent des corps de Weibel-Palade (Schweitzer *et al.*, 1995).

Dans le modèle de culture de type Dexter, seules de rares cellules endothéliales sont observées, ce qui suggère que le maintien de l'hématopoïèse à long terme ne dépende pas de ces cellules. Il est cependant clairement démontré que les cellules endothéliales soutiennent la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques (Rafii *et al.*, 1995; Jazwiec *et al.*, 1998). Les cellules endothéliales *in vivo* ne sont pas en contact permanent avec les cellules hématopoïétiques. Elles pourraient participer à la régulation de l'hématopoïèse en sécrétant des médiateurs solubles telles que des cytokines (Li *et al.*, 2000). Cependant, l'expression de cytokines hématopoïétiques n'a lieu que dans des conditions particulières, notamment après stimulation par des facteurs pro-inflammatoires, ce qui suggère que l'endothélium ne participe pas au soutien permanent de l'hématopoïèse mais plutôt à sa régulation de façon ponctuelle.

Par contre, les cellules endothéliales sont un élément de régulation déterminant pour le passage entre le compartiment médullaire et le compartiment sanguin. En effet, la libération des cellules matures de la moelle osseuse vers le sang pourrait être de type « trans-endothélial » à travers des fenêtres à diaphragme constituées par des petites zones proches des jonctions « inter-endothéliales » (d'environ 2 μm) où les membranes luminale et abluminale

de l'endothélium sont fusionnées (Bryon, 1998). Il s'agirait probablement du même mécanisme pour la libération des CSH dans le sang ainsi que pour leur retour dans la moelle osseuse, phénomène appelé « domiciliation ». Cette « domiciliation » ou « homing » des progéniteurs hématopoïétiques nécessitant le passage transendothélial des CSH, au niveau des sinus vers la niche hématopoïétique, serait induit par l'expression de molécules d'adhérence spécifiques de l'endothélium médullaire sous l'effet de chimiokines produites par le stroma médullaire (Imai *et al.*, 1999). Pour les cellules hématopoïétiques matures, comme les polynucléaires ou les monocytes, qui doivent franchir la barrière endothéliale pour passer de la circulation sanguine aux espaces extravasculaires, il s'agirait plutôt d'un passage « inter-endothélial ». Ce phénomène appelé « diapédèse » permettrait l'extravasation des leucocytes matures et n'a pas encore été montré pour les CSH (Bryon, 1998).

Du fait de la difficulté d'obtention des cellules endothéliales médullaires en culture à cause de la contamination par les myofibroblastes et de l'altération des fonctions cellulaires par des passages répétés des cultures, des lignées de cellules endothéliales ont été développées. C'est le cas de la lignée *Transformed Human Bone Marrow Endothelial Cells* (TrHBMEC), transformée par l'antigène T du virus SV40 (Schweitzer *et al.*, 1997) et de la lignée BMEC-like (Almeida-Porada and Ascensao, 1996). Ces lignées de cellules endothéliales immortalisées mais microvasculaires sont des modèles plus représentatifs de la physiologie que les *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVEC) pour étudier l'implication majeure des cellules endothéliales médullaires dans la transmigration des cellules hématopoïétiques (Mohle *et al.*, 1997b).

4.3.6. Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules plurinuclées responsables de la résorption osseuse. Ils ont une origine hématopoïétique et dérivent de la lignée monocytaire. Deux facteurs sont essentiels à l'ostéoclastogenèse, *Monocyte Colony-Stimulating Factor* (M-CSF) et *Receptor Activator of Nuclear factor Kappa beta Ligand* (RANK-L). Ces facteurs sont synthétisés par les cellules du microenvironnement osseux et se fixent sur les récepteurs respectifs c-fms et RANK, à la surface des préostéoclastes. Ceux-ci fusionnent pour donner des ostéoclastes multinuclés qui se polarisent au contact de l'os en formant une membrane plissée, siège de la résorption osseuse. L'ostéoprotégérine (OPG) agit comme un régulateur de l'ostéoclastogénèse en se fixant à RANK-L et en bloquant son effet sur RANK. La stimulation des ostéoclastes avec RANK-L induit la mobilisation des CSH par un mécanisme dépendant de MMP-9 et de la cathepsine G. Ces molécules vont dégrader le SDF-1, le SCF, et

l'ostéopontine au long de l'endosteum, aboutissant à la mobilisation des CSH (Kollet *et al.*, 2006).

Les études *in vitro* ne rendent pas bien compte de l'hétérogénéité du microenvironnement *in vivo* car les conditions de culture privilégient l'apparition de certaines populations cellulaires. Les cellules stromales sont en effet originaires d'un précurseur commun appelé cellule souche mésenchymateuse, qui se différencierait par défaut vers la voie V dans les conditions de culture standard (Charbord, 1998). Les caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses médullaires sont présentées dans le chapitre V.

5. LA NOTION DE CELLULE SOUCHE MESENCHYMATEUSE ET LA NICHE HEMATOPOÏETIQUE

5.1. DEFINITION

Friedenstein a été le premier à observer des cellules adhérentes de type fibroblastique dans les cultures de moelle osseuse, aussi appelées *Colony Forming Unit Fibroblast* (CFU-F), (Friedenstein *et al.*, 1970). Dans les années 60, l'intérêt principal de cette fraction « stromale » support d'adhérence autant que pourvoyeuse de cytokines, était d'offrir un environnement propice *in vitro* à l'autorenouvellement et à la différenciation de cellules souche hématopoïétique. L'analyse de leur propre potentiel était secondaire.

Le terme de « Cellule Souche Mésenchymateuse » a été donné par Arnold Caplan en 1991, à des cellules capables de donner naissance à la fois à des adipocytes, aux chondrocytes, aux ostéoblastes et aux muscles sarcomériques (Caplan, 1991; Prockop, 1997).

5.2. LOCALISATION

Les CSM sont présentes dans divers tissus de l'organisme adulte (Pountos and Giannoudis, 2005). Elles peuvent être isolées à partir de divers tissus incluant le cartilage (Alsalameh *et al.*, 2004), le périoste (Cuevas *et al.*, 2004), la membrane synoviale (De Bari *et al.*, 2001), le liquide synovial (Jones *et al.*, 2004), les muscles (Young *et al.*, 2001) et les tendons (Salingcarnboriboon *et al.*, 2003). Il a été également mis en évidence que le tissu fœtal (Hu *et al.*, 2003), le placenta, la veine ombilicale (Romanov *et al.*, 2003), les tissus adipeux (Dicker *et al.*, 2005) et le système vasculaire (Abedin *et al.*, 2004) contiennent des CSM. Cependant la

source la plus riche en CSM et la plus accessible aux chercheurs et aux cliniciens, est la moelle osseuse (Tuli *et al.*, 2003). C'est en 1976, que pour la première fois, des CSM ont été isolées à partir de moelle osseuse (Friedenstein *et al.*, 1976).

Une récente étude montre que les CSM dites natives caractérisées par leur phénotype PDGRRα^{+} Sca-1^{+} CD45^{-} TER119^{-} ont été retrouvées *in vivo* localisées dans une région périvasculaire (Morikawa *et al.*, 2009).

Cette large distribution tissulaire des CSH pourrait s'expliquer par leur proximité (voire leur identité) avec les cellules péricytaires (Crisan *et al.*, 2008) puisque ces cellules associées aux vaisseaux sont ubiquitaires. En effet elles expriment l'antigène CD146/MCAM mais aussi les marqueurs de CSM (CD73, CD90, CD105, ASMA) et sont multipotentes dans les lignées adipogénique, ostéogénique et chondrocytaire.

5.3. PROPRIETE BIOLOGIQUES

5.3.1. Différences entre CSH et CSM

Les CSH ont été définies (voir chapitre III) comme des cellules capables de produire les différents lignages hématopoïétiques, présentant des caractéristiques d'autorenouvellement, de multipotence, de prolifération et de régénération du système hématopoïétique. En ce qui concerne les caractéristiques des CSM, les critères définis par Potten et Loeffler, appliqués aux caractéristiques connues des cellules souches tissulaires, permettent d'une part, d'évaluer les propriétés des CSM et d'autre part, de les comparer aux CSH (Potten and Loeffler, 1990).

5.3.2. L'hétérogénéité de la population

Les CSM semblent être une population homogène. En 2004, Pittenger et Martin ont publié une liste des marqueurs de surface des CSM qui définissent leur phénotype *(Tableau I)*. Cependant le phénotype des CSM varie selon les conditions de culture. L'existence de deux types de populations différentes a été observée quand les CSM sont mises en culture à faible concentration (Colter *et al.*, 2001). Ainsi, l'étude à l'échelon clonal de la capacité de différenciation de CSM a montré qu'un tiers des clones isolés présentait la capacité de différenciation dans les trois lignages (adipogénique, ostéogénique et chondrocytaire) (Pittenger *et al.*, 1999; Muraglia *et al.*, 2000). À partir de ces observations, les CSM peuvent être définies en fait comme une population hétérogène, qui n'est pas associée à un modèle hiérarchique complètement établi.

Tableau I : Marqueurs de surface des CSM *d'après Deans et Moseley, 2000 et Pittenger et Martin, 2004*

	Marqueurs de surface des CSM	
	Présents	**Absents**
Molécules d'adhésion	CD9, CD29, CD44, CD49 (Integrines) a,b,c,e,f, CD54 (ICAM1), CD56, CD58, CD61, CD62I, CD102, CD104, Cd106, CD166	CD6, CD11a,b,c, CD18, CD21, CD31, CD36, CD38, CD49d, Cd50, CD51, CD62E,S,P, CD144
Récepteurs au cytokines	CD71, CDw119, CD120a, CD120b, CD121a,b, CD123, CD124, Cd126, CD127, CD140a, CD166, P75, TGFb1R, TGFbIIR	CD25, CD117
Autres molécules	CD13, CD73, CD105, CD90, CD146, CD157, SSEA-3, SSEA-4, D7, HLAA,B,C	CD1a, CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD34, CD45, CD80, CD83, CD86, SSEA-1, CD10, CD25, CD95, CD133

5.3.3. Capacité de prolifération

Les CSM sont capables de proliférer de façon extensive et de donner des colonies de grande taille. Leur nombre de doublement ne dépasse pas 50. Il est possible que les CSM puissent proliférer au-delà de 50 divisions après ajout de facteurs de croissance tel que le FGF-2 dans leur milieu de culture (Bianchi *et al.*, 2003). La densité cellulaire paraît également jouer un rôle dans la capacité d'expansion des CSM *in vitro* (Colter *et al.*, 2000).

5.3.4. Capacité de production d'un grand nombre de descendants différenciés

Les CSM sont capables de produire selon les inducteurs, un grand nombre de cellules différenciées (ostéocytes, adipocytes, chondrocytes, cellules vasculaires musculaires lisses), à partir d'un clone de CFU-F de la moelle humaine (Pittenger *et al.*, 1999). La différenciation vers la voie endothéliale a été décrite (Oswald *et al.*, 2004) mais non confirmée et celle vers d'autres voies dont la voie neuronale non prouvée définitivement (Figure 7). Les démonstrations de la clonalité restant rares, les études sur les CSM portent généralement sur une population de cellules cultivées qui comporte plusieurs clones constituant un mélange de cellules différenciées et indifférenciées.

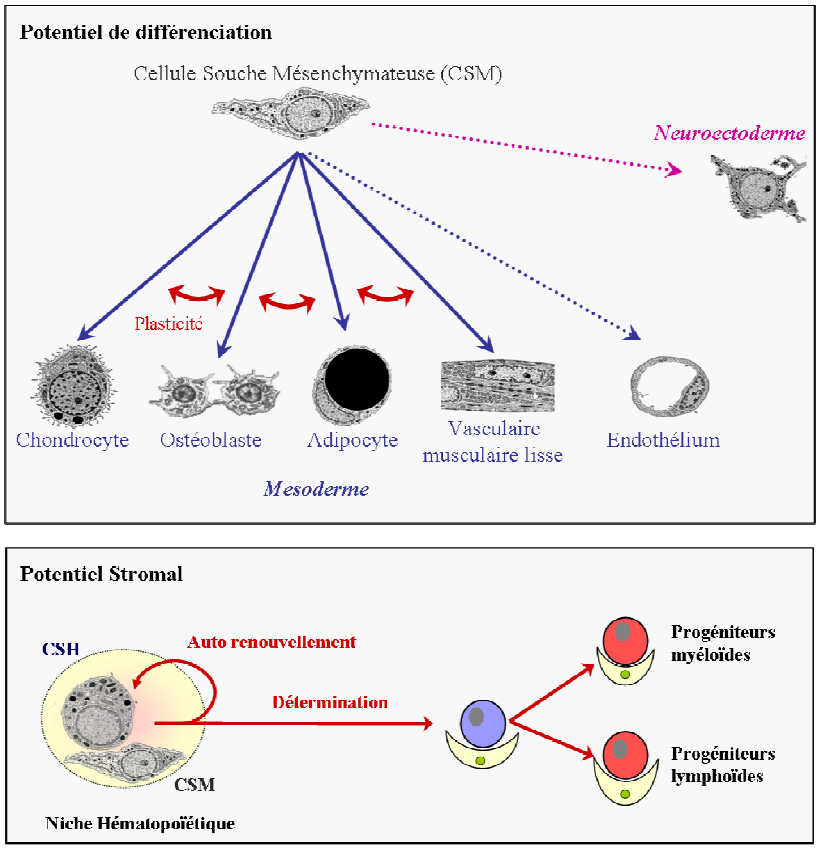


Figure 7 : Potentiels des cellules souches mésenchymateuses.

Les CSM sont des cellules multipotentes pouvant se différencier en différentes lignées mésodermiques, comme la voie chondrocytaire (C), ostéoblastique (O) ou adipocytaire (A). Elles participent aussi au soutien de l'hématopoïèse et régulent l'équilibre entre auto-renouvellement et détermination des CSH au sein de la niche hématopoïétique

5.3.5. Capacité d'autorenouvellement

Le potentiel d'autorenouvellement reste une question ouverte. L'autorenouvellement des CSM n'avait pas été formellement prouvé jusqu'à présent. Cependant deux articles récents ont mis en évidence une telle propriété *in vivo* au moins concernant une sous population péricytaire ($CD146^+$ ou $Nestine^+$) (Sacchetti *et al.*, 2007; Mendez-Ferrer *et al.*, 2010).

5.3.6. Multipotentialité et régénération tissulaire après lésion

La multipotence est définie comme la capacité d'une cellule à donner naissance à différents types de cellules. Comme nous l'avons mentionné plus haut, les CSM sont capables de produire des descendants différenciés du tissu mésodermique.

Elles sont aussi capables, dans des conditions environnementales particulières, de se différencier en une grande variété de types cellulaires tels que, les cardiomyocytes, les myofibroblatses, les péricytes, les myocytes squelettiques, et permettent d'obtenir des cellules non mésodermiques ayant un phénotype de cellules rétiniennes, neuronales, astrocytaires, gliales, hépatocytaires et pancréatique. Plusieurs études ont été déjà réalisées pour évaluer le potentiel de différenciation des CSM et établir les conditions nécessaires pour leur différenciation. Le *Tableau II* montre un résumé des principales voies de différenciation mésenchymateuse des CSM ainsi que leurs inducteurs (Minguell *et al.*, 2001).

Tableau II : Principales voies de différenciation des CSM et leurs inducteurs

Différenciation cellulaire	Stimuli	Identification des marqueurs phénotypique	
		Moléculaires	Cellulaires
Adipocytes	Dexamethasone + Isobutilmethyxanthine (Nuttall et al,1997) Dexamethasone + Isobutilmethyxanthine + indomethacine + Insuline (Pittenger et al, 1999; Conget et al, 2000) Dexamethasone + Insuline (Muraglia et al, 2000)	PARg2, C/EBPb, aP2, Adipsine Leptine, Lipoproteine Lipase, (Tontonoz et al, 1994; Pittenger et al, 1999; Gori et al, 1999)	Accumulation cytoplasmique de vésicules lipidiques (Owen et al,1988)
Chondrocytes	TGFb-3 + Acide ascorbique (Pittenger et al, 1999); TGFb-1 + Acide ascorbique (Muraglia et al, 2000; (Lisignoli G et al, 2005)	Cbfa-1, Collagène de type II et IX, Aggrecane (Lisignoli et al, 2005)	Enrichissement de la matrice en protéoglycane et collagène de type II et IX (Pittenger et al, 1999; Muraglia et al, 2000)
Ostéoblastes	Dexamethasone +bglycerophosphate + acide ascorbique (Mbalaviele et al, 1999)	Cbfa-1, MO/ Foie/ Rein, Phosphatase alkaline, Sialoproteine de l'os, Osteopontine,Osteocalcine,Collagène de type I (Bruder et al, 1997;Gori et al, 1999; Pittenger et al, 1999)	Formation de matrice minéralisée (Friedenstein et al, 1976)
Support stromal hématopoïétique	Hydrocortisone + sérum de cheval (Majumdar et al,1998); Co-culture avec Cellules souches hématopoïétiques (Guo et al, 2000)	Non défini	Maintient et support de la différenciation des cellules CD34+ (Majumdar et al, 1998) Support de l'osteoclastogenèse Support de la megacaryocytopoièse et de la thrompocytopoièse (Cheng et al, 2000)

5.3.7. Nichage dans un microenvironnement approprié

La capacité des CSM de se nicher dans le cartilage, la rate, la moelle osseuse et l'os a déjà été démontré depuis plusieurs années (Pereira *et al.*, 1995). Plus récemment, des CSM greffées par voie systémique ont subi une différenciation organo-spécifique en chondrocytes, adipocytes, myocytes, cardiomyocytes et cellules stromales, ce qui montre leur capacité à se nicher au sein de microenvironnement différents (Liechty *et al.*, 2000).

5.3.8. La plasticité

Cette notion a été introduite par Pollen et Loeffer en tant que plasticité intra-tissulaire. La plasticité peut-être définie comme la capacité des cellules à modifier leur voie de différenciation selon le microenvironnement dans lequel elles sont placées. Par exemple, des CSM différenciées en chondrocytes peuvent ainsi se réorienter dans la voie de différenciation ostéogénique (Bianco *et al.*, 1999), ou alors des adipocytes peuvent se différencier en ostéoblastes (Bennett *et al.*, 1991; Dennis and Charbord, 2002) (Figure 7). Plus récemment ces mécanismes de réversibilité commencent à être décryptés, il a été montré que des pré-adipocytes pouvaient s'orienter dans la voie de différenciation ostéogénique via l'action de BMP et de l'acide rétinoïque qui coopèrent pour stimuler la prolifération cellulaire, et ainsi réprimer l'adipogenèse, afin de promouvoir la différenciation des ostéoblastes. De plus, BMPRIA et BMPRIB induisent la différenciation ostéogénique et répriment la différenciation adipogénique dans des mesures similaire (Skillington *et al.*, 2002).

En résumé, l'ensemble des critères définis pas Potten et Loeffer, appliqués aux caractéristiques connues des cellules souches tissulaires montrent que les CSM sont une population cellulaire différente des CSH d'après certains critères. Les CSM correspondent à une population hétérogène capable de proliférer, qui ne sont pas intégrées à un système de hiérarchisation comparable à celui des CSH et dont le caractère d'autorenouvellement perpétuel n'est pas encore défini. Leur potentiel de différenciation (multipotence), leur plasticité, ainsi que leur capacité à se nicher dans des microenvironnements différents permet leur utilisation dans la régénération de tissus endommagés assez divers.

5.4. SIGNATURE MOLECULAIRE

En 2003, l'équipe de Nuber étudie le profil d'expression des cellules stromales de la moelle osseuse murine par la technique de cDNA microarrays (Wieczorek *et al.*, 2003). Certains éléments originaux du transcriptôme de ces cellules sont mis en évidence : les CSM expriment non seulement des molécules spécifiques aux cellules mésenchymateuses telles que la vimentine, mais aussi des molécules propres à certaines voies de différenciation telles que la voie neurale (Neural cell adhesion molecule, Synapsin, Neurone-specific gene family member 1,Tubulin β IV, Neuron-specific enolase, Neuronal intermediate filament α internexin, Neurogramine), ou les cellules neuroendocrines (Reticulon-3). Cette étude montre également la présence de transcrits spécifiques des cellules hématopoïétiques (CD7, T-Cell specific GTPase) ou des voies ostéogénique et chondrocytaire, (OB-Cadherin, Cartilage oligomeric matrix protein, Osteocalcin). Ces résultats montrent que même en l'absence d'inducteurs, les cellules stromales présentent des marqueurs spécifiques de lignage, témoignant peut-être d'un début d'engagement dans un grand nombre de voies.

En 2003 encore, l'équipe de Verfaillie publie des résultats sur des *Mesodermal Progenitor Cell* (MPCs) isolé à partir de 3 sujets humains, et différenciés dans les voies ostéogénique et chondrocytaire (Qi *et al.*, 2003). Cette étude montre qu'au cours de la différenciation, non seulement des gènes attendus dans les voies de différenciation étudiées sont induits, mais aussi des gènes associés à d'autres voies notamment des facteurs de transcription. Comme attendu au cours de la différenciation ostéogénique, parallèlement à l'induction des gènes de la phosphatase alcaline de l'ostéomoduline et de la cadhérine 2, il y a induction de SOX-4, SOX-22, SHOX-2 et MSX2 ; il y a également induction de HOX-B6, GATA1 et de KLF-1, généralement associés à l'érythropoïèse ou à la chondrogénèse. Quarante et un facteurs de transcription sont modulés au cours des différenciations, étant soit induits dans les deux voies de différenciation, soit dans l'une des deux. Ces résultats montrent que par des études *in vitro*, par le bon choix du modèle cellulaire et par l'utilisation des techniques de cDNA arrays, il est possible de caractériser de façon précise les voies de signalisation et facteurs de transcription impliqués dans la différenciation cellulaire.

Plus récemment, des travaux issus de notre laboratoire réalisé par Delorme (Delorme *et al.*, 2009) ont montré que les CSM de moelle osseuse exprimaient avant toute différenciation des gènes de différenciation adipogénique, ostéogénique, chondrocytaire, vasculaire musculaire lisse et partiellement endothéliale. À l'inverse les gènes de différenciation hépatocytaire,

myocardique, musculaire squelettique et neuronale ne sont pas exprimés. Ces résultats sont en faveur d'un « lineage priming » des CSH qui sont donc quadripotentes.

5.5. LES CSM ET LA NICHE HEMATOPOÏETIQUE

La notion de « niche hématopoïétique » a été suggérée par Schofield qui, en 1978, émet l'hypothèse que les cellules souches hématopoïétiques sont associées à des cellules stromales qui sont à la fois le support physique de l'hématopoïèse mais aussi un élément essentiel de sa régulation locale (Schofield, 1978). De cette manière, les cellules stromales vont constituer un microenvironnement local favorable au maintien, à la prolifération ou à la différenciation des CSH par l'intermédiaire de l'expression de molécules d'adhérence (Papayannopoulou *et al.*, 1995), de récepteurs de cytokines (Coulombel *et al.*, 1983; Rafii *et al.*, 1995), de la sécrétion de nombreuses cytokines (Mohle *et al.*, 1997a; Li *et al.*, 2000) et par la formation de la MEC (Lerat *et al.*, 1993). Cet environnement nécessaire au développement des cellules hématopoïétiques implique donc des interactions étroites avec les cellules stromales ainsi que la présence de molécules indispensables au bon déroulement de l'hématopoïèse (Martinez-Agosto *et al.*, 2007).

Le rôle du microenvironnement hématopoïétique dans le contrôle de la survie, la quiescence, l'auto-renouvellement et la différenciation des CSH est aujourd'hui bien admis mais la localisation précise et le mode de fonctionnement de la niche restent mal connus. Il apparaît qu'il existerait plusieurs types de niche dans la MO présentant des propriétés différentes, à la fois dans leur composition cellulaire et leur régulation (Yin *et al.*, 1997).

5.5.1. L'existence d'une niche dans la zone endostéale

En 1978, Gong a remarqué que la région endostéale de la MO est enrichie en CSH et les études de Nilsson (voir chapitre 4.1.) ont montré que les CSH y retournent et s'y domicilient, tandis que les progéniteurs migrent vers le centre de la cavité et les vaisseaux sanguins (Gong, 1978). Cette surface de l'os est bordée par des ostéoblastes, connus pour produire des facteurs de croissance hématopoïétiques tels que le *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF) et soutenir l'hématopoïèse *in vitro* (Taichman and Emerson, 1994; Taichman *et al.*, 1996; Taichman *et al.*, 2001). De plus, suite à l'inactivation du gène codant le récepteur de type IA à la BMP (*Bone Morphogenic Protein*), BMPRIA, il a été observé une augmentation du nombre des LT-HSC concomitante à l'augmentation du nombre d'ostéoblastes. L'analyse de la MO a révélé un épaississement trabéculaire, dû à une augmentation locale de cellules ostéogéniques

"*Spindle-shaped*" N-cadherine$^+$ CD45$^-$ ou SNO (Zhang *et al.*, 2003). Des expériences similaires de surexpression du récepteur (PPR) à l'hormone para-thyroïdienne (PTH) aboutissaient au même résultat (Calvi *et al.*, 2003). Ces données suggèrent que la taille du pool de CSH est régulée par le nombre de niches ostéogéniques. L'existence de cette niche ostéogénique a été prouvée par un modèle de souris transgéniques exprimant le gène de la thymidine kinase du virus Herpes simplex sous le contrôle du promoteur du collagène de type αI spécifique des ostéoblastes, permettant une déplétion de ces cellules sous l'induction du ganciclovir (Visnjic *et al.*, 2004). Le traitement au ganciclovir entraînait une diminution de la cellularité médullaire, du nombre de CSH et de progéniteurs myéloïdes, lymphoïdes et érythroïdes ainsi qu'une hématopoïèse extra-médullaire. L'arrêt du traitement rétablissait la présence d'ostéoblastes dans la MO et restaurait l'hématopoïèse médullaire.

Très récemment deux études ont montrées l'importance des ostéoblastes dans le soutien des CSH. Une première étude ciblant une sous population d'ostéoblastes ALCAM$^-$ Sca$^+$ à montré une fonction hématopoïétique importante avec une augmentation du homing des CSH et une forte augmentation de l'adhésion des CSH sur les cellules ALCAM$^-$ Sca$^+$. L'augmentation de l'adhésion des CSH sur cette sous poulation permettant un meilleur soutien de l'hématopoïèse à long terme. Après caractérisation de ces cellules des marqueurs de CSM ont été retrouvés ainsi qu'une forte expression de l'Ang1 ansi que de la thrombopoïétine (Nakamura *et al.*, 2010). Au cours de la deuxième étude une comparaison entre les ostéoblastes et les cellules stromales a été réalisée. Une signalisation médiée par Notch entre les CSH et les ostéoblastes à été démontré permettant le maintien in vitro des fonctions hématopoïétiques, par la production de CFU, par la culture des CSH en co-culture et le repeuplement potentiel des niches. De plus il a été démontré que cette fonction hématopoïétique était commune aux ostéoblastes à différents sites anatomique (Chitteti *et al.*, 2010).

Les interactions entre CSH et niche impliquent des molécules d'adhésion intercellulaires comme la N-cadhérine et les intégrines, des interactions avec les protéines matricielles sécrétées par les ostéoblastes et des facteurs solubles qui se fixent sur leurs récepteurs membranaires *(Figure 8)*.

La N-cadhérine est principalement exprimée sur les cellules endothéliales, et à la surface des cellules stromales médullaire, elle est retrouvée sur une sous population de progéniteurs très primitifs CD34$^+$ CD19$^+$ N-cadhérine$^+$. Au cours de la différenciation les progéniteurs vont perdrent progressivement la N-cadhérine et l'ajout d'anti-N-cadhérine à des cellules CD34$^+$ montre une diminution du nombre de colonies formées. La N-cadhérine est donc impliquée dans le dévellopement et la rétention des progéniteurs précoces au sein du

microenvironnement de la moelle osseuse.(Puch *et al.*, 2001). Les molécules de jonction d'adhérence N-cadhérine forment des complexes homotypiques localisés à l'interface entre les CSH et les ostéoblastes, essentiels dans l'ancrage des CSH (Zhang *et al.*, 2003).

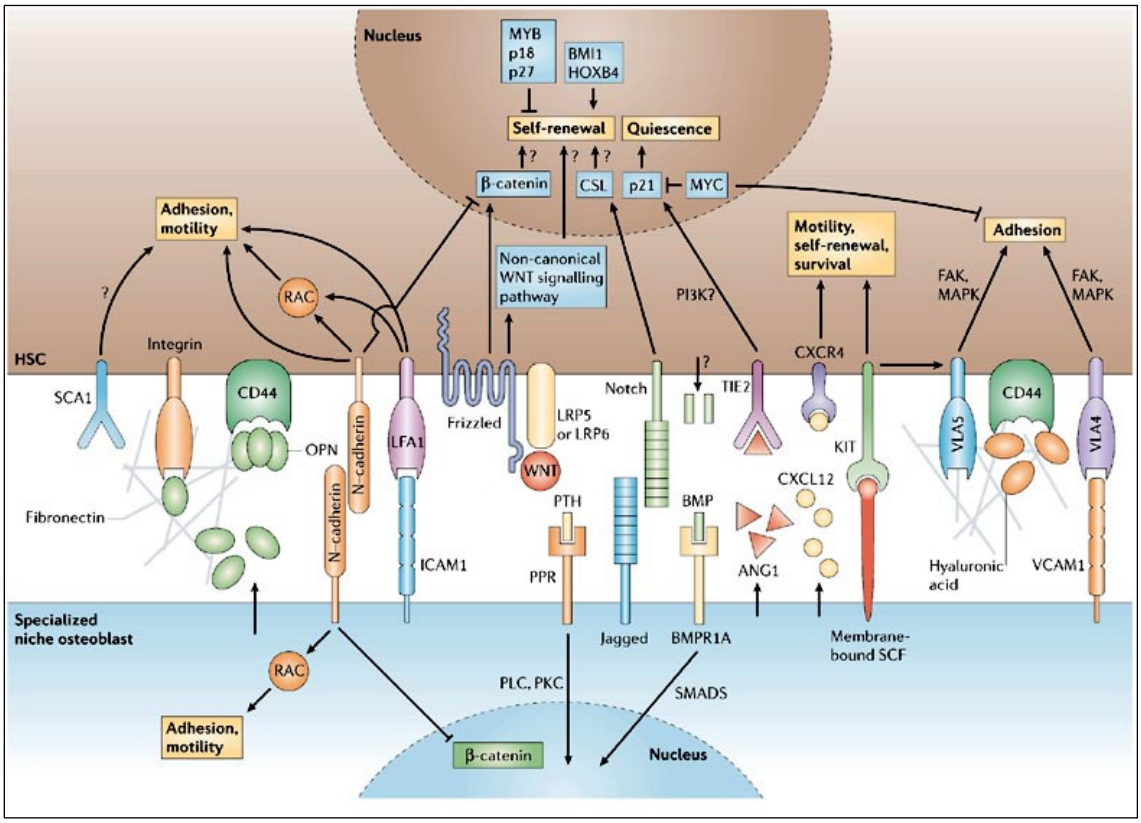


Figure 8 : Schéma des interactions entre les CSH et les ostéoblastes de la niche endostéale (d'après Wilson & Trump, 2006).

Les intégrines hématopoïétiques *Very Late Antigen*-4 (VLA-4) et *Lymphocyte Function-associated Antigen*-1 (LFA-1), dont les ligands respectifs *Vascular Cell Adhesion Molecule*-1 (VCAM-1) et *Intercellular Cell Adhesion Molecule*-1 (ICAM-1) sont exprimés sur les ostéoblastes, jouent aussi un rôle dans ce processus d'ancrage.

Les intégrines β1 (VLA-4 et VLA-5) peuvent aussi se lier aux protéines matricielles telles que la fibronectine (Fn), l'ostéopontine et l'acide hyaluronique (AH), abondantes dans cette région. Une autre molécule membranaire, le CD44, peut également fixer l'AH et l'ostéopontine libérée par les ostéoblastes, renforçant ainsi l'adhésion des CSH à l'endosteum. Enfin, la production locale de SDF-1 permet de conserver un gradient qui retient les CSH exprimant le récepteur CXCR4 au voisinage des ostéoblastes par chimiotactisme.

5.5.2. Le contrôle des CSH dans la niche endostéale

Au sein de la niche a lieu une régulation très fine de l'auto-renouvellement, la différenciation et la prolifération des CSH afin de préserver l'homéostasie cellulaire tout au long de la vie. De multiples molécules et voies de signalisation contribuent au maintien de l'équilibre entre quiescence et ancrage d'une part, et activation et libération de la niche d'autre part, en contrôlant notamment la division cellulaire symétrique et asymétrique *(Figure 8)* (Powell *et al.*, 1999).

Le récepteur à activité tyrosine kinase Tie2 est exprimé par les CSH primitives et reconnaît son ligand l'angiopoïétine 1 (Ang-1) produite par les ostéoblastes. L'activation de Tie2 induit l'adhérence aux ostéoblastes en augmentant l'expression de la N-Cadhérine, augmente la survie *in vitro* et favorise la quiescence des CSH *in vivo* (Arai *et al.*, 2004). Cet effet pourrait être dû à une régulation positive de la protéine $p21^{CIP1/WAF1}$ puisqu'elle est indispensable à la quiescence des CSH (Shen *et al.*, 2001).

Le rôle du couple SCF et c-Kit, son récepteur, a été bien caractérisé dans la prolifération et la survie des CSH. Les ostéoblastes présentent une forme membranaire du SCF qui augmente l'adhésion par les intégrines β1 (Kinashi and Springer, 1994). Ainsi l'absence de SCF dans les souris de la lignée Sl/Sl^d ou de c-Kit dans les souris W/W^v conduit à un défaut d'hématopoïèse (Bernstein *et al.*, 1991) et le SCF est indispensable à la localisation des CSH dans la région endostéale (Driessen *et al.*, 2003).

La protéine Notch est exprimée par les CSH primitives tandis que son ligand Jagged 1 (Jag1) est présent sur les ostéoblastes et les cellules stromales médullaires. Les Notch sont des récepteurs à un seul domaine transmembranaire dont la liaison avec leurs ligands Jagged ou Delta-like provoque le clivage de la portion extracellulaire par une métalloprotéase, la γ secrétase (Huntly and Gilliland, 2005) et la libération du domaine intracellulaire dans le cytoplasme. Cette libération intracellulaire de Notch est suivie d'une translocation jusqu'au noyau et de la formation d'un complexe activateur de la transcription avec le facteur CSL. L'activation constitutive de Notch1 permet l'immortalisation des CSH multipotentes de même que l'administration du ligand Jagged1 stimule la croissance des CSH (Karanu *et al.*, 2000; Varnum-Finney *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 2008). Cette voie est activée en aval du PPR simultanément à une augmentation du nombre d'ostéoblastes et de CSH (Calvi *et al.*, 2003). L'activation de la voie Notch/Jag1 empêche la différenciation et entraîne l'expansion du compartiment de cellules souches et progéniteurs (Li *et al.*, 1998). La voie Notch est liée à la voie de signalisation Wnt pour jouer un rôle dans l'auto-renouvellement des CSH (Reya *et al.*,

2003; Campbell *et al.*, 2008) et de façon plus générale dans la régulation de la niche hématopoïétique permettent la mise en circulation de CSH quiescentes suite à un stress afin de consolider une MO endommagée. La dérégulation des facteurs Notch et Wnt au sein de la niche causant des hématopoïèses anormales (Renstrom *et al.*, 2009).

Les protéines Wnt sont des molécules secrétées, au nombre de 16 chez les vertébrés, dont la fixation sur les récepteurs Frizzleds (Fzd) induit l'activation d'une protéine *Dishevelled* qui va rompre le complexe de destruction de la βcaténine impliquant notamment la GSK3β (*glycogene synthase kinase* 3β) et l'axine. Cela permet l'accumulation de la βcaténine et sa translocation vers le noyau où elle va se complexer aux facteurs de transcription LEF et TCF pour activer l'expression des gènes cibles (Polakis, 2000). La surexpression de la βcaténine stabilisée augmente de 100 fois les LT-HSCs indiquant un effet positif de cette voie sur l'auto-renouvellement des CSH normales (Reya *et al.*, 2003). L'expression ectopique d'axine, un régulateur négatif de la voie Wnt, provoque les effets contraires en induisant l'apoptose et en inhibant la prolifération. Les mêmes auteurs ont montré que du Wnt3a purifié favorisait l'auto-renouvellement des CSH murines en culture (Willert *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2008). Le pool de βcaténine cytoplasmique est aussi régulé négativement par la N-cadhérine qui retient les molécules de βcaténine par sa portion intracellulaire et s'oppose ainsi aux effets des Wnt.

Il convient également de citer le facteur c-Myc impliqué dans la balance quiescence/prolifération. Sa surexpression en réponse à des mitogènes (Wnt ou c-Kit) est nécessaire à la libération des CSH depuis la niche car elle réprime l'expression de molécules d'adhérence comme la N-cadherine et les intégrines (Wilson *et al.*, 2004). Au contraire, l'absence de c-Myc résulte en une insuffisance en progéniteurs (cytopénie) et une accumulation de CSH. Par conséquent, la contrainte c-Myc dans l'expression des CSH réprime la N-cadhérine et les intégrines conduisant à une perte d'activité d'auto-renouvellement, au détriment de la différenciation des CSH. C-Myc endogène est différemment exprimé et induit durant la différenciation des cellules souches à long terme (Wilson *et al.*, 2004).

Les membres de la famille *Polycomb* dont Bmi1, Rae28 et Ezh2, controlent l'auto-renouvellement et la prolifération (Lessard and Sauvageau, 2003; Pardal *et al.*, 2003). Bmi1 agit sur le cycle cellulaire en inhibant la protéine p16 (ou INK4A) inhibitrice du complexe cycline D / CDK4 (*cyclin dependant kinase* 4), favorisant ainsi la prolifération des cellules (Jacobs *et al.*, 1999). Des souris déficientes pour Bmi1 présentent des défauts sévères de l'hématopoïèse et du système nerveux et ne survivent pas à l'âge adulte (van der Lugt *et al.*,

1994). Les souris Bmi1$^{-/-}$ possèdent des CSH présentes dans le foie fœtal mais ces cellules sont incapables de se maintenir dans la MO et de reconstituer à long terme l'hématopoïèse pendant la vie adulte (Park *et al.*, 2003).

Les facteurs Hedgehog sont au nombre de trois chez l'homme, Sonic, Indian et Desert (SHH, IHH et DHH respectivement) et sont indispensables au développement embryonnaire et à l'orientation des organes (Taipale and Beachy, 2001). La signalisation par cette voie passe par une cascade de protéines cytoplasmiques dont le facteur Smoothened (Smo) qui active la transcription des gènes cibles (Kalderon, 2000). SHH est impliqué notamment dans l'auto-renouvellement des cellules souches neurales, et dans les médulloblastomes, il semble qu'il stimule la prolifération des progéniteurs malins par la suppression de la protéine du rétinoblastome (Rb) (Kenney and Rowitch, 2000). De plus le traitement par SHH induit l'expansion des cellules hématopoïétiques pluripotentes humaines chez des souris immunodéficientes. Noggin qui est un inhibiteur spécifique de protéines morphogénétiques osseuses 4 (BMP-4), est capable d'inhiber la prolifération induite par SHH d'une manière similaire à un anti-Hedgehog, cela montre que les fonctions de SHH en tant que régulateur des cellules hématopoïétiques primitives sont dépendantes des signaux BMP en aval (Bhardwaj *et al.*, 2001; Campbell *et al.*, 2008). IHH favorise l'hématopoïèse embryonnaire chez la souris (Dyer *et al.*, 2001; Campbell *et al.*, 2008). Il participe à la régulation des CSH, l'expression d'IHH par les cellules du microenvironnement augmentant la quantité de progéniteurs clonogéniques et de *Severe Combined Immuno-Deficiency Repopulating Cell* (SRC) (Kobune *et al.*, 2004; Campbell *et al.*, 2008).

Enfin, d'autres molécules ont été identifiées comme jouant un rôle dans le contrôle de l'hématopoïèse au sein de la niche, telles que les BMP ou la thrombopoiétine (Li and Xie, 2005).

La régulation des cellules souches et de leur fonction est la conséquence d'une fine coordination entre tous ces signaux qui aboutit au maintien de CSH quiescentes et multipotentes dans la niche endostéale. Au cours de la différenciation, ces cellules vont quitter cet environnement pour gagner la circulation en passant par la niche vasculaire.

Ces données sont confirmées par l'étude ex vivo en imagerie en temps réel de la migration des CSH. Les CSH transplantées migrent vers l'endostéum chez les souris irradiées mais se répartissent de façon aléatoire chez des souris non-irradiées. Les CSH sont retrouvées dans la zone trabéculaire de l'os et vont utiliser le système vasculaire proche des pré-ostéoblastes et N-cadhérine $^{+}$ pour rejoindre la MO. L'endostéum serait donc une zone particulière pour le

maintien des CSH mais celui-ci favoriserait leur expansion lors de dommages au niveau de la MO (Xie *et al.*, 2009).

5.5.3. La description d'une autre niche dans la zone vasculaire

L'identification d'une niche vasculaire "alternative" est plus récente. Lors d'hématopoïèse extra médullaire dans le foie, il a été montré que des progéniteurs hématopoïétiques étaient associés aux cellules endothéliales des sinus (Cardier and Barbera-Guillem, 1997). Les études suivantes ont montré que des cellules endothéliales étaient capables de soutenir des CSH in vitro en l'absence de facteurs de croissance (Rafii *et al.*, 1995; Jazwiec *et al.*, 1998; Hess *et al.*, 2004). De plus, la suppression des cellules endothéliales par un anticorps anti-VE-cadherine (Vascular Endothelial cadherin) entraîne un défaut de la thrombopoïèse (Avecilla *et al.*, 2004). Récemment, une nouvelle combinaison de marqueurs appelés SLAM, pour *Signaling Lymphocyte Activation Molecule*, a été découverte comme identifiant des CSH : CD150+ CD48- CD41-. Des CSH exprimant les SLAM ont été retrouvées adjacentes aux ostéoblastes mais aussi aux cellules endothéliales dans la MO comme dans la rate (Kiel *et al.*, 2005) . En outre, des données provenant de ces mêmes auteurs indiquent que les CSH les plus primitives n'exprimeraient pas la N-cadhérine et seraient présentes même lorsque l'ostéogénèse est perturbée (Kiel *et al.*, 2007). Ces données sont supportées par l'origine commune des cellules endothéliales et des CSH qui sont issues d'un précurseur embryonnaire commun appelé hémangioblaste (Choi, 1998). Il a été proposé que la niche vasculaire favorise la prolifération et la différenciation de cellules et progéniteurs hématopoïétiques tandis que la niche ostéogénique maintien la quiescence des CSH (Kopp *et al.*, 2005). Par exemple, la reconstitution de la thrombopoïèse dans des souris KO pour la TPO nécessite le recrutement de CSH depuis la niche endostéale vers la niche vasculaire où a lieu la différenciation mégacaryocytaire (Avecilla *et al.*, 2004). Cette "mobilisation" vers la niche vasculaire implique la métalloprotéase matricielle (MMP)-9 qui induit la libération de SCF soluble (Heissig *et al.*, 2002). Un second rôle essentiel de la niche vasculaire est d'assister les CSH dans les phénomènes de migration trans-endothéliale lors de la domiciliation ou la mobilisation périphérique. Enfin la niche vasculaire, en particulier dans la rate, pourrait être une niche "de secours" dans les situations de stress ou de défaut de l'hématopoïèse dans la MO. En cas de défaillance médullaire (animaux ou patients irradiés), il est souvent observé une splénomégalie concomitante à l'hématopoïèse extra médullaire (Kiel *et al.*, 2005).

Les molécules impliquées dans la régulation de la niche vasculaire sont encore peu connues. Il s'agit principalement de molécules solubles comme la chimiokine SDF-1 ou les

facteurs de croissance de la famille des *Fibroblast Growth Factors* (FGF). Les CSH expriment les récepteurs aux FGF, FGFR-1, -2 et -3 et le FGF stimule *in vitro* l'auto-renouvellement et la prolifération des CSH (de Haan *et al.*, 2003). Il semblerait qu'il existe un gradient décroissant de FGF4, de la niche vasculaire vers la niche endostéale, expliquant le recrutement de progéniteurs (Kopp *et al.*, 2005). Cela a été montré pour des progéniteurs mégacaryocytaires qui, sous l'effet de FGF4, expriment plus de VLA-4 et adhèrent mieux aux cellules endothéliales (Avecilla *et al.*, 2004). Le rôle de SDF-1, notamment dans la mobilisation des CSH, sera précisé ultérieurement.

Ainsi au concept de niche "endostéale" il est possible d'associer celui de niche "vasculaire" dont le rôle sur l'hématopoïèse avait déjà été souligné par d'autres auteurs (Avecilla *et al.*, 2004; Sacchetti *et al.*, 2007). En effet les cellules vasculaires et/ou périvasculaires peuvent également créer des niches hématopoïétiques, puisque de nombreuses CSH sont retrouvés autour des vaisseaux ainsi que des facteurs régulant le maintien des HSC (Kiel and Morrison, 2008). Les CSH quiescentes seraient même plus nombreuses dans les zones périvasculaires que dans les zones endostéales (Kiel *et al.*, 2005).

Le groupe de Nagasawa a confirmé l'importance des vaisseaux dans la régulation de l'hématopoïèse en rapportant que les CSH primitives avaient une interaction très étroite avec des cellules réticulaires, exprimant fortement SDF-1, retrouvées aussi bien près des cellules endothéliales que de l'endostéum (Sugiyama *et al.*, 2006).

Ces dernières années, plusieurs travaux ont relativisé l'importance des ostéoblastes dans la régulation des CSH puisqu'il a été rapporté que la déplétion sélective des ostéoblastes (Kiel *et al.*, 2007) ou leur expansion (Lymperi *et al.*, 2008) n'affectait pas significativement le pool de CSH, contrairement aux travaux de Calvi (Calvi *et al.*, 2003) et de Zhang (Zhang *et al.*, 2003). De plus, les cellules périvasculaires $CD146^+$ humaines implantés chez la souris sont capables de former des niches hématopoïétiques et d'exprimer l'Angiopoïétine-1 contrairement aux ostéoblastes (Sacchetti *et al.*, 2007). Très récemment, il a été montré que les cellules périvasculaires innervées expriment la nestine. Bien qu'elles ne représentent que 4 % des cellules medullaires $CD45^-$ elles supportent toute l'activité CFU-F, ont un phénotype de CSH, colocalisent avec les CSH de phénotype SLAM et sont responsables du maintien et de la domiciliation des CSH dans la moelle osseuse (Mendez-Ferrer *et al.*, 2010).

6. LE MICROENVIRONNEMENT MEDULLAIRE MOLECULAIRE

La niche hématopoïétique ne se limite pas aux éléments cellulaires. Le stroma médullaire régule directement et indirectement le système hématopoïétique par la mise en jeu de médiateurs moléculaires qui vont contrôler la quiescence, la prolifération et la différenciation des CSH. Ces médiateurs peuvent être de trois types : des molécules d'adhérence intercellulaire, des facteurs de croissance et des chimiokines.

6.1. LES MOLECULES D'ADHERENCE

Les molécules d'adhérence intercellulaire sont responsables de la régulation directe de l'hématopoïèse par les cellules stromales, et plus particulièrement les myofibroblastes. Elles interviennent dans l'interaction entre les CSH et les cellules stromales et favorisent leur adhérence à la MEC elle-même sécrétée par les cellules stromales.

Parmi les types de molécules qui interviennent dans l'adhérence cellulaire, il sera développé ici les glycoprotéines de la MEC, les intégrines, les sélectines, les sialomucines, le CD44 et la super-famille des Immunoglobulines.

6.1.1. Les glycoprotéines de la MEC

Les collagènes, la fibronectine (Fn), les laminines, la thrombospondine et les glycosaminoglycanes (GAG) sont les constituants principaux de la MEC. Ces molécules sont capables de favoriser l'adhérence des CSH à la MEC mais aussi de fixer des cytokines permettant une concentration locale plus importante de celles-ci et une régulation plus fine de l'hématopoïèse (Long *et al.*, 1992).

Les collagènes de type I, III et IV sont présents dans les cultures de moelle osseuse humaines (Cicuttini *et al.*, 1992; Roecklein and Torok-Storb, 1995). Le collagène de type I joue un rôle dans l'adhérence des progéniteurs myéloïdes (granulocytaires et érythrocytaires) à la MEC alors qu'il semble que ce ne soit pas le cas des collagènes de type III et IV (Koenigsmann *et al.*, 1992). L'inhibition de la sécrétion des collagènes par les cellules stromales désorganise la couche adhérente en culture et entraîne l'effondrement de la production des progéniteurs hématopoïétiques (Zuckerman *et al.*, 1985).

La fibronectine représente le composant principal de la MEC intervenant dans la régulation de l'hématopoïèse. Les CSH interagissent avec différents domaines de la Fn en fonction de

leur stade de différenciation. Les BFU-E et les CFU-GM se lient au fragment contenant la séquence RGD (Arginine-Glycine-Acide Glutamique) ou le domaine C terminal alors que les progéniteurs les plus immatures comme les CFU-Mix et les LTC-IC ne se lient qu'au domaine C terminal (Oostendorp and Dormer, 1997). La Fn stimule la production de BFU-E, CFU-GM et CFU-Mix en culture (Yokota *et al.*, 1998), favorise la prolifération des progéniteurs $CD34^+CD38^-$ (Schofield *et al.*, 1998) et joue un rôle dans le repeuplement *in vivo* de souris NOD/SCID par des CSH humaines ou murines (van der Loo *et al.*, 1998).

Les progéniteurs $CD34^+$ seraient capables d'adhérer aux protéines de la famille des laminines (Liesveld *et al.*, 1991). Parmi cette famille, les isoformes γ1, β1 et β2 de la laminine sont produites par le stroma médullaire humain, alors que le stroma médullaire murin ne produit que les isoformes β1 et γ1 (Remy-Martin *et al.*, 1999).

La thrombospondine est produite par le stroma humain et le stroma murin (Long and Dixit, 1990; Loeuillet *et al.*, 2001). Elle semble intervenir dans l'adhérence des différentes lignées de progéniteurs hématopoïétiques à la MEC.

Les GAGs produits par le stroma sont l'acide hyaluronique, la chondroïtine sulfate et l'héparane sulfate (Liesveld *et al.*, 1991). Ils interviennent également dans l'adhérence des CSH à la MEC et l'héparane sulfate semble être particulièrement important pour le maintien des LTC-IC en culture en combinaison avec un mélange de cytokines adéquat (Gupta *et al.*, 1996).

6.1.2. Les intégrines

Les intégrines sont des hétéro dimères composés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β. Il existe 8 chaînes β et 17 chaînes α décrites chez l'homme. L'appariement spécifique d'une sous-unité α avec une sous-unité β forme une intégrine particulière avec un répertoire spécifique de ligands, de fonctions et de distributions cellulaires (Hynes, 1992). Les intégrines sont classées en fonction de leur sous-unité β. Celles exprimées par les cellules hématopoïétiques sont les intégrines β1 (CD29), β2 (CD18), β3 (CD61) et β7. Les CSH expriment préférentiellement les intégrines β1 et une seule intégrine β2 *(Tableau III)* (Simmons *et al.*, 1997).

Tableau III : Intégrines exprimées par les cellules hématopoïétiques

Intégrine	Chaîne b	Chaîne a	Ligands
VLA-2 **Very Late Antigen 2**	ß1 CD29	a2 CD49b	collagènes
VLA-4 **Very Late Antigen 4**	ß 1 CD29	a 4 CD49d	Domaine CS1 de la fibronectine Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1, CD106)
VLA-5 **Very Late Antigen 5**	ß 1 CD29	a 5 CD49e	Domaine RGD de la fibronectine
VLA-6 **Very Late Antigen 6**	ß 1 CD29	a 6 CD49f	laminines
LFA-1 **Leucocyte Fonction Antigen 1**	ß 2 CD18	a L CD11a	Intercellular Cell Adhesion Molecules (ICAM-1, CD54 ; ICAM-2, CD102 ; ICAM-3, CD50)

Les intégrines sont exprimées sous une forme inactive et requièrent une activation préalable, résultant d'un changement de leur conformation tridimensionnelle, pour être capables de lier leurs co-récepteurs et assurer leurs fonctions adhésives (Schwartz *et al.*, 1995). À ce jour, les médiateurs reconnus comme étant impliqués dans l'activation des intégrines sont les facteurs de croissance hématopoïétique (Levesque *et al.*, 1995; Levesque *et al.*, 1996), les chimiokines (Peled *et al.*, 1999), des antigènes transmembranaires (Leavesley *et al.*, 1994) et certains cations métalliques divalents (Takamatsu *et al.*, 1998). Excepté pour les cations divalents, l'activation des intégrines β1 par les autres médiateurs est indirecte faisant intervenir des voies de transduction spécifiques qui incluent plusieurs kinases activées. Cette activation des intégrines correspond à un « *inside-out signalling* » et fait intervenir les phosphatidylinositol-3 kinases (Levesque and Simmons, 1999) et des GTPases de la famille des RAS, les RAC2 (Roberts *et al.*, 1999).

Parmi les intégrines β1, VLA-4 et VLA-5 sont celles exprimées préférentiellement par les CSH (Kerst *et al.*, 1993). Leur expression diminue au cours de la maturation érythrocytaire

pour disparaître à la surface des réticulocytes permettant leur mise en circulation dans le sang (Vuillet-Gaugler *et al.*, 1990). Leur rôle physiologique dans l'hématopoïèse a été démontré grâce à des études évaluant l'effet d'anticorps (Ac) dirigés contre VLA-4 et VLA-5. Ainsi, les Ac anti-α4 et anti-β1, mais pas anti-α5, inhibent la formation des CFU-Blasts, considérés comme des progéniteurs très primitifs adhérents au stroma (Oostendorp *et al.*, 1995) et les Ac anti-α4, anti-α5, anti-β1 et anti-β2 inhibent l'adhérence des cellules $CD34^+$ médullaires au stroma médullaire (Teixido *et al.*, 1992; Prosper *et al.*, 1998).

6.1.3. Les sélectines

Il existe trois types de sélectines : la sélectine E (CD62E), la sélectine P (CD62P) et la sélectine L (CD62L). Ce sont des protéines transmembranaires avec un domaine extracellulaire constitué d'un domaine homologue aux lectines, d'un domaine homologue à l'*Epidermal Growth Factor* (EGF) et un domaine homologue aux protéines du complément (Kansas, 1996). De façon générale, elles interagissent avec les sialomucines par des liaisons de faible affinité. La sélectine L (L pour leucocyte) est exprimée par les CSH, les progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes et les leucocytes matures ; la sélectine E (E pour endothéliale) est exprimée uniquement par les cellules endothéliales, et la sélectine P (P pour plaquette) est exprimée par les cellules endothéliales, les précurseurs mégacaryocytaires médullaires et les plaquettes activées. Chez la souris, les sélectines E et P sont exprimées constitutivement par l'endothélium médullaire, contrairement à l'endothélium extramédullaire qui nécessite une activation pro-inflammatoire pour les exprimer (Schweitzer *et al.*, 1996). Les CSH adhèrent à la sélectine P car elles expriment son récepteur, la sialomucine *P-selectin Glycoprotein Ligand 1* (PSGL-1 ou CD62) (Zannettino *et al.*, 1995). Elles adhèrent également à la sélectine E par l'intermédiaire de motifs glucidiques de type sialyl $Lewis^x$. Ces interactions entre les CSH et les sélectines P et E jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'hématopoïèse. Tout d'abord, elles permettent la domiciliation des CSH dans la moelle osseuse selon un mécanisme analogue au recrutement des leucocytes sur la paroi vasculaire enflammée (Frenette *et al.*, 1998). En outre, ces deux sélectines sont essentielles au maintien de l'homéostasie du système hématopoïétique puisqu'elles permettent de maintenir *in vitro* et *in vivo* dans la moelle osseuse les CSH dans un état peu prolifératif sans affecter la prolifération des progéniteurs plus tardifs chargés d'assurer le renouvellement des cellules sanguines (Frenette *et al.*, 1996; Levesque *et al.*, 1999).

6.1.4. Les sialomucines

Les sialomucines sont des molécules qui présentent en commun un niveau élevé de N- et O-glycosylations riches en acides sialiques avec comme caractéristique de présenter les agrégats de thréonine et sérine glycosylées. Cette famille comprend le marqueur des progéniteurs et des CSH, l'antigène CD34, mais aussi le PSGL-1, la podocalyxine, l'endoglycane, et les antigènes CD43 et CD164 (Lévesque *et al.*, 2001).

L'antigène CD34 est exprimé dans un grand nombre de tissus. Dans le tissu hématopoïétique, l'antigène CD34 est exprimé par les progéniteurs hématopoïétiques, les cellules endothéliales et certaines cellules stromales. Il existe plusieurs isoformes de l'antigène CD34 résultant d'un épissage alternatif conduisant à des glycosylations différentes du domaine mucine. L'isoforme de l'antigène CD34 exprimée par les cellules endothéliales interagit avec la sélectine L alors que ce n'est pas le cas de l'isoforme exprimée par les progéniteurs hématopoïétiques (Hiraoka *et al.*, 1999). L'antigène CD34 pourrait avoir un rôle dans le contrôle de la différenciation des CSH (Healy *et al.*, 1995).

6.1.5. L'antigène CD44

L'antigène CD44 est une glycoprotéine transmembranaire ayant pour principal ligand l'acide hyaluronique, GAG de la MEC sécrété par les cellules fibroblastiques et endothéliales (Smadja-Joffe *et al.*, 1998). Bien que le CD44 soit richement glycosylé, il n'appartient pas à la famille des sialomucines car il est pauvre en O-glycosylations et ne présente pas les agrégats de thréonine et sérine glycosylées caractérisant cette famille. Il est exprimé par les cellules hématopoïétiques avec une intensité variable selon le degré de maturité et la lignée étudiés. Son rôle dans l'hématopoïèse reste assez controversé puisque des Ac anti CD44 ont été identifiés comme stimulants (Rossbach *et al.*, 1996) ou inhibant (Ghaffari *et al.*, 1995) l'hématopoïèse en culture à long terme *in vitro*. Ces Ac permettent également d'augmenter l'adhérence des CSH au stroma médullaire (Avigdor *et al.*, 2004).

6.1.6. La superfamille des Immunoglobulines (Ig)

Les molécules de cette famille ont comme caractéristique structurale la répétition de domaines similaires à ceux des immunoglobulines (Williams and Barclay, 1988). La plupart des membres de cette famille sont impliqués dans la reconnaissance intercellulaire et certaines

molécules interviennent dans l'immunité cellulaire, le développement neural, le trafic des leucocytes et la transduction du signal. Dans le système hématopoïétique, les molécules de la superfamille des Ig les plus importantes sont présentes à la surface des cellules du microenvironnement médullaire (cellules endothéliales et cellules stromales) et sont les co-récepteurs des intégrines exprimées par les CSH.

Parmi elles, *Intercellular Cell Adhesion Molecule-1* (ICAM-1 ou CD54), qui a pour ligands LFA-1 et Mac-1, est une glycoprotéine transmembranaire qui est exprimée par les leucocytes, mais aussi les cellules épithéliales et mésenchymateuses. Son expression par les cellules non hématopoïétiques est augmentée par l'action de cytokines. Ainsi, la stimulation des cellules endothéliales par IL-1, TNF et IFN-γ augmente considérablement l'expression d'ICAM-1 (Rothlein *et al.*, 1988).

Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1 ou CD106) est une glycoprotéine de grande taille (7 domaines extracellulaires) exprimée sur les cellules endothéliales activées mais aussi sur les macrophages et les cellules dendritiques (Freedman *et al.*, 1990; Rice *et al.*, 1991). Elle a pour ligand VLA-4. L'expression de VCAM-1, faible ou absente sur l'endothélium au repos, est augmentée par diverses cytokines lors de l'inflammation (Osborn *et al.*, 1989; Rice and Bevilacqua, 1989). VCAM-1 joue un rôle majeur dans l'extravasation des leucocytes au niveau des sites d'inflammation mais également dans l'hématopoïèse comme l'indique son expression par les cellules stromales médullaires (Simmons *et al.*, 1992).

6.2. LES CYTOKINES PRODUITES PAR LE MICROENVIRONNEMENT

L'importance des cytokines dans la régulation et le soutien de l'hématopoïèse a été mis en évidence grâce aux systèmes de culture à long terme où les cellules hématopoïétiques sont cultivées en présence d'un stroma mais sans contact direct entre les deux types cellulaires (Verfaillie, 1992). Ces modèles ont permis d'analyser les mécanismes moléculaires mis en jeu dans les processus de régulation intercellulaire. La plupart d'entre elles sont sécrétées, par les cellules hématopoïétiques, dont font partie les cellules dites accessoires (monocytes et lymphocytes) et les cellules stromales, mais certaines sont également exprimées sous forme membranaire comme le SCF et le GM-CSF. Elles exercent leur activité par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques présents soit à a surface des cellules cibles, soit sous forme soluble.

Les cytokines agissent localement par différents modes d'action : endocrine, paracrine, autocrine et juxtacrine. Ce dernier mode d'action favorise le contact entre les cellules : la cytokine ancrée à la membrane cytoplasmique de la cellule productrice interagit directement avec le récepteur porté par la cellule cible.

Les cytokines sont des glycoprotéines qui sont soit libres, soit liées à la membrane cellulaire ou à la MEC. Il existe deux types de cytokines intervenant dans la régulation de l'hématopoïèse : (i) des régulateurs positifs appelés facteurs de croissance hématopoïétique (FCH), (ii) des régulateurs négatifs, moins nombreux et moins connus, tous deux modulant la survie, la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques et agissant sur les différents compartiments de l'hématopoïèse. Il n'est pas possible d'être exhaustif tant le nombre et la diversité d'action des cytokines est importante. Le *Tableau IV* reprend les principales cytokines et leurs propriétés.

6.2.1. Les facteurs de croissance hématopoïétiques

Les facteurs de croissance peuvent être regroupés en 2 grands types :

Les *Colony Stimulating Factors* (CSF) qui agissent sur des progéniteurs précoces et ne sont pas spécifiques d'un lignée donnée (GM-CSF, IL-3). D'autres ont une action agissant sur les stades les plus tardifs de la différenciation et sont nécessaires à l'acquisition des caractères spécifiques des cellules matures (Erythropoïétine, IL-5)

Les facteurs synergiques qui ne sont pas des CSF pour les précurseurs hématopoïétiques mais seraient indispensables pour mettre en cycle les cellules hématopoïétiques primitives.

6.2.1.1. Les CSF

L'Interleukine-3 (IL-3) agit sur les temps précoces de presque toutes les lignées hématopoïétiques à l'exception peut-être de la lignée B. Elle est capable d'entraîner la formation de colonies de neutrophiles, de monocytes/macrophages, de mégacaryocytes. Cependant il faut lui associer de l'érythropoïétine pour obtenir une stimulation maximale et la formation de colonies érythroïdes.

Le *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) a une action très proche de celle de l'IL3 avec une activité sur la plupart des progéniteurs et sur les cellules matures des lignées granulomonocytaires et éosinophiles. Non seulement il active la multiplication cellulaire, mais de plus il favorise l'acquisition des fonctions de ces cellules (phagocytose, adhésion).

Tableau IV : Caractéristiques des principales cytokines

cytokines	cellules productrices	récepteurs	propriétés
SCF	cellules stromales monocytes/macrophages	c-kit	¤ synergique avec l'IL-3 pour la prolifération des progéniteurs multipotents ¤ synergique avec l'IL-3 pour la prolifération des progéniteurs myéloïdes et érythroïdes ¤ favorise la survie des progéniteurs primitifs
Flt-3 ligand	cellules stromales	FlT3	¤ synergique avec le SCF, G-CSF, IL-3 et IL-6 pour la prolifération des progéniteurs myéloïdes ¤ induit la prolifération des progéniteurs primitifs
IL-1	cellules stromales monocytes/macrophages	IL-1-R	¤ induit l'expression du GM-CSF, du G-CSF, de l'IL-1, de l'IL-6 dans les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules thymiques et les kératinocytes
IL-3	lymphocytes T	IL-3-R	¤ stimule la prolifération des CFU-Mix, des CFU-Masts, des BFU-E et des lymphocytes T
GM-CSF	cellules stromales, lymphocytes T monocytes/macrophages	GM-CSF-R	¤ stimule la prolifération des progéniteurs multipotents et des BFU-E ¤ stimule la fonction des neutrophiles et éosinophiles et des monocytes-macrophages
G-CSF	cellules stromales monocytes/macrophages	G-CSF-R	¤ stimule la production et la phagocytose des neutrophiles ¤ synergique avec l'IL-3, l'IL-1 et l'IL-6 pour la mise en cycle des cellules souches
EPO	Rein, Foie	EPO-R	¤ stimule *in vitro* la différenciation des BFU-E, des CFU-E et la synthèse de l'hémoglobine ¤ stimule la mégacaryopoïèse
M-CSF	cellules stromales, lymphocytes T monocytes/macrophages	M-CSF-R	¤ stimule la production des monocytes et des macrophages ¤ stimule les fonctions des monocytes et des macrophages
TPO	cellules stromales	c-mpl	¤ induit la maturation des progéniteurs mégacaryocytaires ¤ induit l'inhibition de l'apoptose des progéniteurs $CD34^+$ $CD38^-$ chez la souris
FGF	cellules stromales	FGF-R	¤ induit la prolifération des fibroblastes
TNF-α	cellules stromales, lymphocytes T monocytes/macrophages	TNF-α-R	¤ diminue l'expression des récepteurs au G-CSF ¤ augmente l'expression des récepteurs au GM CSF ¤ active la phagocytose des polynucléaires et leur passage à travers les parois vasculaires ¤ synergique pour la stimulation du développement *in vitro* des cellules $CD34^+$
IFN-γ	lymphocytes T	IFN-γ-R	¤ inhibe la croissance des progéniteurs hématopoïétiques
IL-6	lymphocytes T monocytes/macrophages	IL-6-R	¤ synergie avec IL-3 et GMCSF ¤ action précoce sur les stades de l'hématopoïèse ¤ action longue
TGF-β	cellules stromales plaquettes	TGF-β-R	¤ inhibe la formation de progéniteurs en culture ¤ induit l'apoptose des progéniteurs par inhibition de l'effet du SCF, du G-CSF et de l'IL-1

Le *Granulocyte Colony Stimulating Factor* (G-CSF) stimule *in vitro* la prolifération des précurseurs médullaires des neutrophiles (CFU-G, CFU-GM). Il agit sur ces cellules relativement indifférenciées à faibles doses et en l'absence d'autres cytokines. Il favorise également les phases terminales de la différenciation granulocytaires (Valtieri *et al.*, 1987). Le G-CSF seul n'a que peu d'effet sur les précurseurs médullaires pluripotents indifférenciés. Combiné à d'autres cytokines comme l'IL-1, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-6, le GM-CSF ou le SCF, il peut stimuler la prolifération des cellules pluripotentes sans toutefois les orienter vers la voie granulocytaire (Metcalf, 1991). Il agit également sur les neutrophiles matures en stimulant les fonctions inflammatoires (burst oxydatif, cytotoxicité dépendante des anticorps, phagocytose), le chimiotactisme, certaines activités enzymatiques, l'expression de molécules membranaires et la survie cellulaire (probablement en inhibant l'apoptose). Enfin il agit sur les monocytes et les cellules endothéliales. C'est un facteur essentiellement actif sur la lignée granuleuse, y compris sur les cellules les plus matures.

Le *Macrophage Colony Stimulating Factor* (M-CSF) seul n'a pratiquement aucune activité CSF. Il semble avoir besoin de GM-CSF à très faible concentration pour être stimulant. Il constituerait le facteur de régulation de tout le système des phagocytes mononucléés (facteur de survie et d'activation des monocytes et des macrophages). Le M-CSF et RANK-L (*receptor activator of nuclear factor κB ligand*) sont essentiels à l'ostéoclastogenèse. Ces facteurs sont synthétisés par les cellules du microenvironnement osseux et se fixent sur leurs récepteurs respectifs c-Fms et RANK, à la surface des préostéoclastes. L'ostéoprotégérine (OPG) agit comme régulateur de l'ostéoclastogénèse en se fixant à RANK-L et en bloquant son effet sur RANK.

L'Erythropoïétine (EPO), contrairement aux autres facteurs de croissance, est synthétisée par des cellules très spécialisées au niveau du rein (cellules endothéliales ventriculaires) et du foie fœtal (cellules de kupfer). Elle constitue le facteur spécifique de la lignée érythroïde, agissant tardivement au cours de la différenciation érythroïde.

La Thrombopoïétique (TPO) possède les propriétés d'un facteur de croissance stimulant les progéniteurs mégacaryocytaires et agissant sur la maturation de ces cellules en faisant produire des plaquettes.

L'Interleukine 5 (IL-5) entraîne spécifiquement la différenciation des éosinophiles et agit sur les polynucléaires éosinophiles matures dont il augmente la survie et les fonctions.

L'Interleukine 7 (IL-7) est un facteur indispensable à la différenciation lymphocytaire T et B.

6.2.1.2. Les facteurs synergiques

Le *Stem Cell Factor* (SCF) est capable d'une action synergique avec tous les facteurs de croissance hématopoïétiques sauf avec le M-CSF. Il a une action très nette sur les temps précoces de l'hématopoïèse, en synergie avec l'IL3.

Le *fms-related tyrosine kinase 3 ligand* (FLT-3 Ligand) stimule la prolifération des progéniteurs myéloïdes en synergie avec d'autres cytokines comme le SCF, G-CSF, GM-CSF, IL-3 et IL-6.

L'Interleukine 6 (IL-6) a une action sur les temps précoces de l'hématopoïèse, en synergie avec l'IL-3 et le GM-CSF, sur la plupart des progéniteurs hématopoïétiques. Son action paraît cependant plus longue, dépassant même le système hématopoïétique et immunitaire.

Le *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) a une action très proche de l'IL-6, aussi bien sur l'hématopoïèse qu'en dehors du système hématopoïétique.

De nombreuses autres interleukines, comme l'IL-4, l'IL-11 et l'IL-12 ont été décrites mais leur rôle, comme celui des précedentes, est encore en étude.

Ces facteurs de croissance ont globalement des propriétés antiapoptotiques vis-à-vis des CSH, favorisent leur entrée dans le cycle cellulaire et augmentent l'expression des récepteurs aux CSF.

6.2.2. Les facteurs de régulation négative

Ces médiateurs ont une action inhibitrice sur l'hématopoïèse soit en agissant directement sur les cellules cibles (hématopoïétiques ou stromales) exprimant leurs récepteurs, soit en agissant indirectement en inhibant l'effet des facteurs de croissance. C'est le cas du *Transforming Growth Factor β* (TGFβ), du *Tumor Necrosis Factor α* (TNFα), et de l'interféron γ (IFNγ).

Le TGFβ est un inhibiteur de l'entrée en cycle cellulaire des progéniteurs primitifs et un inhibiteur puissant de la mégacaryopoïèse. Néanmoins, son action est variable en fonction de l'état de différenciation des cellules et de l'interaction avec d'autres cytokines.

Le TNFα a une action contradictoire (action inhibitrice ou stimulante) suivant les facteurs de croissance utilisés en culture pour stimuler la prolifération.

Le MIP-1α, qui est en fait la chimiokine CCL-3, ne limite pas son action au tissu hématopoïétque et se trouve impliqué dans de nombreux processus inflammatoires. Il a des effets complexes, inhibant les progéniteurs les plus immatures stimulés par plusieurs cytokines et stimulant les progéniteurs les plus matures ne répondant qu'à une cytokine.

6.3. LE ROLE DES FACTEURS DE CROISSANCE DANS LA REGULATION DE L'HEMATOPOÏESE

Les approches visant à modifier génétiquement l'expression des cytokines et/ou de leurs récepteurs ont permis de mieux comprendre si les cytokines avaient un rôle instructif ou un rôle simplement sélectif dans la régulation de la différenciation et de l'engagement hématopoïétique.

Les données résultant d'invalidation de gènes de cytokines ou de leurs récepteurs sont en faveur d'un rôle instructif. Le meilleur exemple est celui de l'EPO et de son récepteur (EPO-R). L'extinction d'un ou de ces deux loci chez la souris KO conduit à une sévère anémie causée par un déficit en globules rouges matures transporteurs d'oxygène, indiquant que la signalisation cellulaire dépendante de l'EPO est nécessaire pour la différenciation et la maturation des érythrocytes (Wu *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1996). Néanmoins, l'examination du compartiment des progéniteurs érythrocytaires ne révèle pas de déficit majeur, indiquant que l'engagement dans la lignée érythrocytaire « per se » est intact.

De la même manière, les souris invalidées pour le G-CSF ne présentent pas de déficiences importantes dans la production de progéniteurs myéloïdes, et les animaux déficients pour le G-CSF continuent à produire un nombre certes réduit mais substantiel de neutrophiles (Enver *et al.*, 1998; Metcalf, 1998).

Ces expériences de knock-out montrent que les décisions concernant l'engagement vers une lignée hématopoïétique donnée peuvent être faites sans la présence des cytokines et de leurs récepteurs. Mais ceci n'exclut pas leur possible implication à certains niveaux *in vivo*.

De plus, il n'est pas possible d'exclure que des voies de signalisation compensatrices masquent la vraie fonction des cytokines.

Une autre approche pour étudier le rôle potentiel des cytokines et de leurs récepteurs dans le processus de l'engagement vers les différentes lignées consiste à transduire les cellules hématopoïétiques afin de leur faire exprimer un récepteur de cytokine qu'elles n'exprimeraient pas naturellement. Par exemple, la transduction de progéniteurs érythroïdes avec un rétrovirus codant pour le récepteur du M-CSF permet à ces cellules de générer des colonies érythrocytaires en réponse au M-CSF, mais ne conduit pas à un switch vers la lignée monocytaire (McArthur *et al.*, 1994). En fait, le seul switch d'engagement reflétant un degré de plasticité anormal mis en évidence est celui de la reprogrammation des lymphocytes B vers une différenciation monocytaire (Borzillo *et al.*, 1990).

En résumé, toutes ces données montrent que l'apparente spécificité d'action des cytokines d'activité restreinte à une lignée hématopoïétique donnée est en grande partie due aux profils d'expression de leurs récepteurs. Ces profils d'expression distincts des récepteurs de cytokines observés à la surface des cellules engagées vers une lignée sembleraient donc une conséquence, plutôt qu'une cause, du processus d'engagement. Ceci met l'accent sur la nature unique de l'environnement intracellulaire (ou du "contexte cellulaire") dans la capacité à percevoir le signal et à y répondre spécifiquement, et pose la question quant à la façon dont le programme prédéterminé de différenciation est inclus dans les cellules engagées dans les différentes lignées.

6.4. LES CHIMIOKINES ET LEURS RECEPTEURS

6.4.1. Définition

Les chimiokines constituent une large famille de petites protéines de 6 à 15 kDa sécrétées par un grand nombre de cellules. À l'heure actuelle plus de 40 chimiokines humaines différentes sont connues. De nombreuses chimiokines ont été identifiées auparavant et dénommées en fonction de leur localisation tissulaire ou de leur rôle physiologique. En 1995, le comité *Committee On Nomenclature And Drug Classification* (NC-IUPHAR) a organisé la nomenclature des chimiokines. Même si le terme de chimiokines est communément accepté et retrouvé dans la littérature, la nomenclature officielle des chimiokines l'est, elle, beaucoup moins, et l'ancienne nomenclature reste communément utilisé dans les publications scientifiques *(Tableau V)*.

Tableau V : Nomenclature de chimiokines d'après *Pease&Williams*, 2006.

Chimiokine	Autre dénomination	Récepteur	Chimiokine	Autre dénomination	Récepteur
CCL1	I-309	CCR8	**CXCL1**	GROß/MGSA-ß	CXCR2
CCL2	MCP-1/MCAF	CCR2	**CXCL2**	GRO?/MGSA-?	CXCR2
CCL3	MIPa/LD78a	CCR1,5	**CXCL3**	GROa/MGSA-a	CXCR2
CCL3L1	LD78	CCR1,5	**CXCL4**	PF-4	CXCR3B
CCL4	MIP-1ß	CCR5	**CXCL5**	ENA-78	CXCR2
CCL4L1	LAG-1	CCR5	**CXCL6**	GCP-2	CXCR1,2
CCL5	RANTES	CCR1,3,4,5	**CXCL7**	NAP-2	CXCR2
CCL7	MCP-3	CCR1,2,3 (CCR5)	**CXCL8**	IL-8	CXCR1,2
CCL8	MCP-2	CCR3	**CXCL9**	Mig	CXCR3 (CCR3)
CCL11	Eotaxin	CCR3 (CCR2)	**CXCL10**	IP-10	CXCR3 (CCR3)
CCL13	MCP-4	CCR2,3	**CXCL11**	I-TAC	CXCR3 (CCR3), CXCR7
CCL14	HCC-1	CCR1	**CXCL12**	SDF-1ª/ß	CXCR4, CXCR7
CCL15	HCC-2/Lkn-1 MIP-1?/MIP5	CCR1,3	**CXCL13**	BLC/BCA-1	CXCR5
CCL16	HCC-4/LEC	CCR1	**CXCL14**	BRAK/Bolekine	
CCL17	TARC	CCR4,8	**CXCL15**	SR-PSOX	CXCR6
CCL18	DC-CK/AMAC-1 MIP5/PARC/MIP-4	CCR3	**CXCL16**		
CCL19	MIP-3ß/ ELC/Exodus-3	CCR7			
CCL20	MIP-3a/LARC Exodus-1	CCR6			
CCL21	SLC/6Ckine/Exodus-2	CCR7			
CCL22	MDC/STCP-1	CCR4	**XCL1**	Lymphotactin SCM-1ª/ATAC	XCR1
CCL23	MPIF-1	CCR1	**XCL2**	SCM-1ß	XCR1
CCL24	MPIF-2/Eotaxin-2	CCR3			
CCL25	TECK	CCR9			
CCL26	Eotaxin-3	CCR3, (CCR1,2,5)			
CCL27	CTACK/ALP ILC/Eskine	CCR10	**CX3CL1**	Fractalkine, neurotactin	CX3CR1
CCL28	MEC	CCR10,3			

6.4.2. Fonction

Toutes les protéines de cette famille ont en commun certaines propriétés particulières, en premier lieu le chimiotactisme : elles sont capables d'attirer leurs cellules-cibles, en particulier les leucocytes, proportionnellement au gradient de concentration qu'elles forment à partir de leur lieu de production.

Le premier rôle mis en évidence pour cette famille de protéines est le chimiotactisme des leucocytes. Les chimiokines ont la capacité de mobiliser les leucocytes pour permettre à ces derniers de quitter rapidement les vaisseaux sanguins pour venir s'accumuler sur les sites où se produit une infection ou une inflammation. Les évènements cellulaires qui sous-tendent cette migration se déroulent selon un scénario en trois actes : ralentissement des leucocytes circulants, adhérence à la paroi des vaisseaux sanguins par diapédèse, puis migration à travers les cellules endothéliales. Ce mécanisme implique une série d'interactions coordonnées entre les leucocytes et les cellules endothéliales qui nécessite une interconnexion très régulée entre les sélectines, les intégrines et les chimiokines. La migration de ces cellules entraîne une profonde transformation qui induit la redistribution des récepteurs de chimiokines, des intégrines, des protéines du cytosquelette et de différentes molécules intracellulaires (Kunkel and Godessart, 2002).

La circulation continue des lymphocytes à travers le sang et les tissus d'une manière organisée conduit les lymphocytes naïfs vers les ganglions lymphoïdes où ils peuvent rencontrer l'antigène et se transformer en lymphocytes mémoires pour migrer vers les tissus lésés pour y assurer la réponse immunitaire. L'augmentation forte de la sécrétion des chimiokines pendant l'inflammation résulte dans le recrutement sélectif de certains leucocytes, notamment les lymphocytes T au niveau des tissus lésés. Le potentiel des lymphocytes T à sécréter des chimiokines suggère que les lymphocytes T eux-mêmes jouent un rôle actif dans le recrutement d'autres types de leucocytes sur le locus de l'infection ou de l'inflammation (Mackay, 2001).

6.4.3. Classification structurelle

On distingue quatre sous-familles différentes de chimiokines selon l'interposition ou non d'acides aminés entre les deux premiers résidus cystéine amino-terminaux *(Figure 9)*.

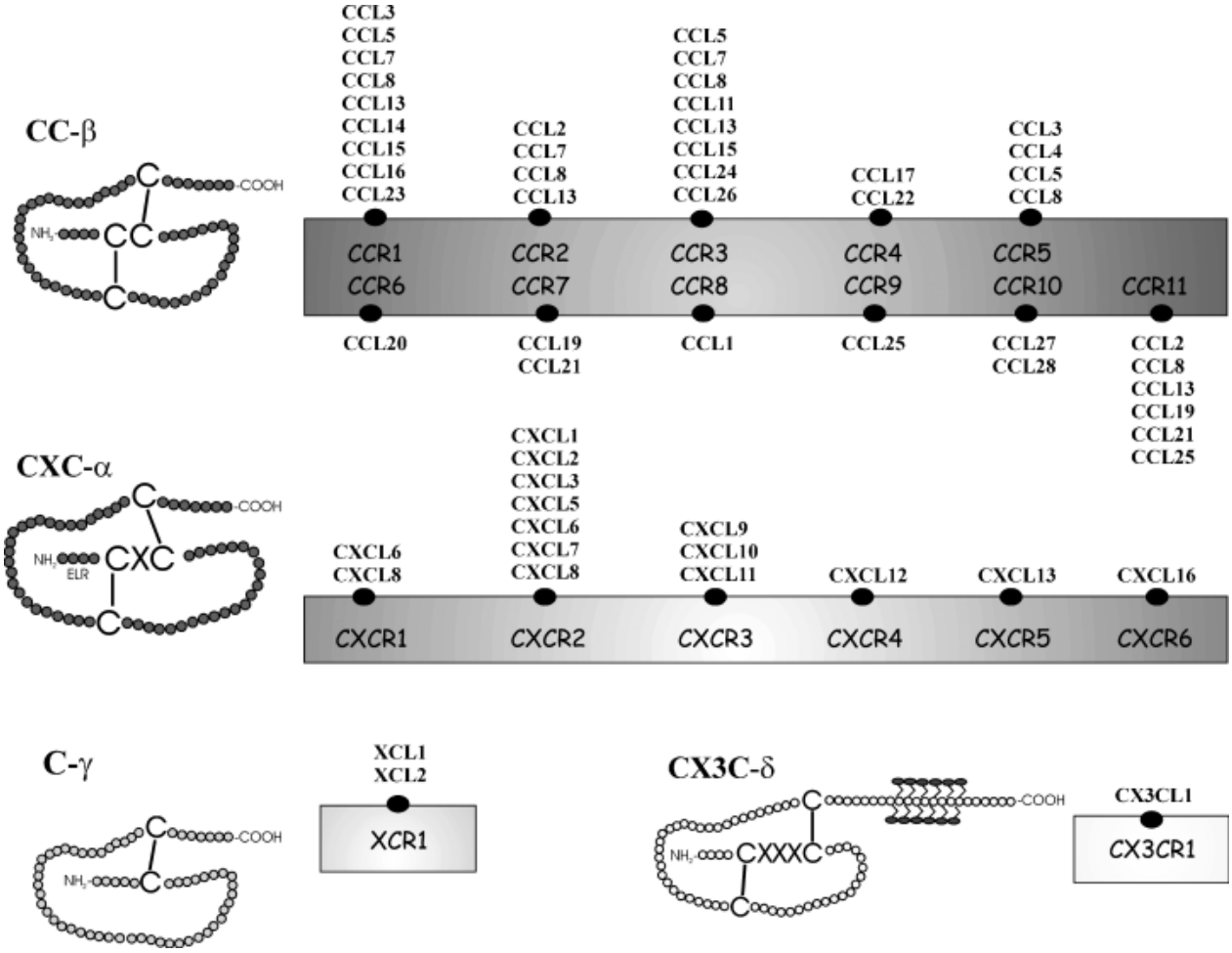


Figure 9 : Structure des chimiokines: Les différentes classes de chimiokines et leurs récepteurs (d'après Bajetto, *et al* 2002)

6.4.3.1. La sous famille des chimiokines CXC ou chimiokines α

Les deux premiers résidus cystéine conservés sont séparés par un seul acide aminé. Leurs gènes sont localisés sur le chromosome 4q12-21 chez l'homme, excepté celui de SDF-1 qui est localisé sur le chromosome 10q11. Elles sont également désignées chimiokines 4q *(Tableau V)*.

6.4.3.2. La sous famille des chimiokines CC ou chimiokines β

Les deux premiers résidus cystéine conservés sont adjacents. Leurs gènes sont localisés sur le chromosome 17q11-32 chez l'homme (chromosome 11 chez la souris). C'est pourquoi elles

sont également désignées chimiokines 17q. Certains membres de la famille des chimiokines β contiennent deux résidus additionnels de cystéine et sont parfois désignés C6-term-β-chimiokines *(Tableau V)*.

6.4.3.3. La sous famille des chimiokines C ou chimiokines γ

Elles diffèrent des autres chimiokines par l'absence de résidu cystéine conservé. Leurs gènes sont localisés sur le chromosome 1q23 chez l'homme *(Tableau V)*.

6.4.3.4. La sous famille des chimiokines CX3C ou chimiokines δ

Les deux premiers résidus cystéine conservés sont séparés par trois acides aminés. Ces protéines sont des glycoprotéines transmembranaires de type 1 avec le domaine chimiokine présent sur une extension mucine-like. Une forme soluble de la partie de chimiokine peut être libérée par un clivage extracellulaire. Le gène de l'unique membre connu est localisé sur le chromosome 16q13 chez l'homme *(Tableau V)*.

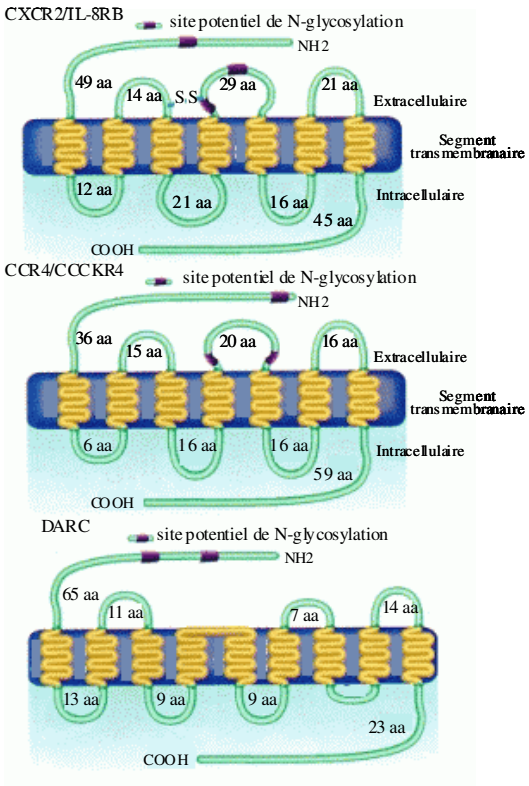
6.4.4. Les récepteurs au chimiokines

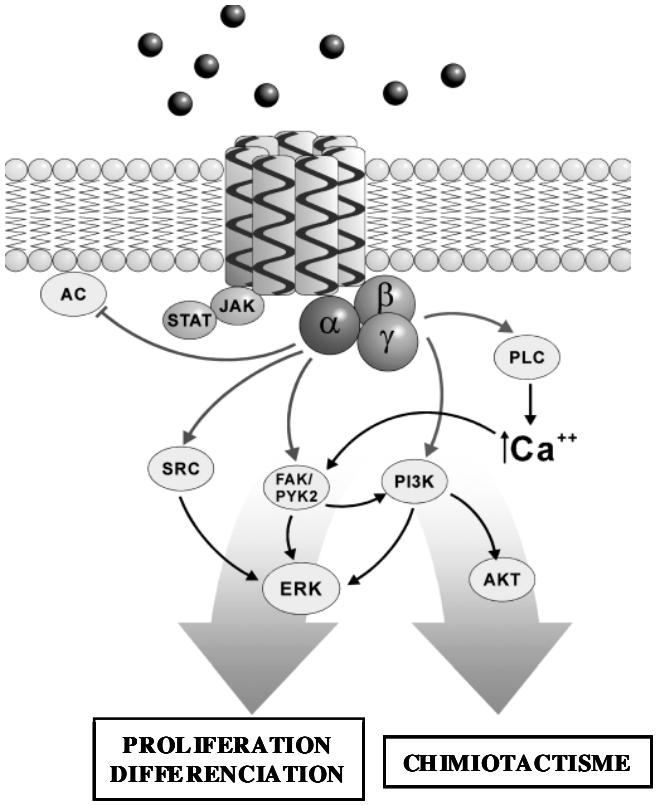
Les chimiokines exercent leur activité par l'intermédiaire de récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG), plus précisement à la famille 1, dont le modèle est la rhodopsine. Ils présentent tous un couplage avec les protéines G de la famille Gi/Go. Les récepteurs de chimiokines sont dénommés d'après la classe de chimiokines qu'ils lient. La nomenclature communément acceptée compte donc quatre familles de récepteur de chimiokines : CCR, CXCR, CX3CR et XCR. Actuellement il est dénombré sept récepteurs de la famille CXC (CXCR1 à CXCR7), onze récepteurs pour les chimiokines CC (CCR1 à CCR11), un récepteur pour la lymphotactine (XR1) et le récepteur de la fraktalkine (CX3CR1). À ces récepteurs classiques il est possible de ajouter D6 et Duffy (*Duffy antigen receptor for chemokine* ou DARC) qui sont également des RCPG mais qui ne sont visiblement pas capables de signaliser et sont donc exclus du système conventionnel classique. Chez l'homme, la plupart des récepteurs connus peuvent interagir avec plusieurs chimiokines d'un même groupe, et réciproquement une chimiokine peut se lier à plusieurs récepteurs *(Tableau V, Figure 9)* (Houshmand and Zlotnik, 2003). Chaque récepteur de chimiokine présente une spécificité de laquelle découle une spécificité pour un type de leucocytes. Néanmoins, du fait des liaisons croisées entre

chimiokines et récepteurs de chimiokines, cette spécificité cellulaire peut-être modifiée. Le couple SDF-1/CXCR4 avait été décrit jusqu'à présent comme l'exception puisqu'il s'agit d'un couple « monogame » (Bleul *et al.*, 1996; Oberlin *et al.*, 1996). En 2005, Balabanian *et al*, ont rapporté que RDC1 agit également en tant que récepteur pour SDF-1 sur des lymphocytes T et ils ont proposé la désignation CXCR7 pour ce récepteur (Balabanian *et al.*, 2005). Plus récemment, des résultats ont montré que CXCR7 qui se lie à SDF-1, lie également une deuxième chimiokine I-TAC (CXCL11) avec une très forte affinité (Burns *et al.*, 2006).

6.4.5. Signalisation des récepteurs de chimiokines

En réponse à la liaison de l'agoniste, les récepteurs de chimiokines interagissent avec les protéines G hétérotrimériques. Il semblerait que la dimérisation des récepteurs soit importante pour la transduction du signal (Rodriguez-Frade *et al.*, 1999; Vila-Coro *et al.*, 1999; Springael *et al.*, 2005). Les récepteurs de chimiokines sont souvent donnés en exemple de RCPG qui interagissent avec les protéines G de la famille αi/o (Baggiolini *et al.*, 1997). Les récepteurs CC pour RANTES, MIP-1α et MCP-1 semblent pouvoir se coupler aux protéines G de la famille αs et αq (Maghazachi and Al-Aoukaty, 1998). Les cellules de la microglie exprimant CXCR4 montrent une mobilisation de calcium intracellulaire en réponse à la liaison de SDF-1. Cette mobilisation de calcium est totalement inhibée par la toxine pertussique. A l'inverse, dans les astrocytes, cet effet n'est que partiellement inhibé par cette toxine, suggérant que CXCR4 est couplé à une autre classe de protéines G. Néanmoins et toutes exceptions mises à part, la littérature montre que les chimiokines peuvent activer la plupart des voies de signalisation liées aux RCPG. De par leur couplage aux protéines de la famille Gi, il est évident d'observer une baisse d'AMPc lié à l'inhibition de l'adénylate cyclase (Murphy *et al.*, 2000). D'autres voies de signalisation ont été mises en évidence et sont schématisées sur la *Figure 10* (Thelen and Baggiolini, 2001; Bajetto *et al.*, 2002).





(d'après le site R&D SYSTEMS)

(D'après Bajetto, Bonavia et al. 2002)

<u>Figure 10 :</u> Structure des récepteurs de chimiokines et leurs voies de signalisation

B-ROLE DU MICROENVIRONNEMENT HEMATOPOÏETIQUE DANS LA MIGRATION DES CELLULES SOUCHES ET DES PROGENITEURS HEMATOPOÏETIQUES

Au cours du développement, l'hématopoïèse est caractérisée par la colonisation successive de différents organes : foie, thymus, rate et moelle osseuse. Durant le développement embryonnaire, les cellules hématopoïétiques présentes dans la membrane vitelline et dans la région de l'aorte dorsale (AGM pour Aorto-Gonado-Mesonephros), puis dans le foie fœtal passent dans la circulation sanguine afin de se domicilier dans la moelle osseuse (Moore and Metcalf, 1970). La moelle osseuse est ainsi repeuplée par un ensemble de cellules sanguines immatures et en cours de différenciation dans l'ensemble des lignées hématopoïétiques. Une partie va ensuite être remise en circulation et un pool de cellules souches indifférenciées sera préservé au sein de la moelle osseuse (Wright *et al.*, 2001; Abkowitz *et al.*, 2003). Cette propriété de motilité des cellules souches, à savoir la migration, la domiciliation puis la mise en circulation dans le sang périphérique, est cruciale pour le développement hématopoïétique et la colonisation de la moelle osseuse.

Ces phénomènes de migration sont également observés au cours des greffes à l'occasion (i) de la mobilisation périphérique des CSH avec des facteurs de croissance hématopoïétiques et/ou de la chimiothérapie pour la collecte d'un greffon et (ii) du repeuplement de la moelle osseuse par les cellules greffées.

Dans ce chapitre, nous allons évoquer le rôle des différentes composantes du microenvironnement moléculaire dans la migration des CSH que ce soit lors de leur domiciliation au sein de la moelle osseuse ou lors de leur mobilisation dans le sang circulant.

1. LA DOMICILIATION DES CSH

Lors des greffes de CSH médullaires ou sanguines, les CSH sont injectées par voie intraveineuse dans l'hôte, migrent de la circulation vers la moelle osseuse, où elles reconnaissent le microenvironnement, avant de repeupler la moelle osseuse. Dans ce processus la domiciliation ou « homing » des CSH est définie comme la capacité de ces cellules à se diriger spécifiquement vers le stroma médullaire et à interagir avec lui pour ensuite le coloniser et initier l'hématopoïèse (Tavassoli and Hardy, 1990). Ce processus de

domiciliation des CSH est un processus en plusieurs étapes, assimilé à celui du recrutement des leucocytes lors de l'inflammation, dans lequel interviennent les molécules d'adhérence présentes à la surface des CSH et les cellules endothéliales médullaires (Springer, 1994). Les CSH doivent d'abord s'arrêter au contact de l'endothélium des capillaires irrigant les organes hématopoïétiques, puis doivent migrer au travers de cet endothélium et du stroma.

Pour être réalisée avec succès, la domiciliation nécessite que les cellules, arrivant de façon aléatoire dans la moelle osseuse, soient capables de reconnaître des signaux provenant des niches hématopoïétiques, signaux modulant leur comportement adhésif et leur motilité.

Plusieurs données anciennes ont suggéré que lorsqu'elles sont administrées par voie intraveineuse, les cellules n'étaient pas attirées sélectivement dans la moelle osseuse mais tout d'abord distribuées dans tous les tissus. Cependant, l'étape à laquelle avait lieu la domiciliation médullaire n'était pas claire. Le développement de modèles *in vitro* de migration transendothéliale et d'adhérence au stroma médullaire ainsi que de modèles *in vivo* de greffe de CSH dans des souris NOD/SCID a permis de mettre en évidence les médiateurs moléculaires intervenant dans la domiciliation des CSH (Papayannopoulou, 2003).

1.1. L'EXTRAVASATION PAR L'ENDOTHELIUM ET MIGRATION A TRAVERS LE STROMA

La migration sélective au niveau de l'endostéum ne concerne que les cellules hématopoïétiques très primitives contrairement aux cellules plus matures (Nilsson *et al.*, 2003). Cette migration sélective des cellules très primitives est dépendante de l'expression de l'acide hyaluronique et du *Receptor for Hyaluronate-Mediated Motility* (RHAMM). Le CD44 et leur ligand l'acide hyaluronique sont en effet essentiels pour le homing des CSH. Récemment une étude a montré que l'utilisation d'anticorps bloquants, le CD44 ou l'acide hyaluronique soluble inhibe la domiciliation des CSH vers la moelle osseuse et la rate de souris NOD/SCID. En effet, l'expression de SDF-1 par l'endothélium augmente l'affinité de CD44 pour l'acide hyaluronique et facilite la migration transendothéliale des CSH (Avigdor *et al.*, 2004).

1.1.1. Rôle des molécules d'adhérence et de leurs co-récepteurs

L'adhérence des CSH circulantes à l'endothélium est la première étape indispensable à la domiciliation des CSH. Cette adhérence n'est pas restreinte à l'endothélium médullaire

comme il aurait pu être possible de penser mais elle fait intervenir à la fois la E-sélectine, VLA-4 et LFA-1 (Rood *et al.*, 1999).

De façon analogue au recrutement des leucocytes matures sur la paroi vasculaire enflammée, les CSH présentes dans le sang vont être capturées par la E- et la P-sélectine constitutivement exprimées par l'endothélium médullaire (Kansas, 1996; Schweitzer *et al.*, 1996). Les interactions adhésives engendrées par la E- et la P-sélectine sont redondantes mais nécessaires à la domiciliation des CSH dans la moelle osseuse. En effet, les CSH de souris invalidées pour la E- et la P-sélectine restent dans la circulation (Frenette *et al.*, 1998) au contraire des CSH de souris invalidées pour l'un ou l'autre des deux gènes. Ces interactions font intervenir la sialomucine PSGL-1 exprimée par les CSH. Elles sont de faible affinité permettant de freiner les CSH entraînées par le courant circulatoire qui vont alors pouvoir rouler le long de l'endothélium médullaire. Les CSH vont ensuite s'arrêter sur cet endothélium grâce aux molécules VLA-4 et LFA-1 qu'elles expriment et qui vont réaliser des interactions fermes avec leurs récepteurs endothéliaux respectifs VCAM-1 et ICAM-1.

Dans l'étape suivante de migration transendothéliale, seule une faible proportion de CSH est capable de migrer spontanément *in vitro* à travers une couche de cellules endothéliales médullaires non stimulées. L'utilisation d'anticorps bloquants a permis de montrer que cette migration faisait surtout intervenir l'intégrine LFA-1 (Mohle *et al.*, 1997b) et la *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1* (PECAM-1), (Yong *et al.*, 1998) et moins l'intégrine VLA-4. En revanche, VLA-4 de même que VLA-5 joueraient un rôle crucial dans l'extravasation concomitante et la migration trans-stromale des CSH en réponse à SDF-1 ; cette migration nécessitant l'interaction entre les CSH et la MEC par l'intermédiare de la Fn, ligand de ces deux intégrines (Peled *et al.*, 2000).

VLA-4 joue également un rôle majeur dans la domiciliation des CSH puisque l'utilisation d'anticorps bloquants dirigés contre la chaîne $\alpha 4$ de VLA-4 (Papayannopoulou *et al.*, 1995; Zanjani *et al.*, 1999), de même que la perte de l'expression de l'intégrine $\beta 1$ par les progéniteurs murins (Szilvassy *et al.*, 2001) ou l'inhibition de l'interaction entre VLA-4 et VLA-5 et leurs sites de reconnaissance sur la Fn en utilisant des peptides recombinants (van der Loo *et al.*, 1998), inhibent totalement la domiciliation médullaire et partiellement la reconstitution hématopoïétique *in vivo* des CSH ou des CFU-S (Vermeulen *et al.*, 1998).

Plusieurs travaux réalisés *in vitro* ont montré le rôle particulier de l'intégrine VLA-4 et de son co-récepteur VCAM-1, par rapport à l'intégrine VLA-5 (Robledo *et al.*, 1998), dans l'adhérence des CSH au microenvironnement médullaire (Miyake *et al.*, 1991a; Miyake *et al.*, 1991b; Williams *et al.*, 1991; Simmons *et al.*, 1992; Teixido *et al.*, 1992; Oostendorp *et al.*, 1995). Il semble d'ailleurs que ce sont les cellules $CD34^+$ en cycle (phase $S+G_2/M$), qui

expriment plus fortement VLA-4 par rapport aux cellules $CD34^+$ quiescentes (phase G_0/G_1), qui présentent cette capacité d'adhérence au stroma médullaire (Yamaguchi *et al.*, 1998).

La contribution de l'intégrine β2 et des sélectines dans la domiciliation des CSH semble moins importante que celle de l'intégrine β1.

1.1.2. Rôle des facteurs de croissance hématopoïétiques

Il est maintenant bien acquis que les cytokines sont d'importants régulateurs de l'hématopoïèse agissant de concert avec les composants du microenvironnement médullaire (Dexter *et al.*, 1977; Tavassoli and Friedenstein, 1983; Torok-Storb, 1988). Les interactions adhésives avec la MEC et les cellules stromales retiennent les cellules $CD34^+$ au sein de la niche hématopoïétique proches des cytokines, permettant la mise en place de signaux de co-stimulation. Plusieurs études *in vitro* ont été réalisées afin de mettre en évidence ces signaux et décrypter les mécanismes responsables de la régulation de la fonction des molécules d'adhérence impliquées dans le maintien des CSH au sein du microenvironnement médullaire.

De cette manière, il a été mis en évidence que le SCF modulait de façon dose- et temps-dépendants la fonction des intégrines VLA-4 et VLA-5 à la surface de la lignée cellulaire mégacaryoblastique MO7e sans en modifier l'expression. Ainsi, un traitement de courte durée des cellules par le SCF entraîne une augmentation transitoire de leur adhérence aux HUVECs alors qu'un traitement prolongé entraîne une diminution importante de cette adhérence avec un maximum d'inhibition après 24 heures d'incubation (Kovach *et al.*, 1995).

Tout comme le SCF, le GM-CSF et l'IL-3 sont capables d'activer transitoirement VLA-4 et VLA-5 présentes à la surface des cellules $CD34^+$ médullaires ou sanguines, induisant une augmentation de l'adhérence de ces cellules à la fibronectine, sans modifier leur niveau d'expression. Le mécanisme « inside-out » de signalisation par lequel le GM-CSF et l'IL-3 stimulent la fonction de VLA-4 et de VLA-5 fait intervenir une activité protéine kinase, alors que celui du SCF fait intervenir une KIT tyrosine kinase (Levesque *et al.*, 1995; Schofield *et al.*, 1997).

La TPO quant à elle semble agir dans l'hématopoïèse précoce puisqu'elle stimule l'adhérence à la fibronectine des cellules $CD34^+CD38^-$ médullaires, et non pas celle des cellules $CD34^+CD38^+$, par l'intermédiaire d'une activation prédominante de VLA-5 selon un mécanisme dépendant d'une activité adénylate cyclase et tyrosine kinase (Cui *et al.*, 1997).

1.1.3. Rôle de la chimiokine SDF-1 et de son récepteur CXCR-4

L'axe formé par la chimiokine SDF-1 et son récepteur CXCR4 joue un rôle crucial dans la domiciliation des CSH. En effet, un déficit de l'hématopoïèse et la mort prématurée des souris CXCR4-/- ou SDF-1-/- pourraient être expliqués par l'incapacité des CSH à migrer du foie fœtal à la moelle osseuse pendant l'embryogénèse (Nagasawa *et al.*, 1996b; Zou *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 1999; Ara *et al.*, 2003). Le SDF-1 possède une activité chimiotactique majeure vis-à-vis des CSH (Aiuti *et al.*, 1997) et permet leur arrêt à la surface de l'endothélium médullaire en activant les intégrines (Peled *et al.*, 1999) puis leur migration transendothéliale (Peled *et al.*, 2000). Des expériences utilisant des anticorps bloquants montrent que la migration transendothéliale des CSH induite par SDF-1 est dépendante du récepteur CSCR-4 (Mohle *et al.*, 1998), des intégrines β1 et β2 exprimées par les cellules $CD34^+$ et du CD31 exprimé par les cellules endothéliales (Voermans *et al.*, 2000). En outre, il a été rapporté que SDF-1 augmente l'activité de VLA-4 et de LFA-1 et donc leur capacité à fixer leurs ligands respectifs VCAM-1 et ICAM-1 présents à la surface de l'endothélium (Hidalgo *et al.*, 2001) et qu'il module l'expression endothéliale de la E-sélectine lors de la migration transendothéliale des CSH (Naiyer *et al.*, 1999). Les interactions entre E-sélectine et son ligand (présent sur les CSH) créent une vitesse de roulement optimale qui permet la reconnaissance par les CSH des chimiokines fixées à la surface de l'endothélium tels que SDF-1 (Peled *et al.*, 1999). Par la suite les CSH présentes dans la moelle hématopoïétique vont migrer vers les niches en suivant un gradient de concentration de SDF-1 qui est produit en grandes quantités par les ostéoblastes (Ponomaryov *et al.*, 2000; Semerad *et al.*, 2005).

1.2. LOGEMENT DANS LA NICHE

Une série d'interactions entre les CSH et les composantes de la niche stromale vont ainsi s'établir. La localisation spatiale des CSH et de leurs progéniteurs est le résultat de facteurs spécifiques impliqués dans la migration qui aboutissent à la rétention de ces populations aux différents emplacements de la moelle osseuse. Le logement est défini comme la migration sélective des CSH à une place appropriée dans le compartiment extravasculaire de la moelle osseuse. Les CSH plus primitives sont localisées dans la région endostéale en contact avec l'os, alors que les PH sont redistribués de la région endostéale vers la région centrale de la moelle osseuse (Nilsson *et al.*, 2001; Kiel *et al.*, 2005).

Le logement des CSH dans la région endostéale de la moelle osseuse est favorisé par un gradient de calcium et des interactions avec la MEC. Une caractéristique de l'endosteum est l'augmentation de la concentration en calcium extracellulaire, lequel est en partie réabsorbé par les ostéoclastes. Adams *et al.*, ont montré par ailleurs qu'un gradient extracellulaire de calcium peut diriger le logement des CSH dans la niche par l'intermédiaire de leur récepteur (CaR). Ainsi, chez la souris CaR-/-, les cellules hématopoïétiques restent dans la circulation sanguine et la rate, tandis que peu sont retrouvées dans la moelle (Adams *et al.*, 2006).

Les ostéoblastes sont un composant essentiel de la niche hématopoïétique (Calvi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). Ils produisent différentes protéines des matrices extracellulaires telles que l'ostéopontine (Opn), la N-cadhérine et l'acide hyaluronique qui servent au nichage de CSH. L'ostéopontine contribue au logement des CSH dans la région endostéale de la moelle osseuse (voir chapitre 4.3.1.). Nilsson et al., ont démontré une distribution anormale des CSH après transplantation chez la souris Opn-/- par rapport aux souris sauvages (Nilsson *et al.*, 2005). L'acide hyaluronique joue également un rôle critique dans le logement des CSH dans la moelle osseuse. L'expression et la sécrétion de l'acide hyaluronique affectent de manière significative l'adhérence, la motilité et la croissance d'une grande variété de types de cellules. Il est présent dans différents organes et est un composant de la MEC dans le microenvironnement médullaire (Fraser *et al.*, 1997). Des CSH incubées ou non avec la hyaluronidase ont été injectées chez des souris pour étudier le rôle de l'acide hyaluronique dans le logement des CSH. Un changement significatif de la distribution spatiale des CSH traitées à la hyaluronidase a été trouvé chez la souris par rapport au CSH non traitées (Nilsson *et al.*, 2003).

2. LA MOBILISATION DES CSH/PH

Un pool limité de CSH médullaires en cycle (10 %) produit en continu de grandes quantités de cellules sanguines myéloïdes et lymphoïdes matures à durée de vie limitée qui sont libérées dans la circulation (Morrison *et al.*, 1995). Néanmoins, un très faible nombre de cellules progénitrices quiescentes, incluant des CSH multipotentes, sont également libérées dans la circulation.

Il est possible d'augmenter la libération des CSH et des progéniteurs dans la circulation dans le but de collecter un greffon pour être utilisé comme soutien hématopoïétique après des traitements anticancéreux à doses intensives.

Actuellement, les cellules souches (CS) sanguines sont la source prédominante de CSH pour les autogreffes, par rapport aux CS médullaires, car elles induisent une récupération hématologique plus rapide avec une diminution de la morbidité et de la durée d'hospitalisation et sont collectées plus facilement (par cytaphérèse) (Watanabe *et al.*, 1997; Gratwohl *et al.*, 2002).

La libération de CSH dans le sang périphérique de patients après chimiothérapie ou après stimulation par administration de cytokine a été documentée pour la première fois vers la fin des années 1970 et le début des années 1980 (To *et al.*, 1997). Ce processus, nommé mobilisation, peut être induit cliniquement ou expérimentalement dans des modèles animaux par de nombreuses molécules telles que des cytokines (G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-3, IL-7, IL-12), des agents chimiothérapeutiques (cyclophosphamide, paclitaxel) et des chimiokines (IL-8, SDF-1, MIP-1α). Ces molécules diffèrent dans leur capacité et leur mécanisme de mobilisation et dans le type de cellules mobilisées.

Malheureusement, des échecs de mobilisation sont possibles chez certains patients malgré l'utilisation de ces inducteurs (Fu and Liesveld, 2000). L'impossibilité de collecter un nombre adéquat de CS est souvent lié à un nombre multiple de cures de chimiothérapie avant la mobilisation responsables de dommages importants des cellules stromales (Bensinger *et al.*, 1995; Weaver *et al.*, 1995; D'Arena *et al.*, 1998).

2.1. LES DIFFERENTS INDUCTEURS DE LA MOBILISATION DES CSH/PH

2.1.1. Rôle des cytokines dans la mobilisation

2.1.1.1. Le G-CSF

Le facteur de croissance le plus utilisé actuellement est le G-CSF, habituellement administré à la posologie de 5 à 10 µg/kg/j pendant 5 à 10 jours associé ou non au cyclophosphamide (To *et al.*, 1997). La combinaison du G-CSF avec un agent chimiothérapeutique permet d'obtenir un meilleur rendement en terme de cellules $CD34^+$, ceci en diminuant le nombre de collectes nécessaires pour atteindre la quantité minimale de cellules $CD34^+$ requises pour une prise de greffe rapide et efficace (Watts *et al.*, 1997; Gazitt *et al.*, 1999). Par exemple, l'association G-CSF/cyclophosphamide, si elle induit la prolifération des cellules hématopoïétiques médullaires (Morrison *et al.*, 1997), permet une mise en circulation d'une quantité plus importante de cellules $CD34^+$ quiescentes (Roberts and Metcalf, 1995; Uchida *et al.*, 1997). Enfin, alors que la mobilisation des CSH avec du G-

CSF seul nécessite 4 à 5 jours, l'association avec un agent chimiothérapeutique allonge cette durée entre 10 et 14 jours.

Les mécanismes de la mobilisation des CSH par le G-CSF sont mal connus. Grâce à des modèles de souris invalidées pour le récepteur au G-CSF (G-CSFR), il a été montré que cette mobilisation nécessitait la présence du G-CSFR à la surface des cellules hématopoïétiques mais pas à la surface des cellules stromales (Liu *et al.*, 2000a). En effet, lorsque des souris irradiées déficientes pour le G-CSFR sont greffées avec des cellules médullaires (comportant des cellules matures et des cellules progénitrices) provenant de souris sauvages, elles présentent une mobilisation normale après traitement par le G-CSF (ou le cyclophosphamide). À l'inverse, lorsque des souris sauvages irradiées sont greffées avec des cellules médullaires de souris déficientes pour le G-CSFR, alors il n'est pas observé de mobilisation de CFC dans la circulation après traitement par le G-CSF. Cependant, l'administration de G-CSF chez des souris chimères constituées de cellules hématopoïétiques sauvages et déficientes pour le G-CSFR induit une augmentation similaire du nombre de CFC sauvages et déficientes pour le G-CSFR dans la circulation. Ces résultats suggèrent que si l'expression du G-CSFR à la surface des cellules hématopoïétiques est indispensable pour permettre la mobilisation des CSH, les CSH ne semblent pas concernées.

Actuellement les hypothèses suggèrent que le G-CSF interviendrait notamment en induisant la dégranulation des polynucléaires neutrophiles. Ce derniers infiltrent la moelle osseuse, libèrent des protéases telles que les métalloprotéases (MMP-2 et MMP-9) et les protéases à sérine, comme la neutrophile élastase (NE) et la cathepsine G (CG). Ce phénomène aboutit à la migration des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques des niches médullaires vers les sinusoïdes et, de là, vers la circulation. Les protéases coopèrent pour permettre le détachement et la migration des CSH vers la circulation d'une part, elles modifient les intéractions avec des molécules d'adhérence (les intégrines VLA-4, VLA-5 et LFA-1 avec leurs ligands fibronectine, VCAM-1 et ICAM-1/2 en particulier). D'autre part, elles vont cliver ou inactiver des molécules tels que la chimiokine SDF-1 et le SCF et leurs ligands respectifs CXCR4 et c-Kit.

2.1.1.2. Le GM-CSF

Le GM-CSF a également été utilisé pour mobiliser les CSH, ce facteur ayant été le premier disponible pour un usage clinique. Par rapport au G-CSF, le GM-CSF possède une capacité de mobilisation inférieure pour les cellules $CD34^+$ mais équivalente pour les CFU-GM et les

LTC-IC (Benboubker *et al.*, 2002).Actuellement, le GM-CSF n'est plus utilisé et n'est plus commercialisé.

2.1.1.3. Le FLT3-L

Le FLT3-L est un agent très efficace pour mobiliser les CSH alors que ce facteur est aussi capable d'induire une différenciation cellulaire des différentes lignées hématopoïétiques *in vivo* (Ramsfjell *et al.*, 1996; Brasel *et al.*, 1997) et *in vitro* (Molineux *et al.*, 1997). Le rôle du FLT3-L dans le processus de mobilisation n'est pas clairement défini même si des patients mauvais mobilisateurs après administration de cyclophosphamide plus G-CSF, GM-CSF ou G- + GM-CSF, présentent des taux significativement plus élevés de FLT3-L que les patients bon mobilisateurs (Gazitt and Liu, 2000).

2.1.1.4. Le SCF

L'association du G-CSF avec le SCF permet d'améliorer la mobilisation (Bodine *et al.*, 1993). En effet, l'addition du SCF augmente les taux circulants de CSH à très haute capacité de reconstitution hématopoïétique à long terme chez la souris, le chien, le singe ou l'homme. Ces résultats suggèrent que l'administration du G-CSF en combinaison avec d'autres cytokines telles que le SCF augmente les niveaux de prolifération médullaire juste avant la mobilisation et permet ainsi d'augmenter la production des cellules souches capables de repeuplement à long terme dans les protocoles cliniques (Verfaillie, 2002).

2.1.1.5. Les interleukines

L'IL-12 (Jackson *et al.*, 1995) et l'IL-3 (Rosenfeld *et al.*, 1996) induisent la prolifération des CSH *in vivo* et *in vitro* et sont aussi capables de mobiliser des CSH seules ou en synergie avec le G-CSF ou le GM-CSF chez l'animal et l'homme (Bodine *et al.*, 1996). L'IL-1 présente aussi une activité de mobilisation des CSH mais avec une faible efficacité.

2.1.2. Rôle des chimiokines dans la mobilisation

2.1.2.1. L'IL-8

L'interleukine-8 est produite par une grande variété de cellules incluant les monocytes, les neutrophiles, les fibroblastes, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales (Matsushima and Oppenheim, 1989). Plusieurs cytokines, telles que le TNF-α, les interleukines-1,-2 et -3 et le GM-CSF induisent la sécrétion d'IL-8, alors que le G-CSF induit l'expression de ses récepteurs CXCR-1 et CXCR-2 (Lloyd *et al.*, 1995; Fibbe *et al.*, 1999; Pruijt *et al.*, 1999c). L'administration d'IL-8 chez la souris et le singe entraîne une mobilisation rapide et efficace des CSH sanguines en quelques minutes puisque la quantité des CSH sanguines capables de permettre la survie d'animaux irradiés à dose létale est multipliée par 20 (Laterveer *et al.*, 1995). Le mécanisme d'action de l'IL-8 semble passer par LFA-1 puisque la chimiokine augmente l'expression de LFA-1 et que des anticorps anti-LFA-1, mais pas anti-VLA-4, bloquent la mobilisation induite par l'IL-8 (Pruijt *et al.*, 1998). Par ailleurs l'activité de l'IL-8 est dépendante de la présence des neutrophiles et de la MMP9 ((Pruijt *et al.*, 1999a; Pruijt *et al.*, 1999b)

2.1.2.2. Le SDF-1

Une mobilisation efficace des CSH murines a également été observée en réponse à une augmentation artificielle des taux circulants de SDF-1 suite à l'administration d'adénovirus exprimant SDF-1 (Hattori *et al.*, 2001) ou de met-SDF-1 (Shen *et al.*, 2001) chez des souris SCID. L'équipe de Sweeney a observé une augmentation rapide des taux de SDF-1 dans la circulation de souris et de primates suite à l'injection de polysaccharides sulfatés capables de former un gradient inverse mais transitoire de la chimiokine entre le sang et la moelle osseuse et permettant ainsi la mobilisation des CSH (Sweeney *et al.*, 2002). Cette capacité de certains polysaccharides sulfatés à libérer SDF-1 dans la circulation, contrairement aux facteurs de croissance ou aux anticorps anti-intégrines, est due à une compétition vis-à-vis des sites de reconnaissance de l'extrémité carboxy-terminale de SDF-1 présents sur l'endothélium médullaire. L'utilisation d'anticorps bloquants anti-SDF-1 réduit cette mobilisation induite par les polysaccharides sulfatés sans modifier le taux de leucocytes matures. Ces données suggèrent une différence de sensibilité vis-à-vis de la migration induite par SDF-1 entre les cellules immatures et matures.

2.2. ROLE DES PROTEASES DANS LA MOBILISATION

La migration des cellules hématopoïétiques normales et la dissémination métastatique de cellules tumorales partagent des mécanismes communs. La dégradation de la MEC (conjonctive ou de type membrane basale) qui accompagne la migration des cellules est essentiellement confinée à la surface cellulaire où des protéases et leurs récepteurs occupent une position stratégique pour aider les cellules à se frayer un chemin à travers les tissus. Les protéases sont soit intrinsèques à la membrane plasmique, soit solubles et sécrétées sous forme de précurseurs inactifs (zymogènes, pro-MMP), eux-mêmes activés par d'autres protéases. Parmi les différents systèmes enzymatiques impliqués, nous nous intéresserons ici aux sérines protéases (élastase leucocytaire, cathepsine G) et aux MMP. Ces endopeptidases, qui participent de concert au remodelage de la matrice extracellulaire, jouent un rôle important dans la mobilisation des CSH.

2.2.1.1. Les protéases à sérine

Les protéases à sérine sont caractérisées par la présence, au sein de leur site actif, d'un triplet sérine, histidine et acide aspartique. Elles comprennent des enzymes intracellulaires telles que la furine et les convertases PC-1-6 impliquées dans le clivage de précurseurs polypeptidiques (pro-hormones, zymogènes, récepteurs). De nombreuses enzymes extracellulaires font également partie de la famille des protéases à sérine : enzymes digestives (trypsine et chymotrypsine), lysosomales (cathepsine G, élastase leucocytaire) et fibrinolytiques (activateurs du plasminogène ou PA et plasmine).

Les protéases à sérine sont inhibées par des agents physiologiques, les serpines qui incluent : l'α1-antitrypsine (α1PI), l'α2-antichymotrypsine, l'α2-antiplasmine, les plasminogen activator inhibitors-1 et -2 (PAI-1 et -2) ainsi que la protéase-nexine 1 (PN-1) (Twining, 1994).

L'équipe de Levesque *et al.*, a montré le rôle des protéases à sérine dans la mobilisation induite par le G-CSF, le CY ou le Groβ, la NE et la GC sont libérées en grandes quantités sous une forme protéolytique active dans le stroma (Levesque *et al.*, 2001; Levesque *et al.*, 2002; Pelus *et al.*, 2004). Une fois libérées dans l'environnement médullaire, ces protéases peuvent cliver et inactiver un certain nombre de protéines essentielles au maintien des CSH dans la niche. Le degré de mobilisation chez l'homme est visiblement corrélé aux concentrations sanguines de NE (Levesque *et al.*, 2001). Pendant la mobilisation, VCAM-1

est directement clivé à la surface de cellules stromales permettant la mise en circulation des CSH, avec l'augmentation de la concentration de VCAM-1 soluble, et de NE dans le sang des patients mobilisés par le G-CSF. En effet, VCAM-1 est un substrat in *vitro* et *in vivo* de la NE et de la CG (Levesque *et al.*, 2001; Levesque *et al.*, 2002; Levesque *et al.*, 2004).

Le SDF-1 et son récepteur CXCR4 sont également des substrats de la NE et de la CG. Une dégradation *in vitro* de SDF-1 par la CG (Delgado *et al.*, 2001) et la NE (Valenzuela-Fernandez *et al.*, 2002) a été rapportée. Ces protéases clivent SDF-1 au niveau de son extrémité amino-terminale, rendant la chimiokine non fonctionnelle car ne pouvant plus reconnaître CXCR-4. De même, il a été rapporté que lors de la mobilisation *in vivo* des CSH le récepteur CXCR4 est aussi clivé par la NE et la CG (Levesque *et al.*, 2003a). Par ailleurs, la NE, la CG et la protéinase-3 libérées par les neutrophiles et les macrophages médullaires sont capables de cliver c-Kit présent à la surface des cellules hématopoïétiques ce qui explique la diminution de l'expression de c-Kit à la surface des cellules $CD34^+$ mobilisées chez la souris et chez l'homme (Levesque *et al.*, 2003b).

Des inhibiteurs spécifiques de NE peuvent réduire la mobilisation des CSH/PH de 60 à 70 % chez la souris (Petit *et al.*, 2002; Pelus *et al.*, 2004). Winkler *et al.*, ont récemment démontré lors de la mobilisation induite par le G-CSF ou le CY, que les concentrations de serpine-1 et serpine-3 (inhibiteurs spécifiques des sérines protéases) diminuent nettement dans la moelle osseuse, contribuant ainsi à augmenter les concentration de protéases à sérine (Winkler *et al.*, 2005). Récemment un blocage complet de la mobilisation induite par l'IL-8 a été montré en présence de la serpine-1 (van Pel *et al.*, 2006).

2.2.1.2. Les MMP

2.2.1.2.1. Structure et classification des MMP

Les métalloprotéases, ou *Matrix MetalloProteinase* (MMP) sont des endopeptidases qui contiennent un atome de zinc dans leur site actif. Les MMP font partie de la super-famille des metzincines qui inclut d'autres enzymes possédant un site métalloprotéase tels que les astacines, les adamlysines *A Disintegrin And Metalloprotease domain* (ADAM) et *A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin type I motif* (ADAM-TS), les serralysines, les snapalysines et les leishmaniolysines.

À ce jour, 24 MMP différentes ont été isolées chez l'homme, de la MMP-1, décrite pour la première fois en 1963, à la MMP-28, découverte en 2001 (Greenlee *et al.*, 2007). Les MMP-4, -5, et -6 ont été retirées de la liste quand il a été prouvé qu'elles étaient identiques à des

membres précédemment identifiés. Les MMP-18 et –22 correspondent à des métalloprotéases non humaines. Les gènes codant les MMP-1, -3, -7, -8, -10, -13, -20, -27 sont tous regroupés sur le chromosome 11 à proximité de la région 11q22 (Visse and Nagase, 2003). Les autres MMP sont codées par des gènes répartis sur les chromosomes 1, 8, 12, 14, 16, 20, et 22.

Les critères pour qu'une protéine appartienne de la famille des métalloprotéases matricielles sont la présence de 3 domaines conservés : un prédomaine permettant l'acheminement de la protéine à la surface cellulaire, un prodomaine et le groupement catalytique (*Figure 11*). Le prodomaine, d'environ 80 acides aminés, contient la séquence consensus Pro-Arg-Cys-Gly-(Val/Asn)-Pro-Asp dont le résidu thiol de la cystéine (motif « *cystein switch* ») établit une liaison avec l'atome de zinc du site actif permettant de maintenir la MMP sous forme zymogène (proMMP). Le domaine catalytique possède la séquence consensus His-Glu-X-His-XX-Gly-X-X-His dont les trois résidus histidinyl lient l'atome de zinc du site actif. À l'exception des MMP-7, -23 et -26, les MMP possèdent également une région charnière (*Hinge region*) riche en résidus prolyl et un domaine hémopexine dans l'extrémité C-terminale de la protéine qui intervient dans la spécificité de substrat. En se basant sur leur spécificité de substrat, leur homologie de séquence et leur organisation structurelle, les MMP ont été classées en différents groupes : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines et matrilysines (*Figure 11*). De plus, les MMP peuvent être classées selon qu'elles sont secrétées ou associées à la membrane.

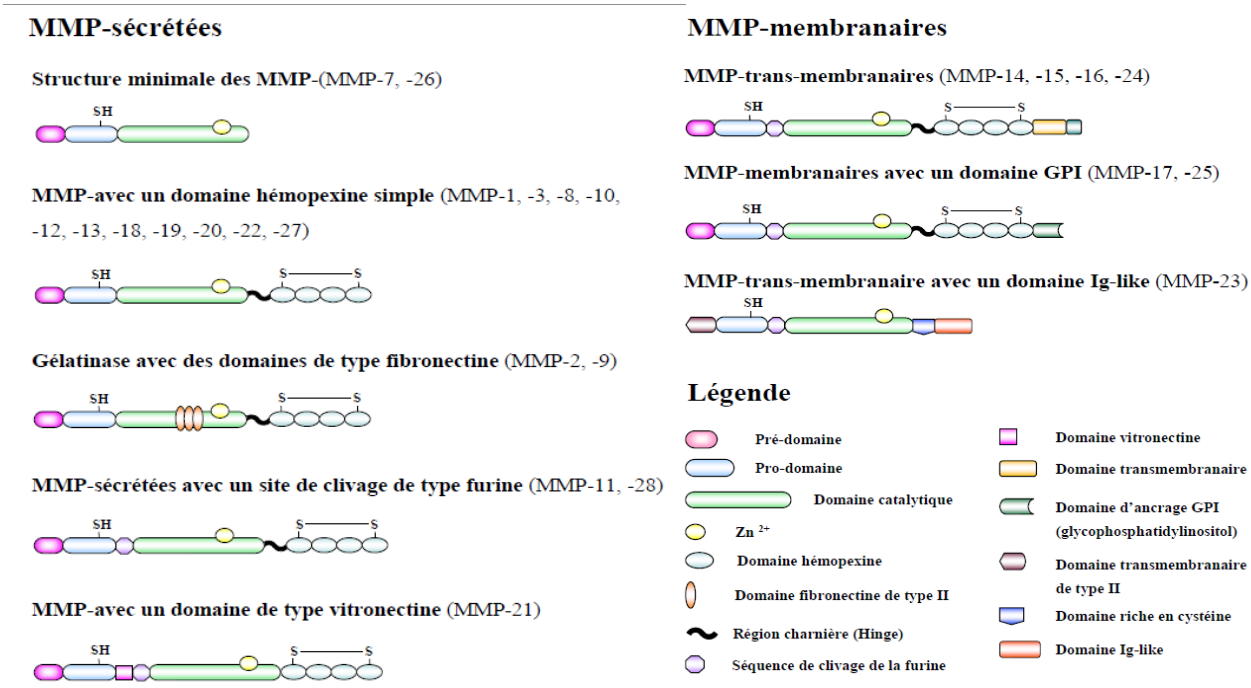


Figure 11 : Classification structurale des MMP sécrétées et membranaires. (D'après Egeblad & Werb, 2002)

¤ Les collagénases telles que les collagénases-1 (MMP-1), -2 (MMP-8) et -3 (MMP-13) sont les principales protéases sécrétées capables d'initier la dégradation de la MEC en protéolysant le collagène fibrillaire natif de type I-III et VII *(Tableau VI)*. Ces collagénases clivent la chaîne α du collagène générant ainsi des fragments N-terminal 3/4 et C-terminal 1/4 qui sont rapidement dénaturés en gélatine, laquelle sera à son tour dégradée par d'autres MMP.

La MMP-1 clive préférentiellement le collagène de type III, tandis que la MMP-8 dégrade le collagène de type I (Egeblad and Werb, 2002). La MMP-1 est produite par de nombreuses cellules telles que les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules tumorales.

La MMP-8 est synthétisée par les polynucléaires lors de leur maturation dans la moelle osseuse et est sécrétée en réponse à des stimuli externes. La MMP-13 clive préférentiellement le collagène de type II et possède une meilleure activité gélatinolytique que les MMP-1 et -8. Elle dégrade également les collagènes de type IV, IX, X, XV, la fibronectine, la laminine, le fibrilline-1 et les inhibiteurs de protéases à serine. En raison de son affinité pour de nombreux substrats, la MMP-13 est essentiellement exprimée dans les zones nécessitant un remodelage rapide de la MEC tel que le tissu osseux foetal en développement ou dans des conditions pathologiques lors d'inflammation chronique ou d'invasion tumorale.

¤ Les gélatinases (MMP-2 et -9) ont la particularité de posséder un domaine *Collagen Binding Domain* (CBD) situé au sein du domaine catalytique et comprenant trois domaines répétés analogues aux motifs de la fibronectine de type II. Ces motifs permettent la fixation de l'enzyme au collagène de type IV, à la gélatine et à la laminine (Allan *et al.*, 1995), composants majeurs de la MEC. Les substrats de la MMP-2 et de la MMP-9 sont proches mais toutefois non identiques *(Tableau VI)* (Bjorklund and Koivunen, 2005). En effet, la MMP-2 dégrade le collagène de type I, action non exercée par la MMP-9. Cette spécificité de substrat est attribuée au résidu S2 du site catalytique qui est un aspartyl pour la MMP-9 et un glutamyl pour la MMP-2. L'activité collagénolytique de la MMP-2 est ainsi bien plus faible que celle de la MMP-1. Cependant, la proMMP-2 étant recrutée à la surface cellulaire pour y être activée, elle possède une bonne activité gélatinolytique sur ou à proximité de la surface cellulaire (Nagase *et al.*, 2006).

Les gélatinases sont exprimées par de nombreuses cellules dont les fibroblastes, les cellules endothéliales et les monocytes pour la MMP-2 et les polynucléaires et les macrophages alvéolaires pour la MMP-9 (Johansson *et al.*, 2000). Elles sont également exprimées par de nombreuses cellules tumorales.

Tableau VI : Liste des MMP et de leurs substrats

MMP	Substrats principaux	Liste de production
MMP-1 Collagénase interstitielle (I)	Collagènes (types I, II, III, VII, VIII, X, XI), gélatine, fibronectine, IGFBP, laminine, vitronectine, a2-macroglobuline, a1-PI, caséine, CXCL12, fibrine, fibrinogène, IL-1ß, L-sélectine, pro-TNF-a,Perlecan, MMP-1, -2, -9	Macrophages, fibroblastes, cellules endthéliales
MMP-2 Gélatinase A	Collagènes (types I, II, II, IV, V, VII, X, XI), gélatine, élastine, fibronectine, IGFBP3, laminine, vitronectine, a2-macroglobulinea1-PI, CCL7, CXCL12, FGFR1, fibrine, fibrinogéne, IL-1b, plasminogène, TGF-b latent, pro-TNF-a, MMP1, -2, -9, -13	Lymphocytes T, macrophages, cellules tumorales, fibroblastes
MMP-3 Stromélysine I	Collagènes (types III, IV, V, VII, IX, X, XI, XVIII), gélatine, élastine, fibrine,fibrinogène, fibronectine, IGFBP, laminine, perlecan, vitronectine, a2-macroglobuline, a1-PI, caséine, CXCL12, E-cadhérine, IL-1ß, L-sélectine, PAI-1, plasminogène, pro-TNF-a, uPA, MMP-1, -2,-3, -7, -8, -9 -13	Lymphocytes T, macrophages, fibroblastes
MMP-7 Matrylisine I	Collagènes (types I, IV), gélatine, élastine, fibronectine, laminine, vitronectine, a1-PI, caséine, E-cadhérine, FasL, fibrinogéne, intégrine b4, plasminogène, pro-TNF-a, MMP1, -2, -9	Monocytes, fibroblastes, cellules tumorales
MMP-8 Collagénae neutrophile (II)	Collagènes (types I, II, III), a2-macroglobuline, a1-PI, fibrinogène, MMP-8	Polynucléaires neutrophiles, cartilage
MMP-9 Gélatinase B	Collagènes (types IV, V, XI, XIV, XVIII), gélatine, élastine, IGFBP3, laminine, vitronectine, a2-macroglobuline, a1-PI, caséine, CXCL1, CXCL4, précurseur du CXCL7, CXCL12, fibrine, fibrinogène, IL-1ß, CXCL8, IL-2Ra, plasminogène, TGF-ß, pro-TNF-a	Macrophages, neutrophiles, lymphocytes T, fibroblastes, cellules tumorales
MMP-10 Stromélysine II	Collagènes (types III, IV, V), gélatine, élastine, laminine, fibronectine, caséine, fibrinogène, MMP-1, -8, -10	Lymphocytes T, fibroblastes, macrophages
MMP-11 Stromélysine III	Collagène type IV, gélatine, fibronectine, laminine, IGFBP, a2-macroglobuline, a1-PI, PAI-2, caséine	Stroma tumoral, trophoblaste, fibroblaste foetal
MMP-12 Elastase macrophagique	Collagènes (types I, IV, V, XVIII), gélatine, élastine, fibronectine, laminine, vitronectine, a2-macroglobuline, a1-PI, caséine, fibrinogène, plasminogène, pro-TNF-a	Macrophages, trophoblaste
MMP-13 Collagénase III	Collagènes (types I, II, III, IV, VI, IX, X, XIV, XVIII), gélatine, fibronectine, a-macroglobuline, caséine, CXCL12, fibrinogène, MMP-9, -13	Adénocarcinome mammaire, cartilage

MMP	Substrats principaux	Liste de production
MMP-14 MT1-MMP	Collagènes (types I, II, III), gélatine, fibronectine, perlecan, laminine,vitronectine, a1-PI, a2-Macroglobuline, CD44, CXCL12, fibrine, fibrinogéne, intégrine av, pro-TNF-a, MMP-2, -13	Stroma tumoral, cellules tumorales, leucocytes
MMP-15 MT2-MMP	fibronectine, laminine, perlecan, pro-TNF-a	Cellules endothéliales, lymphocytes T, hépatocytes, cellules épithélilales biliaires, cytotrophoblaste, cellules de mélanome, cellules microgliales
MMP-16 MT3-MMP	Collagène III, gélatine, vitronectine, laminine, caséine, fibronectine, a2-macroglobuline, a1-PI,MMP -2	Inconnu
MMP-17 MT4-MMP	Gélatine, fibrine, fibrinogène, pro-TNF-a, MMP -2	Cellules endothéliales, leucocytes, macrophages, monocytes
MMP-18 Collagénase IV	Inconnu	Inconnu
MMP-19 RASI-1	Collagène (types I, IV), gélatine, fibronectine, laminine, caséine, fibrine, fibrinogène	Lymphocytes T, cellules endothéliales, kératinocytes, macrophages
MMP-20 Enamélysine	Collagène XVIII	Ameloblastes, odontoblastes, chondrocytes
MMP-21 X-MMP	Gélatine, caséine, MMP -2	Kératinocytes
MMP-23 CA-MMP	Gélatine	Fibroblastes, chondrocytes, ostéoblastes
MMP-24 MT5-MMP	Gélatine, fibronectine	Lymphocytes T, cellules endothélailes, neurones
MMP-25 MT6-MMP leucolysine	Collagène type IV, gélatine, fibronectine, fibrinogène, fibrine	Lymphocytes, polynucléaires, neutrophiles, monocytes
MMP-26 Matrysine 2	Collagène type IV, gélatine, fibrinogène, fibronectine, vitronectine, caséine, a2-macroglobuline, a1-PI, E-cadhérine, FasL	Lymphocytes B, entérocytes, globule rouge fœtal, trophoblaste, kératinocytes, cellules endométriales
MMP-27 CMMP	Gélatine, caséine	Lymphocytes B
MMP-28 Epylisine	Caséine	Kératinocytes, lymphocytes T

¤ Les stromélysines (MMP-3, -10 et -11) ont une organisation structurelle de leur domaine similaire aux collagénases mais elles ne clivent pas le collagène interstitiel. Les stromélysines -1 et -2 (MMP-3 et -10) ont un spectre protéolytique étendu qui inclut de nombreuses glycoprotéines et des protéoglycanes. Les MMP-3 et MMP-10 ont une activité protéolytique envers les composants de la MEC et sont exprimées par les fibroblastes et les cellules épithéliales normales ou transformées. La MMP-11 quant à elle à un rôle important dans le clivage des inhibiteurs de protéases à sérine (Pei *et al.*, 1994) et est principalement exprimée dans les tissus tumoraux et faiblement pour les cellules du microenvironnement

¤ Les matrilysines, MMP-7 (matrilysine-1) et MMP-26 (matrilysine-2) sont les MMP structurellement les plus simples et se caractérisent par l'absence du domaine hémopexine. La MMP-7 clive de nombreux composants de la MEC mais également des molécules de surface et est synthétisée par les cellules épithéliales de l'endomètre, de la peau, des voies respiratoires et également par les cellules tumorales d'origine épithéliale. La MMP-26 est principalement exprimée par les cellules normales et les carcinomes d'origine épithéliale. contrairement à de nombreuses MMP, elle est majoritairement stockée en intra-cellulaire (Marchenko *et al.*, 2004)

¤ Les MMP membranaires (MT-MMP), les MMP-14, -15, -16, et -24 (respectivement MT1-, MT2-, MT3- et MT5-MMP), possèdent un domaine transmembranaire de type I suivi d'un petit domaine C-terminal cytoplasmique. Deux MMP membranaires, les MMP-17 et -25 (respectivement MT4- et MT6-MMP), présentent une région hydrophobe de type GPI (glycosylphosphatidylinositol) qui permet leur ancrage à la membrane. La MT1-MMP est exprimée par les fibroblastes du derme, les cellules épithéliales malignes. De nombreux tissus expriment les MMP membranaires. Ainsi, la MT3-MMP et la MT5-MMP sont présentes dans le tissu pulmonaire et rénal. Il a été montré que ces 2 protéases membranaires existent également sous la forme de MMP soluble. L'expression des MT2- et MT3-MMP a été observée dans le placenta et le coeur. Dans le cerveau, les MT2-, MT4- et MT5-MMP ont également été décrites (Visse and Nagase, 2003).

La MMP-23 est une MMP transmembranaire qui ne possède pas de peptide signal et qui est ancrée dans la membrane par sa séquence N-terminale du pro-domaine (Fillmore *et al.*, 2001; Visse and Nagase, 2003). Ce pro-domaine est très court et ne présente pas de motif « *cysteine switch* ». Le clivage, entre le pro-domaine et le domaine catalytique, par les furines permet donc à la fois l'activation et la sécrétion de la MMP-23. De plus, la région charnière et le domaine hémopexine sont remplacés par un domaine riche en résidus cystéinyl et prolyl et

par un domaine IgG-like. La MMP-23 est principalement exprimée dans les tissus des organes reproducteurs et aurait un rôle fonctionnel dans le poumon et le coeur (Fillmore *et al.*, 2001).

2.2.1.2.2. Substrats des MMP

De nombreux substrats ont été décrits pour les MMP, notamment les composants de la MEC dont le clivage facilite la migration cellulaire *(Tableau VI)*. Bien qu'elles aient un substrat préférentiel, le spectre protéolytique des différentes MMP est assez large ce qui permet la dégradation de l'ensemble des protéines de la MEC. Cependant, le clivage des composants de la MEC tels que la laminine 5, le collagène de type IV, XV et XVIII peut générer des fragments avec de nouvelles fonctions favorisant ou au contraire inhibant l'invasion tumorale ou l'angiogenèse (Polette *et al.*, 2004). Le plasminogène est également dégradé par les MMP- 3, -7, -9 et –12 ce qui génère un fragment capable d'inhiber la prolifération des cellules endothéliales (Cornelius *et al.*, 1998).

Les molécules d'adhérence font également partie des substrats des MMP. Ainsi, la MMP-3 et la MMP-7 clivent la E-cadhérine (Noe *et al.*, 2001) tandis que le CD44 est clivé par la MT1-MMP (Kajita *et al.*, 2001) ce qui va faciliter la dissémination et la migration des cellules tumorales.

De plus, de nombreuses molécules capables de réguler l'expression des MMP peuvent à leur tour être un substrat des MMP. Ainsi, les MMP participent également au relargage de précurseurs membranaires des facteurs de croissance comme le TGF-β qui peut être libéré après clivage par les MMP-2 et –9 (Yu and Stamenkovic, 2000). Le bFGF peut être relargué après dégradation du perlecan des cellules endothéliales par les MMP-1 et -3 (Whitelock *et al.*, 1996). Les récepteurs des facteurs de croissance tels que *Human Epidermal growth factor Receptor/neu* (HER2/neu) et HER4, qui font partie de la famille des EGFR, sont également des substrats des MMP (Vecchi *et al.*, 1998; Codony-Servat *et al.*, 1999). Le récepteur du FGF-1 (*Fibroblast Growth Factor*), FGFR-1, est clivé par la MMP-2 (Levi *et al.*, 1996). La MMP-7 est capable de générer la forme soluble de Fas Ligand et de potentialiser l'apoptose de cellules épithéliales (Powell *et al.*, 1999).

Les MMP peuvent également cliver des inhibiteurs de protéases. Ainsi, les MMP-2, -7, -9 et –12 clivent l'inhibiteur de protéase-1 (α_1-PI) (Liu *et al.*, 2000b).

2.2.1.2.3. Régulation des MMP

Les MMP sont exprimées physiologiquement dans les tissus lors du développement et lors de processus physiologiques ou pathologiques nécessitant une migration cellulaire et un remodelage tissulaire. Leur activité peut être régulée à différents niveaux, lors de la transcription du gène, par activation protéolytique du zymogène et par l'inhibition de l'activité de l'enzyme. L'activité des MMP va donc dépendre de l'équilibre entre leur activation et leur inhibition.

¤ Activation des zymogènes en forme active

Les MMP sont sécrétées sous formes inactives (pro-MMP) et le clivage du prodomaine est une étape indispensable à la génération des formes actives (Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990). Ce processus nécessite la rupture de la liaison entre l'atome de zinc et le résidu thiol de la cystéine du pro-domaine par des protéases telles que la plasmine, la trypsine, la chymase ou la tryptase. De nombreuses MMP sont également capables d'activer des pro-MMP et peuvent aussi s'activer elles-mêmes. Toutes les MT-MMP possèdent un site de clivage par les protéases de type furine situé entre le propeptide et le domaine catalytique qui permet l'activation des formes latentes des MT-MMP. Ainsi, les MT-MMP, sont activées au niveau intracellulaire par une furine convertase alors que l'activation des MMP solubles intervient soit à la surface cellulaire, soit au niveau de la MEC. Les MT-MMP interviennent également dans l'activation protéolytique des autres MMP. Par exemple, la pro-MMP-2 est activée par toutes les MT-MMP, exceptée par la MT4-MMP (English *et al.*, 2000). Les mécanismes conduisant à la formation des MMP actives sont donc complexes avec de nombreuses voies d'activation croisées. Ainsi, l'activation de la MMP-9 met en jeu les MMP-1, -2, -3, -7, -10, -13 et -26, mais également d'autres protéases comme la trypsine-2 ou l'élastase leucocytaire. Plusieurs études *in vitro* ont montré une activation de la MMP-9 par la MMP-3, elle-même étant activée par la plasmine (Ogata *et al.*, 1992; Ramos-DeSimone *et al.*, 1999).

La MMP-2 est quant à elle activée par un processus particulier mis en jeu au niveau de la membrane cellulaire *(Figure 12)*. La pro-MMP-2 se lie ainsi à la MT1-MMP par l'intermédiaire de *Tissue Inhibitor of MetalloProteinases-2* (TIMP-2) formant un complexe trimoléculaire (Strongin *et al.*, 1995; Kinoshita *et al.*, 1998). Le domaine N-terminal de TIMP-2 se fixe à la MT1-MMP alors que son domaine C-terminal interagit avec le domaine hémopexine de la MMP-2 (Riches *et al.*, 2009).

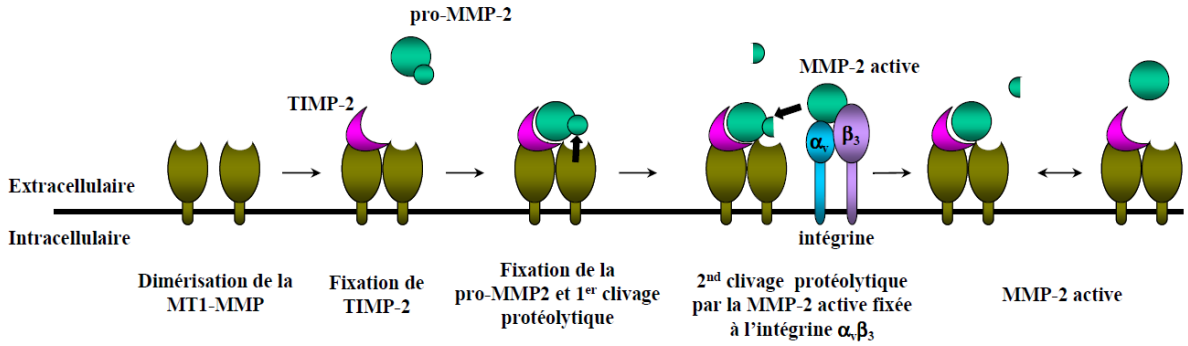


Figure 12 : Mécanisme d'activation de la pro-MMP-2 par le complexe MT-1-MMP/TIMP-2 à la surface cellulaire

La formation de ce complexe à la surface de la cellule permet à une seconde molécule de MT1-MMP de cliver le pro-domaine N-terminal de la pro-MMP-2 au niveau de la liaison peptidique Asn37-Leu38. La protéine formée est une forme intermédiaire de MMP-2 de 64 kDa, partiellement activée, et qui est hydrolysée au niveau des résidus Asn80-Tyr81 par une molécule de MMP-2 déjà active et liée à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, permettant de générer la forme mature de MMP-2 (Deryugina *et al.*, 2001). TIMP-2 participe donc à l'activation de la MMP-2 mais lorsqu'il est présent en excès, l'activation est bloquée (Strongin *et al.*, 1995). TIMP-3 et TIMP-4 peuvent également se fixer à la pro-MMP-2 et à la MT1-MMP. Toutefois le complexe incorporant TIMP-4 ne génère pas de MMP-2 active vraisemblablement en raison d'un assemblage moléculaire inadapté par rapport à celui formé avec TIMP-2 ou TIMP-3 (Hernandez-Barrantes *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2004). Certaines MMP sont également activées sans clivage du prodomaine après un changement conformationnel observé lors de la fixation de la MMP au substrat et favorisant le clivage de la liaison entre le groupement thiol du prodomaine et l'atome de zinc.

¤ Inactivation des MMP

Les inhibiteurs régulant l'activité des MMP exercent un rôle critique dans l'homéostasie de la MEC. De nombreux inhibiteurs directs des MMP sont décrits tels que la famille des TIMP, *REversion inducing Cystein rich protein with Kazal motif* (RECK), l'α- macroglobuline ainsi que des fragments de digestion du collagène comme l'endostatine par exemple (Greenlee *et al.*, 2007; Fu *et al.*, 2008) *(Figure 13)*.

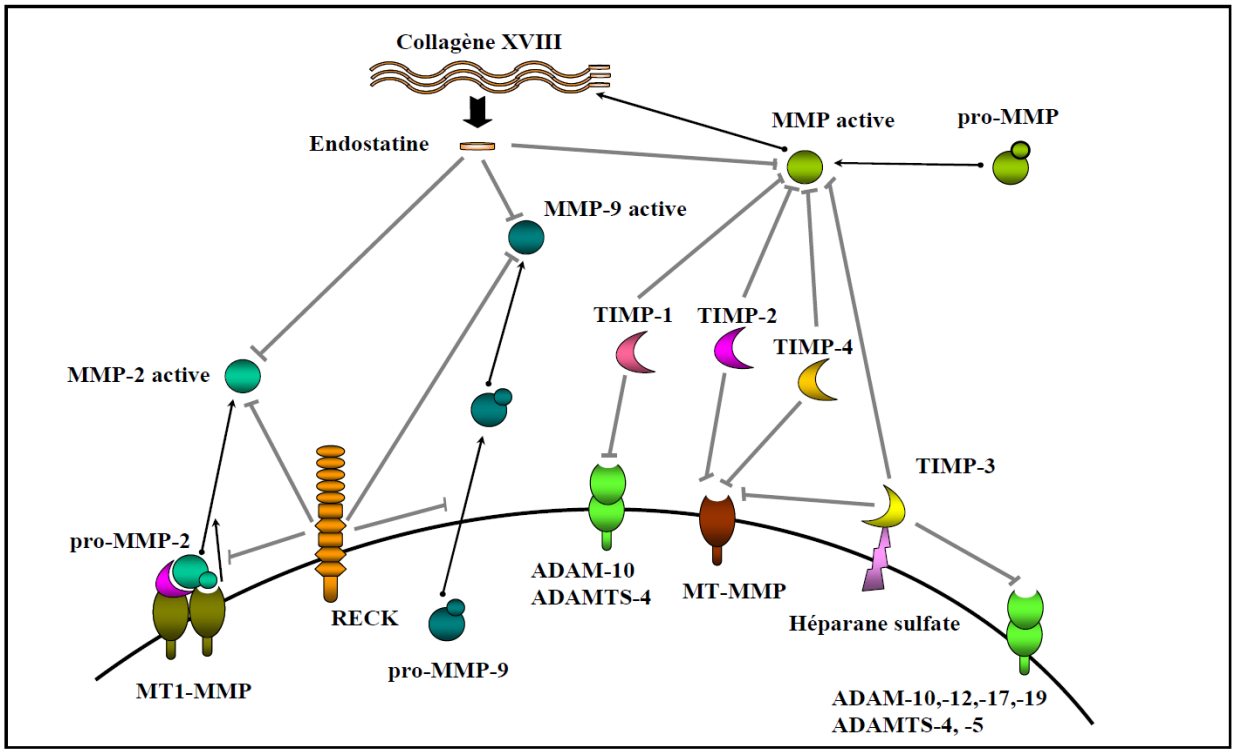


Figure 13 : Les inhibiteurs directs de MMP.

Les TIP inhibent l'ensemble des MMP, bien que TIMP-1 n'inhibe pas les MMP membranaires (MT-MMP). TIMP-1 et TIMP-3 inhibent également ADAM et ADAMTS. RECK inhibe la MMP-2, la MMP-9 et la MT1-MMP. D'autre part, RECK régule également la sécrétion de la pro-MMP-9. L'endostatine est un produit de dégradation du collagène XVIII par les MMP, qui inhibe l'activité de nombreuses MMP, notamment les MMP-2 et -9.

L'activité catalytique des MMP est controlée par des inhibiteurs physiologiques. Il existe 3 groupes différents de molécules inhibant les métalloprotéases. Le premier comprend les TIMP, RECK et endostatine qui inhibent directement les MMP. Le second groupe comprend des protéines qui régulent indirectement l'activité des MMP en inhibant la plasmine, et les serpines PAI-1, PAI-2 et le TFPI-2. Enfin, un troisième groupe comprend des molécules augmentant la clairance des MMP, telles que les protéines de type *Low density lipoprotein Receptor-related Protein* (LRP), les thrombospondines 1 et 2 ou l'α2-macroglobuline.

2.2.1.2.4. Rôle des MMP dans la migration des CSH

La dégradation de la MEC qui accompagne la migration des cellules est essentiellement confinée à la surface cellulaire où des protéases et leurs récepteurs occupent une position

stratégique pour aider les cellules à se frayer un chemin à travers les tissus. Le profil d'expression des MMP dans les monocytes/macrophages varie en fonction de l'état de différenciation cellulaire ; ainsi les macrophages synthétisent et sécrètent les MMP-2 et -9. L'expression et/ou la sécretion des MMP par les macrophages est modifiée au cours de leur migration sur différents composants matriciels, en effet, leur contact avec la laminine induit non seulement l'expression de MMP-1, mais aussi celle de MMP-9. Les cellules dendritiques ainsi que de nombreuses cellules du tissu conjonctif telles que les fibroblastes, les cellules endothéliales, les ostéoblastes, les ostéoclastes et les cellules épithéliales sont capables de produire MMP-9 après une activation adéquate.

L'équipe de Levesque *et al.,* ont montré le rôle de MMP-9 dans la mobilisation des CSH. Lors de la mobilisation induite par le G-CSF, le CY ou le Groβ, la MMP-9 est libérée dans le stroma en grandes quantités sous une forme protéolytique active. Une fois libérées dans l'environnement médullaire, ces protéases peuvent cliver et inactiver un certain nombre de protéines essentielles au maintien des CSH dans la niche. La dégradation *in vitro* de SDF-1 par la MMP-9 a été rapportée (McQuibban *et al.*, 2001) ainsi que son clivage au niveau de son extrémité N-terminale. Le degré de mobilisation chez l'homme est visiblement corrélé avec les taux sériques de MMP-9 (Levesque *et al.*, 2001; Carstanjen *et al.*, 2002; Carion *et al.*, 2003). Chez la souris, les données sont plus contradictoires. En effet, la mobilisation des leucocytes est altérée chez des souris invalidées pour MMP-9 lorsque le G-CSF est administré à 50µg/kg/j (Heissig *et al.*, 2002) alors qu'elle est normale lorsque le G-CSF est administré à 250µg/kg/j (Robinson *et al.*, 2003). En fait, il semble qu'à cette dernière dose, le G-CSF induit la libération dans la moelle osseuse de protéases telles que le NE et la CG (Levesque *et al.*, 2002). La présence de ces enzymes permettrait alors de compenser la déficience en MMP-9 chez les souris MMP-9-/-. La MMP-9 libérée par les neutrophiles et les macrophages médullaires est capable de cliver le c-Kit présent à la surface des cellules $CD34^+$ mobilisées chez l'homme et chez la souris (Levesque *et al.*, 2003b). Le clivage de c-Kit par la MMP-9 a été aussi rapporté pendant la mobilisation induite par le 5-fluorouracil (5-FU) (Heissig *et al.*, 2002). De même, des Ac bloquants anti-MMP-9 sont capables d'inhiber également la mobilisation induite par IL-8 ou Groβ de 90 % et la mobilisation induite par G-CSF de 40 % chez la souris (Pruijt *et al.*, 1999a; Pelus *et al.*, 2004).

La MMP-2 est une protéase dont les activités reconnues sont actuellement surtout reliées à la dégradation des protéines de la MEC et à l'activation des autres MMP. Les cellules $CD34^+$ sécrètent constitutivement non seulement la pro-MMP-2 mais également MMP-14 et TIMP-2, qui sont les composants nécessaires à l'activation de la pro-MMP-2. Les macrophages, les cellules endothéliales et les CSM synthétisent et sécrètent également la MMP-2. L'activation

de la MMP-2 est un des principaux points de départ de la casacade d'activation des MMP, donc de l'augmentation du niveau de protéolyse de la MEC. La MMP-2 active un bon nombre de MMP dont la MMP-9 (Fridman *et al.*, 1995).

2.2.1.3. Autres protéases

Il existe également d'autres protéases impliquées dans la mobilisation des CSH comme le CD26/dipeptidylpeptidase IV (DPPIV), qui est une ectopeptidase transmembranaire capable de cliver SDF-1 (Schols *et al.*, 1998; Lambeir *et al.*, 2001; Christopherson *et al.*, 2002). Cette protéase est exprimée sur un grand nombre de cellules hématopoïétiques, y compris les lymphocytes B, les cellules natural killer, les lymphocytes T, les cellules endothélailes, les fibroblastes, et les cellules épithéliales. Il est important de noter que la mobilisation des CSH/PH induite par le G-CSF est réduite de 50 à 80 % chez les souris invalidées pour le gène CD26 (Christopherson *et al.*, 2003a; Christopherson *et al.*, 2003b). De même, des souris traitées avec des inhibiteurs des CD26 montrent une diminution du nombre de cellules mobilisées. Ceci suggère un rôle important de cette protéase dans la mobilisation induite par le G-CSF. En effet, le traitement par du G-CSF augmente l'activité et l'expression de CD26 sur les CSH, ayant pour résultat une dégradation de SDF-1 et donc une diminution de la réponse chimiotactique à cette chimiokine. (Christopherson *et al.*, 2006)

2.3. LES INTERACTIONS MOLECULAIRES MAJEURES INTERVENANT DANS LA MOBILISATION

Une autre donnée en faveur du rôle du couple SDF-1/CXCR-4 dans la mobilisation des CSH est la relation entre la faible expression de CXCR-4 sur les cellules $CD34^+$ circulantes et les taux élevés de cellules $CD34^+$ mobilisées chez des patients traités par cyclophosphamide et chimiothérapie (Gazitt and Liu, 2001; Voermans *et al.*, 2001; Carion *et al.*, 2003). Le rôle crucial de l'intéraction SDF-1/CXCR4 dans le maintien des CSH au sein du microenvironnement medullaire a été prouvé par leur capacité de mobilisation par un analogue de SDF-1, l'AMD3100, notament chez l'homme (Liles *et al.*, 2003; Broxmeyer *et al.*, 2005)

2.3.1. Rôle des intégrines dans la mobilisation

La migration des cellules des espaces extravasculaires de la moelle osseuse vers la circulation exige une succession d'étapes réversibles d'adhérence dans un ordre coordonné. Les molécules d'adhérence exprimées par les CSH ou par les cellules stromales dans la moelle sont cruciales dans ce processus. L'interaction entre les α4 intégrines, en particulier α4β1 (VLA-4) exprimée par les CSH et VCAM-1 par les cellules stromales sont décisives pour le maintien des CSH au sein de la niche hématopoïétique (Arroyo *et al.*, 2000; Kronenwett *et al.*, 2000). Plusieurs études comparant le phénotype membranaire des cellules $CD34^+$ médullaires à celui des cellules $CD34^+$ mobilisées par le G-CSF ont montré une diminution de l'adhérence au stroma (Carion *et al.*, 2002; Broxmeyer *et al.*, 2005). Ces données suggèrent que la libération des cellules $CD34^+$ et leur capacité à circuler sont reliées au niveau de l'expression et/ou à la fonction de VLA-4 (Leavesley *et al.*, 1994; Mohle *et al.*, 1995; Prosper *et al.*, 1998; Yamaguchi *et al.*, 1998; Bellucci *et al.*, 1999; Dave *et al.*, 2000; Lichterfeld *et al.*, 2000; Gazitt, 2001). Concernant LFA-1, les données sont plus contradictoires, montrant une expression tantôt diminuée (Mohle *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1997; Bellucci *et al.*, 1999), tantôt augmentée (Asosingh *et al.*, 1998; Fruehauf *et al.*, 1998; Kroger *et al.*, 1998) à la surface des cellules $CD34^+$ du sang par rapport à la moelle osseuse.

L'inhibition de l'interaction VLA-4/VCAM1 par l'administration d'Anticorps anti-VLA-4 ou anti-VCAM-1 (Papayannopoulou and Nakamoto, 1993; Vermeulen *et al.*, 1998; Kikuta *et al.*, 2000) ou la délétion du gène α4 intégrine (Rubinson *et al.*, 2003) ou du gène VCAM-1 (Ulyanova *et al.*, 2005) induit la mobilisation des CSH dans la circulation. Ces résultats ont été récemment confirmés chez l'homme (Bonig *et al.*, 2008; Zohren *et al.*, 2008) .L'intégrine β 2 pourrait elle aussi intervenir dans la mobilisation des CSH mais de façon plus accessoire puisque l'administration d'anticorps anti-LFA-1 (mais pas anti-ICAM-1) augmenterait la mobilisation induite par le G-CSF (Papayannopoulou *et al.*, 2001a; Velders *et al.*, 2002).

2.3.2. Rôle de SDF-1α et son récepteur CXCR4

Au niveau moléculaire, l'interaction entre la chimiokine SDF-1 α et son récepteur CXCR4 a été identifié comme essentielle dans la mobilisation des CSH. Il est maintenant clair que la mobilisation implique (i) une perturbation du gradient de SDF-1 dans la moelle osseuse par l'action des protéases sécrétées par le microenvironnement médullaire après l'administration de G-CSF, de cyclophosphamide ou l'interleukine-8, et (ii) une diminution de la réponse des

CSH au gradient de CXCL12, due à la diminution de l'expression de CXCR4 (ou à sa dégradation) par les CSH.

Les cellules $CD34^+$ mobilisées par le G-CSF, du GM-CSF ou du CY montrent une diminution de l'expression de CXCR4 (Gazitt, 2001; Carion *et al.*, 2003). Un grand nombre de CFC et de cellules $Lin^-Sca1^+Kit^+$ est retrouvé dans la circulation chez des souris ayant été transplantées avec des cellules de foie fœtal CXCR4-/- (Liles *et al.*, 2003; Tavor *et al.*, 2004; Flomenberg *et al.*, 2005; Foudi *et al.*, 2006). De même, la désensibilisation artificielle de CXCR4 *in vivo* aboutit à la mobilisation des CSH/PH (Shen *et al.*, 2001). Par ailleurs, la rupture du couple SDF1/CXCR4 par l'administration de l'antagoniste de CXCR4 AMD-3100 conduit à la mobilisation des CSH dans le sang périphérique (Liles *et al.*, 2003; Broxmeyer *et al.*, 2005). Le même effet est observé en bloquant la voie de signalisation des protéines G par la toxine pertussique (Papayannopoulou *et al.*, 2001b). Chez la souris doublement déficientes pour Rac1 et Rac2, il est observé une sortie massive des CSH/PH vers la circulation. Ces dernières sont incapables d'engendrer la prise de greffe bien qu'elles se domicilient normalement dans la moelle osseuse (Gu *et al.*, 2002).

2.3.3. Rôle du stem cell factor et de son ligand c-Kit

Plusieurs études suggèrent un rôle important du récepteur c-Kit/CD117 dans la mobilisation des CSH vers le sang périphérique. Une diminution de l'expression de c-Kit à la surface des cellules $CD34^+$ du sang mobilisé a été montrée (Simmons *et al.*, 1994; To *et al.*, 1997; Roberts *et al.*, 1999; Heissig *et al.*, 2002; Levesque *et al.*, 2003b). Le clivage de c-Kit par les protéases (la NE, la CG, la protéinase-3 et la MMP-9) pourrait entraîner une inhibition de la voie d'activation de VLA-4 et VLA-5 par le SCF (Levesque *et al.*, 1995; Kim and Broxmeyer, 1998; Papayannopoulou *et al.*, 1998) et permet d'expliquer la diminution de l'expression de c-Kit à la surface des cellules $CD34^+$ du sang mobilisé. De même, chez la souris W/W^v dont le c-Kit n'est pas fonctionnel du fait de l'absence d'activité kinase il est montré une altération de la mobilisation des CSH (Cynshi *et al.*, 1991; Papayannopoulou *et al.*, 1998). L'ensemble de ces résultats indique que c-Kit joue un rôle important non seulement dans la domiciliation de CSH dans la moelle osseuse mais aussi dans leur mobilisation vers la circulation.

OBJECTIFS

1- Quel est le rôle des CSM au niveau de la niche hématopoïétique ?

Dans une première partie nous nous sommes intéressés à la nature des cellules stromales qui composent les niches hématopoïétiques : elles pourraient être constituées soit de CSM non différenciées soit de cellules plus ou moins engagées dans les voies de différenciation mésenchymateuse.

- Quelle est la capacité des CSM dans la régulation du soutien de l'hématopoïèse ?

- Quelle est la capacité des CSM dans la migration des progéniteurs hématopoïétiques ?

- Comment évolue leur fonction hématopoïétique au cours des trois différenciations A, O ou V et cela à différents stades des différenciations, compte tenu de la composition du microenvironnement médullaire, ces différenciations sont pertinantes dans la moelle osseuse ?

2- Quel est le rôle des CSM dans la mobilisation des progéniteurs hématopoïétiques ?

En complément de la première partie du travail, nous nous sommes intéréssé plus précisement aux rôles des CSM non différenciées dans la migration de cellules $CD34^+$.

- Comment répondent les CSM à une stimulation directe par le G-CSF ?

- Quels mécanismes permettent une plus grande migration des cellules $CD34^+$?

MATERIELS ET METHODES

1. CELLULES UTILISEES

Les cellules ont été conservées dans un incubateur (IG 150®, Jouan, St Herblain, France) à 37°C sous une atmosphère humide contenant 5 % de CO_2. Pour éviter toute contamination bactérienne, toutes les manipulations ont été effectué sous une hotte à flux laminaire de type PSM II (MSC 12®, Jouan). La viabilité cellulaire a été contrôlée à l'aide d'un colorant d'exclusion, testant l'intégrité des membranes cellulaires, le bleu Trypan.

1.1. LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES

Les cellules souches mésenchymateuses étaient issues de patients hospitalisés dans les services d'orthopédie 1&2 de l'hôpital Trousseau à Tours. Une ponction était réalisée en crête iliaque au cours de l'intervention motivant l'hospitalisation après consentement écrit des patients. Vingt microlitres de moelle osseuse étaient prélevés et conditionnés dans de l'acide citrique dextrose (ACD). Le prélevement de moelle osseuse a été rincé avec de l' *Hank's Buffered Salt Solution* (HBSS) 1X (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) puis centrifugé à 250 g pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules nucléées totales, après un comptage au Lazarus (Invitrogen) permettant de lyser les globules rouges, ont été mises en culture à la concentration de 1.10^6 cellules/mL, dans un milieu de prolifération composé de 88 % d'αMEM sans nucléotides (Invitrogen), supplémenté de 10 % de SVF (Invitrogen), 2 mM de L-Glutamine (Invitrogen), 100 U/mL de Pénicilline-100 µg/mL de Streptomycine (Invitrogen) et 1 ng/mL de FGF2 (AbCys, Paris, France). Après 48 heures, le milieu de culture était changé, et les cellules non adhérentes (leucocytes, globules rouges,…) éliminées. Deux fois par semaine, la totalité du surnageant est renouveler. Le développement de la couche stromale a été vérifié au microscope inversé en contraste de phase (Leica, DM IL Wetzlar ; Leica microsystèmes, Nanterre, France). Lorsque la couche adhérente a atteint 80 % de confluence (après environ 21 jours), un lavage avec du PBS 1X (Invitrogen) de la couche cellulaire a été effectué pour éliminer toute trace de sérum, afin d'avoir une action optimale de la trypsine- EthyleneDiamineTetraacetic Acid (EDTA). Les cellules ont alors été incubées pendant 3 minutes à 37°C, avec 3 mL de 0,05 % trypsine-EDTA (Invitrogen), de façon à décoller les cellules adhérentes au support. Après vérification au microscope inversé du décollement de toutes les cellules, 10 mL de milieu d'entretien ont été ajoutés pour arrêter l'action de la 0,05 % trypsine-EDTA. La suspension cellulaire a ensuite été récupérée dans un tube de 15 mL (BD FALCON, VWR, Fontenay sous bois, France), puis centrifugées 5

minutes à 250 g, afin de récupérer le culot cellulaire pour effectuer une numération à l'hématimètre et un test de viabilité au bleu trypan (Invitrogen). Les cellules ont ensuite été ré-ensemencées à $2{,}5.10^4$ cellules/mL pour garantir une bonne expansion cellulaire. Lorsque les cellules étaient arrivées à confluence elles ont été une nouvelle fois soumises à l'action de la trypsine et ont été utilisées pour les tests de migration, de co-culture ou d'immunofluorescence. Toutes les cellules stromales ont été utilisées au second passage (P2).

1.2. LES CELLULES HEMATOPOÏETIQUES

1.2.1. Les cellules MO7e

La lignée cellulaire MO7e est issue d'une leucémie mégacaryoblastique humaine dont les cellules expriment le récepteur au SDF-1, CXCR4, au même niveau que les cellules $CD34^+$ (Avanzi *et al.*, 1988). Les MO7e ont été cultivées en flacons de 75 cm² (BD FALCON) à 37°C et en présence de 5 % de CO_2. Le milieu de culture complet utilisé est composé d'Iscove 1X supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF, Invitrogen), 2mM L-Glutamine, 100U/mL de Pénicilline 100µg/mL de Streptomycine (Invitrogen), 0,2 % de β-mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), en présence de 10ng/mL de GM-CSF (AbCys).

La lignée cellulaire a été conservée dans l'azote liquide à -196°C et la décongélation a été réalisée rapidement au bain marie à 37°C. Après un comptage au bleu Trypan les cellules ont été mises en culture à une concentration de 2.10^5 cellules/mL. Pour garantir une bonne amplification cellulaire les cellules ont été comptées et réensemencées dans les conditions de culture usuelle. La suspension cellulaire a été reprise en totalité, centrifugée à 250g pendant 10 minutes. Le culot obtenu a été remis en suspension dans le milieu d'entretien sous un volume de 1 mL pour effectuer la numération et la viabilité au bleu Trypan à l'aide de l'hématimètre de type cellule de Malassez (Fastread®, Fisher Scientific, Strasbourg, France). La concentration cellulaire a été ajustée à 2.10^5 cellules vivantes/mL en milieu d'entretien puis la suspension cellulaire déposée dans un nouveau flacon de culture (BD FALCON) contenant 10 mL de milieu complet et mise à l'étuve à 37°C sous 5 % de CO_2.

1.2.2. Les cellules $CD34^+$

Les cellules $CD34^+$ humaines utilisées dans cette étude sont issues d'une ponction médullaire au niveau de l'os iliaque effectuée sur un patient, ayant donné son consentement

éclairé (Service d'Orthopédie 1&2 de l'Hôpital Trousseau de Tours, Pr Ph. Rosset) à partir de laquelle a été réalisée une sélection des cellules hématopoïétiques par une sélection positive du cluster de différenciation CD34.

Pour effectuer la sélection $CD34^+$, un gradient de Ficoll (5 mL de moelle osseuse sur 3 mL de Ficoll (Invitrogen)) a été effectué afin de récupérer les cellules mononucléées de la moelle totale (sous la forme d'un anneau), pour ensuite sélectionner les cellules $CD34^+$ par la méthode *EasySep*® (StemCell Technologies ; Grenoble, France), qui est une méthode de sélection positive par couplage de nanoparticules magnétiques et d'anticorps tétramériques permettant la détection du cluster de différenciation CD34 et du dextran des particules.

Après un lavage des cellules mononucléées dans 20 mL de tampon de sélection, composé de PBS/SVF (Invitrogen) 2 % et EDTA à 0,5 mM et une centrifugation à 250 g pendant 10 minutes, une numération a été effectuée pour connaître le volume de solution d'anticorps « *human CD34 positive Selection Cocktail* » (100 µL pour 2.10^7 cellules), après une incubation de 15 minutes, 15 µL de nanoparticules ont été ajoutées pour 2.10^7 cellules. Après une incubation de 10 minutes, le volume a été complété à 2,5 mL avec du milieu « *Easy sep* », puis la suspension a été placée dans un aimant pendant 5 minutes.

La suspension a été vidée par retournement rejetant les cellules $CD34^-$ et non les $CD34^+$ qui sont restées aimantées aux parois du tube. Après un rinçage, les cellules $CD34^+$ ont été centrifugées à 250 g pendant 10 minutes, une numération a été effectuée afin de congeler les cellules sous une concentration de 1.10^4 cellules/mL, les cellules ont été congelées dans un milieu contenant 90 % de SVF (Invitrogen) et 10 % DMSO (Sigma-Aldrich) qui est un cryoprotecteur.

Les cellules ont été placées dans l'azote liquide à -196°C pour assurer une bonne conservation.

Pour réaliser les différentes expériences, les aliquots ont été décongelés de façon progressive dans un milieu de décongélation composé d'HBSS 1X, 2 % de SVF, 0,1 % de DNase (Sigma-Aldrich).

1.3. LES CELLULES STROMALES MURINES

La lignée cellulaire stromale murine MS-5 a été établie à la fin des années 80 (Itoh *et al.*, 1989) après l'irradiation de culture à long terme de cellules de moelle osseuse adhérente. Les

cellules MS-5 n'expriment pas la phosphatase alcaline, la peroxydase, et le facteur VIII, et sont positives pour les aldhéydes et pour les estérases non spécifiques. Les cellules produisent des protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, la laminine et le collagène de type 1.

Elles ont été mises en culture à la densité de 2.10^4 cellules par cm^2 dans un milieu conditionné composé de 88 % d'αMEM sans nucléotides (Invitrogen), supplémenté de 10 % de SVF, 100 U/mL de Pénicilline-100 µg/mL de Streptomycine (Invitrogen). Le milieu est renouvelé deux fois par semaine jusqu'à étbalissement d'une couche stromale. Les cellules sont contrôlées au microscope inversé en contraste de phase (Leica, DM IL Wetzlar ; Leica microsystèmes) jusqu'à l'obtention d'une couche adhérente d'au moins 90 % de confluence.

1.4. LES LIGNEES D'OSTEOSARCOMES

CAL 72 est une lignée décrite récemment par l'équipe du Pr. Rochet (Rochet *et al.*, 1999). Elle est issue d'un sarcome ostéogénique anaplasique chez un enfant de 10 ans. Elle présente des anomalies génétiques avec une délétion du chromosome Y, et des anomalies en 1q-, 3p, 7p+,17q+,19q+,21q+.

Elles ont été mises en culture à la densité de 16.10^4 cellules par cm^2 dans un milieu conditionné composé de 88 % d'αMEM sans nucléotides (Invitrogen), supplémenté de 5 % de SVF, 100 U/mL de Pénicilline-100 µg/mL de Streptomycine (Invitrogen). Le milieu est renouvelé deux fois par semaine. Après environ 7 jours, les cellules observées au microscope inversé en contraste de phase (Leica, DM IL Wetzlar ; Leica microsystèmes) forment une couche adhérente d'au moins 80 % de confluence.

1.5. LES CELLULES VASCULAIRES

MRC-5 est une lignée cellulaire adhérente de fibroblastes diploïdes issus de poumons foetaux humains (Jacobs *et al.*, 1970). Créé à partir de tissu pulmonaire normal d'un foetus de 14 semaines de sexe masculin. Ces cellules atteignent 60-70 doublements de population avant la sénescence. Les cellules ont été mises en culture à une concentration de 2.10^4 cellules/cm^2 dans un milieu spécifique composé de 88 % d'αMEM sans nucléotides (Invitrogen), supplémenté de 5 % de SVF (Invitrogen), et 100 U/mL de Pénicilline-100 µg/mL de Streptomycine (Invitrogen). Les cellules sont incubées à 37°C avec une atmosphère à 5 % de CO_2. Le milieu est renouvelé deux fois par semaine. Lorsque les cellules sont arrivées a une confluence de 70-80 % les cellules sont réensemmencés en utilisant la trypsine 0,25 % EDTA.

1.6. LES CELLULES ENDOTHELIALES

La lignée cellulaire TrHBMEC pour *transformed human bone marrow endothelial cells* est issue de cellules endothéliales microvasculaires de moelle osseuse humaine (Schweitzer *et al.*, 1997). Elles ont été obtenues à partir d'endothélium humain de moelle osseuse immortalisé par l'antigène T du virus SV40. Elles ont été gracieusement fournies par le Dr. Babette Weksler (Weill Medical College of Cornell University, Division of Hematology-Oncology, New-York, USA).

Les cellules ont été mises en culture à la concentration de 1.10^4 cellules/cm^2 dans un milieu spécifique composé de 88 % d'αMEM$^+$ (Invitrogen), supplémenté de 5 % de SVF (Invitrogen), 2 mM de L-Glutamine (Invitrogen) et 100 U/mL de Pénicilline-100 µg/mL de Streptomycine (Invitrogen). Le milieu est renouvelé deux fois par semaine. Après environ trois jours, les cellules observées au microscope inversé en contraste de phase (Leica, DM IL Wetzlar ; Leica microsystèmes) forment une couche adhérente d'au moins 80 % de confluence. Les cellules ont été décollées de leur support grâce à l'action de la trypsine-EDTA, centrifugées 5 minutes à 250 g et ont été numérées à l'hématimètre. Puis, elles ont été ré-ensemencées en boite de culture de 75 cm^2 (BD FALCON) à 1.10^4 cellules/cm^2 pour garantir une bonne expansion cellulaire.

1.7. LES CELLULES DE TERATOCARCINOME EMBRYONNAIRE

Les cellules NTera-2 (cellules pluripotentes de tératocarcinome humain embryonnaire, clone D1, ECACC, Sigma-Aldrich) ont été cultivées dans du milieu DMEM (Invitrogen) supplémenté avec 10 % de SVF (Invitrogen), de la pénicilline à 100 U/ml, de la streptomycine à 50 µg/ml et de la Fungizone® à 50 µg/ml (Invitrogen) à 37°C en présence de 5 % de CO_2 et d'une hygrométrie à 95 %. Une fois le tapis cellulaire à 90 % de confluence, le milieu de culture a été éliminé et les cellules ont été décollées par incubation de 5 min à 37°C avec une solution de trypsine-EDTA (Invitrogen). Les cellules ont ensuite été re-suspendues dans du milieu complet et ont été centrifugées 10 min à 300 g à 4°C. Les cellules ont été ensemencées à une densité de 5.10^6 cellules/75cm² afin de maintenir les cellules toujours à une densité assez forte.

2. INDUCTION DES CSM EN DIFFERENCIATION

2.1. CULTURE

2.1.1. Différenciation adipogénique (A)

Une fois les cellules arrivées à confluence, elles ont été incubées en présence d'un milieu spécifique composé de DMEM (Invitrogen) et de 20 % de SVF (Invitrogen) avec des inducteurs tels que l'indométhacine à 60 µM (Sigma-Aldrich), le 3-isobutyl-1-méthyl xanthine (IBMX à 0,5 mM, Invitrogen) et de la déxaméthasone à 10^{-6} M (Sigma-Aldrich). Ce milieu a permis d'induire l'apparition de vésicules lipidiques caractéristiques de cette voie de différenciation.

2.1.2. Différenciation ostéogénique (O)

Les cellules arrivées à confluence, ont été mises en présence d'un milieu composé de DMEM (Invitrogen), de 10 % de SVF ainsi que des inducteurs spécifiques : l'acide L ascorbique à 0,15 mM (Sigma-Aldrich), le NaH_2PO_4 à 3 mM (Invitrogen) et la dexamethasone à 10^{-7} M (Sigma-Aldrich). Ce milieu a permis la production d'un dépôt de calcium caractéristique des ostéoblastes.

2.1.3. Différenciation vasculaire musculaire lisse (V)

Les cellules ont été incubées en présence d'un milieu dit milieu de Dexter composé de Mc Coy's (Invitrogen) supplémenté par 12,5 % de SVF (Invitrogen), 12,5 % de sérum de cheval (Invitrogen), 5.10^{-3} M de bicarbonate (Invitrogen), 10^{-6} M d'hydrocortisone (Sigma-Aldrich), 10^{-4} M d' acides aminés essentiels et non essentiels (Invitrogen), 10^{-6} M de vitamines (Invitrogen), 10^{-3} M de pyruvate de sodium (Invitrogen), 2.10^{-3} M de glutamine (Invitrogen), 8.10^{-4} M de sérine (Sigma-Aldrich), $1,5.10^{-4}$ M d'asparagine (Sigma-Aldrich), 100 U/mL de Pénicilline-100 µg /mL de Streptomycine (Invitrogen) et par $2,7.10^{-7}$ M de Fungizone® (Invitrogen).

2.1.4. Différenciation chondrogénique (C)

Les cellules ont été incubées en présence d'un milieu spécifique composé de DMEM contenant 3 M de glucose (Invitrogen) complété avec les inducteurs spécifiques : l'acide L ascorbique 2 phosphate (170 mM ; Sigma-Aldrich), le pyruvate de sodium (1mM ; Invitrogen), la proline (0,35 mM ; Sigma-Aldrich), l'insuline-transférine-sélénium (ITS ; 0,2 % ; Cambrex, Paris, France) et la dexaméthasone (10^{-7}M ; Sigma-Aldrich). Elles ont ensuite été centrifugées à 250 g à 4°C pendant 10 min et re-suspendues à une concentration de 25.10^4 cellules/500 µL pour les CSM. Elles ont ensuite été réparties dans des tubes Falcon de 15 mL (BD FALCON) puis à nouveau centrifugées à 350 g à 4°C pendant 10 min. Les culots cellulaires obtenus ont ensuite été placées à 37°C dans un incubateur. Vingt quatre heures plus tard, ils ont été détachés de la paroi des tubes par une légère agitation. Ce milieu va permettre la formation des protéoglycanes et des glysaminoglycanes spécifique de la voie chondrogénique.

Ces milieux de différenciation ont été renouvelés tous les trois jours pendant 14 jours pour la différenciation adipogénique et jusqu'à 21 jours pour les différenciations ostéogénique, chondrogénique et vasculaire musculaire lisse.

2.2. CARACTERISATION DE L'EFFICACITE DE DIFFERENCIATION

La capacité de différenciation des CSM dans les quatre voies adipogénique (A), ostéogénique (O), vasculaire musculaire lisse (V) et chondrogénique (C) a été testée par différentes techniques de coloration, d'immuno-histochimie et d'immuno-empreintes.

Après rinçage des cellules au PBS 1X pour les différenciations A, V et C ou à l'eau distillée pour la différenciation O puisque ici, l'utilisation du PBS est déconseillée car celui-ci contient des phosphates pouvant perturber la détection de ceux présents dans la matrice extracellulaire. Les cellules ont été fixées au méthanol à -20°C pendant 10 minutes à 4°C.

2.2.1. Colorations

2.2.1.1. Différenciation Adipogénique

La formation de vésicules lipidiques a été observée par une coloration au Rouge de Nile 1X en jaune. Au terme de l'incubation de 30 minutes à 4°C les cellules ont été lavées puis mises en présence d'un agent intercalant, le DAPI (Vectashield® ; AbCys), présent dans le milieu de montage. L'observation a été faite sous une lumière incidente de 488 nm qui a permis l'émission du Rouge de Nile dans le jaune et, sous une lumière transmise dans l'ultraviolet, l'émission du DAPI dans le bleu mettant ainsi en évidence la localisation de l'ADN et donc du noyau.

2.2.1.2. Différenciation Ostéogénique

La minéralisation des sels de calcium accumulés lors des cultures a été mise en évidence par une technique de coloration au Rouge d'Alizarine (Sigma-Aldrich). Les cellules fixées ont été incubées pendant 1 minute, dans une solution de rouge d'alizarine diluée à 2 % dans l'eau distillée. Puis les cellules ont été rincées à l'eau distillée et observées au microscope à contraste de phase (Leica, DM IL Wetzlar ; Leica microsystèmes).

Ce traitement a permis une coloration des sels de calcium en rouge-orangé.

2.2.1.3. Différenciation Chondrogénique

Au 21ème jour de différenciation, la totalité du surnageant a été éliminée. Les cellules différenciées se présentaient alors sous forme de micromasses compactes et ont été fixées au cours d'une incubation de 24 h, à 4°C en présence de formaldéhyde 4 % (Sigma-Aldrich). Les culots ont ensuite été rincés avec du PBS puis déshydratés progressivement dans des bains successifs d'éthanol 70, 75, 80, 85, 90, 95 puis 100 % pendant 30 min puis inclus dans la paraffine (*Diawax*®; *Diapath*, Microm Microtech, Francheville, France). Des coupes de 5 µm d'épaisseur sont effectuées au microtome puis les lames portant les coupes ont été exposées à un bain de xylène puis à des bains d'éthanol 100, 90 puis 70 % de 10 min chacun. La différenciation chondrogénqiue a alors été mise en évidence selon deux procédés : la coloration à la safranine O (Sigma-Aldrich), la coloration au bleu toluidine (Sigma-Aldrich) et la coloration au bleu alcian (Sigma-Aldrich). Dans un premier cas, les coupes déparaffinées et

réhydratées ont été traitées pendant 3 min avec un contre colorant, le « Fast Green » (Sigma-Aldrich), dilué à 0,02 % dans de l'eau distillée, puis avec de l'acide acétique (Sigma-Aldrich) pendant 30 secondes et enfin avec le colorant, la safranine O diluée à 0,1 % (Sigma-Aldrich) dans de l'eau distillée pendant 10 min. dans le cas du bleu alcian, les coupes ont été mises en présence d'Hématoxyline harris (Sigma-Aldrich) pendant 20 minutes. Cette contre-coloration a ensuite été neutralisée par un bain d'acide chlorhydrique 1 % (Sigma-Aldrich) dans de l'éthanol 70 % puis les coupes ont été exposées pendant 10 minutes à un bain de bleu alcian dilué à 1,5 % dans du méthanol à 1,5 % dans de l'eau distillée.

Au terme des 2 colorations, une fois l'excédant de colorant éliminé par un bain d'eau, les coupes ont été déshydratées de nouveau par des bains de 5 minutes chacun dans de l'éthanol 70, 90 puis 100 %, puis du xylène afin de garantir le marquage au cours du temps. L'observation a été réalisée au microscope en contraste de phase (Leica, DM IL Wetzlar ; Leica microsystèmes).

Des colorations, à la safranine O, au bleu Alcian et au bleu de toluidine, ont été réalisées pour révéler les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes spécifiques de la voie chondrogénique.

2.2.2. Immunofluorescence : Différenciation V

Les cellules V exprimant spécifiquement la SM22α, celle-ci a été recherchée par immunofluorescence. Les cellules ont été incubées toute la nuit à 4°C en présence de l'anticorps anti-SM22α (Novocastra, Leica microsystèmes) dilué au 1/50ème dans du PBS contenant 0,05 % de SVF (Invitrogen). Les cellules ont été mises en présence de l'anticorps secondaire anti-souris couplé au FITC (Alexa Fluor 488, Invitrogen), dilué au 1/250ème dans du PBS/SVF 0,05 % durant 30 minutes. Après deux rinçages au PBS les cellules ont été montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage contenant du DAPI (Vectashield® ; AbCys). L'observation a été faite avec un microscope à fluorescence sous une lumière incidente de 450 à 490 nm.

2.2.3. Western Blot

2.2.3.1. Extraction des protéines totales

Les cellules ont été lavées avec du PBS 1X deux fois et 800 µl de tampon de lyse (20 mM Tris Hcl (Sigma-Aldrich), 400 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 50 mM KCL (Sigma-Aldrich), 1

mM EDTA (Sigma-Aldrich), 0,2 mM PMSF (Sigma-Aldrich), 1 % Triton 100X (Sigma-Aldrich), 20 % Glycérol (Sigma-Aldrich), 10 µg/ml d'inhibiteur de protéases (Sigma-Aldrich) a été déposé sur la couche de cellules. Après 2 min les cellules ont été mises en suspension et l'extrait protéique a été conservé à -20°C

2.2.3.2. Extraction des protéines membranaires

Le culot cellulaire récupéré a été resuspendu dans 2 mL de PBS 1X à 4°C. Les cellules ont été numérées et le culot cellulaire ajusté à la concentration de 5.10^6 cellules/mL puis centrifugé 5 min à 250 g. Le culot a été remis en suspension dans 3 mL de Tampon Dounce à 4°C, pH 7,6 composé de 10 mM de Tris-HCl et de 0,5 mM de $MgCl_2$ supplémenté avec 1 % d'inhibiteurs de protéase (1mM de PMSF, Sigma-Aldrich) ainsi qu'avec 0,5 % d'un cocktail d'inhibiteurs (aprotinine à 10 µg/mL ; Sigma-Aldrich, leupeptine à 10 µg/mL ; Sigma-Aldrich). Après 10 minutes à 4°C la suspension cellulaire a été transférée dans un broyeur de Dounce où 30 allers retours ont été réalisés afin de briser les cellules. À cette suspension cellulaire ont été ajouté 1 mL de tampon de restauration composé du tampon dounce supplémenté de 0,6 M de NaCl. Après 5 minutes de centrifugation à 500 g à 4°C le surnageant a été récupéré car il contient le cytosol ainsi que les membranes de cellules, au contraire du culot, qui n'est pas conservé, où sont retrouvés les noyaux et les cellules entières. Afin de séparer le cytosol des membranes cellulaires une ultra-centrifugation a été réalisée à 23 500 tr/min dans un rotor Beckman SW41 à 4°C pendant 1 heure (LE-80 Ultracentrifuge, Beckman Coulter, Roissy, France). Le culot contenant les membranes a été remis en suspension avec 50 µL de tampon de restauration et conservé à -80°C.

2.2.3.3. Dosage des protéines totales

Les protéines ont été dosées à l'aide du kit BioRad Dc protein Assay (BioRad) basé sur la méthode de Lowry. Un microlitre d'une gamme d'étalonnage de sérum albumine bovine, allant de 1 mg/ml à 100 µg/ml ou 1 µl de chaque échantillon, ont été mélangés avec 20 µl de la solution et 80 µl d'eau distillée. Après une incubation de 5 min à température ambiante, la concentration des protéines a été déterminée par comparaison avec la gamme étalon par lecture au spectromètre à 630 nm par le MRX II (Dynex technologies, Chantilly, USA).

2.2.3.4. Electrophorèse des protéines en gel de polyacrylamide dénaturant

La séparation des protéines a été réalisée selon la méthode décrite par Laemmli (Laemmli, 1970). La concentration en acrylamide du gel de séparation est fonction du poids moléculaire des molécules à séparer. Le pourcentage du gel de séparation permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire. Ce gel de séparation est surmonté d'un gel de concentration à 5 % qui permet de concentrer les protéines avant leur entrée dans le gel de séparation. Le gel de séparation de 10 % par exemple est préparé à partir d'acrylamide-bisacrylamide dans un tampon qui contient du Tris-HCl 0.56 M pH 9,2, auquel est ajouté 0,1 % de SDS (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). L'addition de 0,1 % de persulfate d'ammonium (APS) (BioRad) et de 0,05 % de N-N-N-N-tétraméthylènediamine (TEMED) (Sigma-Aldrich) catalyse la polymérisation du gel. Après polymérisation du gel de séparation, le gel de concentration à 5 % d'acrylamide-bisacrylamide est préparé en tampon Tris-HCl 125 mM pH 6,8 additionné de 0,1 % de SDS, de 0,1 % d'APS et de 0,1 % de TEMED puis déposé au dessus du gel de séparation.

Les protéines ont été diluées dans du tampon Laemmlly (Tris-HCl pH 6,8 100 mM, SDS 4 %, β-mercaptoéthanol 1 %, bleu de bromophénol 0,2 %, glycérol 20 %), puis dénaturées par chauffage à 99°C pendant 10 min avant d'être séparées dans le gel sous un courant de 80 Volt. Un marqueur de poids moléculaire contenant des protéines pré-colorées d'une taille de 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 et 250 kDa (Precision Plus Protein, BioRad) a été utilisé.

2.2.3.5. Caractérisation des protéines par immuno-empreinte

Les protéines ont été transférées suivant la méthode de Towbin *et al.,* (Towbin *et al.*, 1979). Le transfert des protéines a été réalisé dans un appareil à transfert vertical en environnement liquide "Mini trans blot electrophoretic transfer cell" (BioRad). Après séparation sur gel dénaturant de polyacrylamide, les protéines ont été transférées sur une membrane de PolyvinyliDene Fluoride (immun-blot PVDF membrane, BioRad) préalablement activée par du méthanol, pendant 1 h à 80V dans du tampon de transfert (39 mM de glycine, 40 mM de Tris-HCl pH 8,3, 20 % de méthanol, 0,037 % de SDS), le gel et la membrane étant pris en sandwich entre deux papiers Whatman 3MM (BioRad). Après transfert, les sites non spécifiques de fixation des protéines de la membrane ont été saturés pendant 1 h à température ambiante, sous agitation, dans du tampon PBST (PBS1x, tween 20

0.1 %) additionné de 5 % de lait écrémé en poudre (PBST-lait). Après 3 lavages de 5 min dans le tampon PBST, la membrane a été incubée pendant une nuit à 4°C, sous agitation, en présence de l'anticorps monoclonal ou polyclonal spécifique de la protéine d'intérêt *(Tableau VII)* dilué dans du PBST-lait. Après 3 lavages de 5 min dans du PBST-lait, la membrane a été incubée pendant 1 h avec un anticorps anti-IgG de souris couplé à la l'Horse Radish Peroxidase (HRP) (BioRad) dilué dans du PBST. Après 3 lavages dans du PBST, la fixation des anticorps a été révélée par chemoluminescence. La membrane a été incubée avec l'ECL plus : 50 µl de la solution B ont été mélangés avec 250 µl de la solution A (GE Healthcare, Tours, France) pendant 5 minutes et la chemoluminescence a été observée à 440 nm (Chemi-smart ; Vilber Lourmat, Marne la vallée, France).

Tableau VII : Liste des anticorps utilisés en Western-blot

Anticorps	Type	Origine	Isotype	Fournisseur
ASMA	Monoclonal (Clone 1A4)	Souris	IgG2a	Sigma
β-Actine	Monoclonal (Clone AC-15)	Souris	IgG1	Sigma
Calponine	Monoclonal (Clone E4)	Souris	IgG2a	Santa Cruz
CaSr	Monoclonal (Clone 5C10, ADD)	Souris	IgG2a	AbCam
Leptine	Monoclonal (Clone 44804)	Souris	IgG1	R&D Systems
PPARγ	Monoclonal (Clone A3409A)	Souris	IgG2a	R&D Systems
PTHr	Monoclonal (Clone 3D1.1)	Souris	IgG1	Santa Cruz

2.2.3.6. Evaluation de l'intensité du signal

La semi-quantifiation des protéines détectées par Western-blot a été réalisée par densitométrie, c'est-à-dire par la mesure et l'intégration de l'intensité et de la quantité du signal généré. Cela a été effectué à l'aide du logiciel libre et gratuit ImageJ développé par le

National Institutes of Health (NIH) (http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html). Les résultats présentés sont les rapports des semi-quantifiactions aux différents temps sur la semi-quantification à J0.

2.3. CARACTERISATION DE LA PERTE D'IMMATURITE

2.3.1. Mise en culture

Les cellules ont été ensemencées dans des chambres puits (Labtek ; Nunck, VWR, Fontenay sous bois, France) de 1 cm^2 sur lames à raison de 1.10^4 cellules par puits pour les CSM et 5000 cellules par puits pour les lignées pour l'expansion et à confluence pour la différenciation. Après 48 heures de culture en milieu de prolifération, les CSM ont été induites en différenciation et les lignées ont été révélées par immunofluorescence. Pour les CSM, la révélation a été effectuée après 0, 3, 7 et 14 jours de différenciation avec le milieu de différentiation adipogénique et jusqu'à 21 jours avec le milieu de différenciation ostéogénique et vasculaire musculaire lisse

2.3.2. Immunofluorescence *in situ*

À la fin de la différenciation, les cellules ont été fixées, pendant 10 minutes, avec du méthanol pur (Invitrogen) à -20°C. Pour les protéines intra cellulaires, une étape supplémentaire de perméabilisation a été réalisée avec une solution de PBS, 0,5 % de SVF et 0,2 % de TWEEN 20 (Bio Rad) pendant 30 minutes à température ambiante. Puis elles ont été mises à incuber avec des anticorps primaires *(Tableau VIII)*, pendant toute une nuit à 4°. Des puits sans anticorps primaire servaient de contrôle négatif. Un marquage secondaire a ensuite été réalisé pendant 30 minutes à 4°C, à l'abri de la lumière avec un anticorps conjugué à un fluorochrome de type Alexa 488 (Invitrogen). Après rinçage il a été ajouté un milieu de montage contenant du 4,6-diaminido-2phenylindol (DAPI) (Vectashield® ; AbCys), permettant de visualiser le noyau des cellules. Les lames ont ensuite été analysées au microscope à epifluorescence (Leica microsystèmes) avec une caméra (DMX 1200, Nikon Europe, Badhoevedorp, Pays bas), et analysées par le logiciel Lucia.

Tableau VIII : Liste des anticorps utilisés en immunofluorescence

Anticorps	Type	Origine	Isotype	Fournisseur
ASMA	Monoclonal (Clone 1A4)	Souris	IgG2a	Sigma
Bmi-1	Monoclonal (Clone F6)	Souris	IgG1	Millipore
Fibronectine	Monoclonal (Clone p1h11)	Souris	IgG1	R&D Systems
Nanog	Polyclonal	Lapin	IgG	Millipore
Oct-3/4	Monoclonal (Clone C-10)	Souris	IgG2b	Santa cruz
Sm22a	Monoclonal (Clone 10H12)	Souris	IgG2b	Novocastra
Sox2	Monoclonal (Clone 296902)	Souris	IgG1	R&D Systems

3. ZYMOGRAPHIE : ACTIVITE GELATINOLYTIQUE DES MMP-2 ET -9

Les MMP-2 et MMP-9 sont des gélatinases dont l'activité peut être détectée par zymographie.

Une séparation électrophorétique des protéines a été tout d'abord réalisée dans un gel de polyacrylamide-SDS imprégné de gélatine. Dans un deuxième temps, les gélatinases ont été mises en évidence par leur capacité à dégrader la gélatine contenue dans le gel. Cette activité gélatinolytique se traduit par des bandes blanches sur un fond bleu lorsque le gel est coloré par du bleu de Coomassie *(Figure 14)*.

Les échantillons testés ont été les surnageants obtenus après 48h de culture des cellules à différents stades de différenciation. Ces échantillons ont été dilués dans du tampon échantillon (50 mM Tris-HCl, pH 6,8 ; 2 % SDS ; 10 % Glycérol ; 0,1 % Bleu de bromophénol) et ont ensuite été déposés sur un gel de concentration contenant 5 % d'acrylamide (5 % d'acrylamide ; 0,2 % de bis-acrylamide ; 125 mM Tris HCl, pH6.8 ; 0,1 % SDS ; 0,1 % persulfate d'ammonium ; 0,06 % TEMED). Les échantillons ont ensuite été mis en migration dans un gel de polyacrylamide imprégné de gélatine (10 % acrylamide / 0,3 3 % bisacrylamide, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 1 mg/mL de gélatine de peau de porc (VWR,

Fontenay sous bois, France), 0,1 % SDS, 0,1 % APS et 0,04 % TEMED). La migration des échantillons en tampon électrophorétique (12,4 mM Tris HCl, 96 mM Glycine, 0,05 % SDS) a été réalisée pendant trois heures, sous une intensité constante de 30 mA. Un marqueur de taille protéique (Dual color, BioRad) a été déposé ainsi que des standards, zymogènes et formes actives des MMP-2 et -9 à raison de 3 ng pour la pro-MMP-2, 0,2 ng pour la pro-MMP-9, 2 ng pour la MMP-2 active, et 0,4 ng pour la MMP-9 active (Calbiochem**,** Merck Chemicals, Nottingham, United Kingdom). Le SDS, contenu dans le gel et le tampon échantillon, provoque le clivage de la liaison entre l'atome de zinc et la cystéine du pro-domaine *(Figure 14A)* permettant la fixation d'une molécule d'eau *(Figure 14B)* et ainsi l'activation du site catalytique. Les pro-formes de MMP sont alors détectables sans clivage du pro-domaine et leur activité gélatinolytique, tout comme celle des formes actives, sera révélée en présence de calcium *(Figure 14C)*.

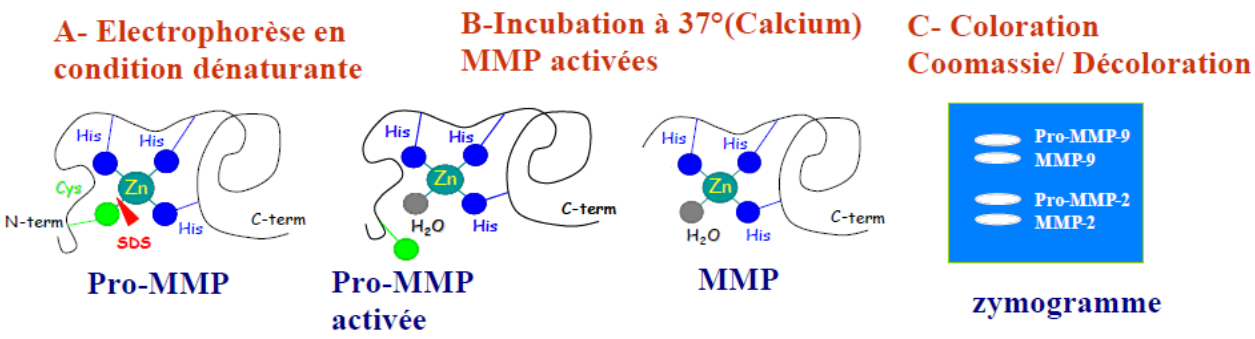


Figure 14 : Principe d'activation des MMP pendant la zymographie

Après électrophorèse, le gel a été placé sous agitation lente dans une solution de Triton X-100 à 2,5 % pendant 15 minutes à température ambiante, permettant la renaturation des protéines. Le gel a ensuite été incubé pendant 16 à 20 heures à 37°C dans un tampon de développement (0,05 M Tris-HCl, pH 7,5 ; 5 mM $CaCl_2$) au cours desquelles les pro-formes et les formes actives des MMP-2 et -9 peuvent alors dégrader la gélatine. Le tampon de développement a ensuite été éliminé, le gel rincé avec de l'eau distillée puis placé dans 100 mL de tampon fixation/décoloration (45 % éthanol ; 10 % Acide acétique) pendant 15 minutes sous agitation douce à température ambiante. La coloration du gel pendant 2 h dans une solution de bleu de Coomassie à 0,25 % en tampon de fixation/décoloration puis la décoloration dans une solution de fixation/décoloration ont permis la visualisation des plages blanches sur le fond bleu correspondant à la position dans le gel des MMP. Le gel a été mis dans de l'eau distillée pour arrêter la décoloration. L'acquisition des images a été réalisée à

l'aide du système d'acquisition vidéo GelDocXR (BioRad) et du logiciel QuantityOne (BioRad).

4. ANALYSE DE LA PRODUCTION DE CYTOKINES PAR ELISA

Dans le but de vérifier l'évolution des cytokines lors des différenciations, un test ELISA a été réalisé à partir des surnageants récoltés tous les trois jours de contact avec les cellules puis conservé à -20°C.

Grâce à une technique d'immunodétection quantitative par sandwich, la présence du SDF-1, Ang 1, Flt3-L, SCF, OPN, IL-6 et TPO a été recherchée. Pour cela les kits SDF-1, Ang 1, Flt3-L humain, SCF, OPN, IL-6 et TPO immunoassay (R&D Systems, Lille, France) ont été utilisés.

À partir d'une plaque de microtitrage, chaque puits a reçu 50 à 100 µL d'Assay dilués puis 50 à 100 µL d'échantillon. La plaque a ensuite été mise à incuber 2 à 3 heures sous agitation à température ambiante. Puis, 4 lavages avec 400 µL de tampon de lavage ont été réalisés. Les molécules de cytokines fixées spécifiquement ont été détectées par l'addition de 200 µL par puits d'anticorps monoclonal spécifique de la molécule d'intérêt. Après 1 à 2 heures d'incubation avec ou sans agitation, selon le protocole du fournisseur, la plaque a été lavée comme précédemment. Deux cents microlitres de substrats ont été ajoutés dans chaque puits de la plaque et celle-ci mise à incuber, à l'abri de la lumière pendant 30 minutes afin de révéler la quantité de cytokines produite par les cellules pour chaque condition. Finalement, la réaction a été arrêtée par 50 µL de solution d'arrêt.

L'intensité de la couleur émise a ensuite été mesuré dans les 30 minutes suivant l'arrêt de la réaction, à une longueur d'onde de 450nm (Microplate; Dynex, Denkendorf, Germany).

5. CYTOMETRIE

5.1. PRINCIPE

Le phénotypage est une technique permettant de caractériser une population cellulaire grâce à la détermination des récepteurs membranaires exprimés à la surface de ces cellules. Cette détection ce fait grâce à un flux laminaire devant un laser permettant d'exciter les fluorochromes couplés aux anticorps. Les ondes d'émission sont captées par des détecteurs.

La granulosité et la taille des cellules sont deux paramètres physiques qui permettrent de distinguer différentes populations de cellules, alors que la fluorescence d'une cellule indique l'absence ou la présence du marqueur à la surface. Si la cellule possède le ou les marqueurs, elle fixera le ou les anticorps couplés à un fluorochrome et la cellule va émettre une lumière fluorescente à son passage devant le laser. Ainsi dans une population de cellules hétérogènes, le pourcentage de chaque phénotype peut-être distingué et les sous populations identifiées.

Le laser est à ion d'argon, il permet d'exciter notamment la phycoérythrine (PE), l'allophycocyanine (APC) ou la fluoresceine Isothiocyanate (FITC), des fluorochromes couplés à des anticorps spécifiques de chaque récepteur testé.

5.2. PREPARATION DES CELLULES ET ANALYSE CYTOMETRIQUE

Les cellules ont été placées dans des tubes à hémolyse à raison de $0{,}5.10^6$ cellules dans 300 µL de PBS 1X avec 5 µL d'anticorps monoclonaux couplés à la PE ou à l'APC pendant 30 minutes à l'obscurité *(Tableau IX)*. Puis chaque tube a été rincé en PBS 1X et centrifugé 5 minutes à 250 g, cette étape étant répétée deux fois. Après la deuxième centrifugation, 300 µL de PBS 1X ont été ajoutés dans chaque tube et ceux-ci ont été analysés au cytomètre de flux (FACSCanto® II, Becton Dickinson, Le Pont-De-Claix, France) avec un laser argon émettant à 488 nm. L'analyse a été effectuée avec le logiciel FlowJo® (TreeStar, Becton Dickinson). Les cytomètres ont été établis afin d'inclure au moins 10^4 cellules $CD45^-$ de taille uniforme. Intensité de l'expression de l'antigène a été exprimé par le rapport signal / bruit (S / B) défini par la moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence (MFI) des cellules en présence des antigènes spécifiques divisé par la MFI de cellules en présence des antigènes de contrôle isotypique.

6. QUANTITATIVE REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION: QRT-PCR

6.1. EXTRACTION D'ARN

Les cellules ont été tout d'abord lavées 3 fois en PBS avant d'être lysées avec 600 µL de la solution RLT du kit RNeasy Mini Kit® (Qiagen). Les cellules ont été ensuite décollées à l'aide d'un grattoir, puis vortexées et congelées à -80°C en attendant l'étape de purification de l'ARN total.

Tableau IX : Liste des anticorps utilisés en CMF

Anticorps	Autre dénomination	Clone	Origine	Isotype	Fournisseur
CD14	Endotoxin recepteur, Leu M3, LPS-R, Mo2, My4, myeloid cell specific lecine-rich glycoprotein	M5E2	PE	IgG_{2a}	BD pharmingen™
CD31	PECAM1 , CR-MP12, EndoCAM	WM59	PE	IgG_1	BD pharmingen™
CD34	HPCA1, gp105-120	581	PE	IgG_1	BD pharmingen™
CD45	B220, LCA, Ly5, OX1, OX22, OX30, PTPRC, T200	HI30	APC	IgG_1	BD pharmingen™
CD73	L-VAP-2, EC3.1. 3.5, 5'-ribonucléotide phosphohydrolase, NT5E, SH-3, SH-4	AD2	PE	IgG_1	BD pharmingen™
CD90	Thy1, 5E10, OX7, Thy1.1, Thy1.2	5E10	PE	IgG_1	BD pharmingen™
CD105	Endogline, E9 protein, HHT1, ORW, ORW1, SH-2		PE	IgG_1	Caltag laboratories
CD106	VCAM1, INCAM-110, a4ß1 ligand	51-10C9	PE	IgG_1	BD pharmingen™
CD133	AC133, prominin, PROML-1, hematopoietic stem cell antigen		PE	IgG_1	MACS
CD146	Gp130 Antigen MCAM, MelCAM, MUC18, P1H12, S-endo	P1H12	PE	IgG_1	BD pharmingen™
CD271	Récepteur au NGF , p75NTR, TNFRSF16	C40-1457	PE	IgG_1	MACS
CD309	VEGFR-2, KDR, flk-1	89106	PE	IgG_1	R&D

6.2. PURIFICATION DE L'ARN TOTAL

Selon le protocole de purification du kit RNeasy Mini Kit® (Qiagen, Courtaboeuf, France), un même volume d'éthanol à 70 % a été ajouté à l'extrait cellulaire. Après homogénéisation, le mélange a été déposé sur une colonne de purification, puis centrifugé 15 secondes à 8000 g. Sept cent microlitres de la solution RW1 ont été ajoutés à la colonne et centrifugé 15 secondes à 8000 g. Cinq cent microlitres de la solution RPE ont ensuite été ajoutés à la colonne et centrifugés 15 secondes à 8000 g. Cinq cent microlitres de la solution RPE ont été ajoutés à la colonne et centrifugé 2 minutes à 8000 g. Après ces différentes étapes de purification, il ne reste plus qu'à éluer l'ARN pour cela un nouveau tube a été placé sous la colonne et 50 µL de RNase-free water ont été déposés sur la colonne et centrifugés 1 minute à 8000 g. L'ARN purifié a été congelé à -80°C en attendant son dosage.

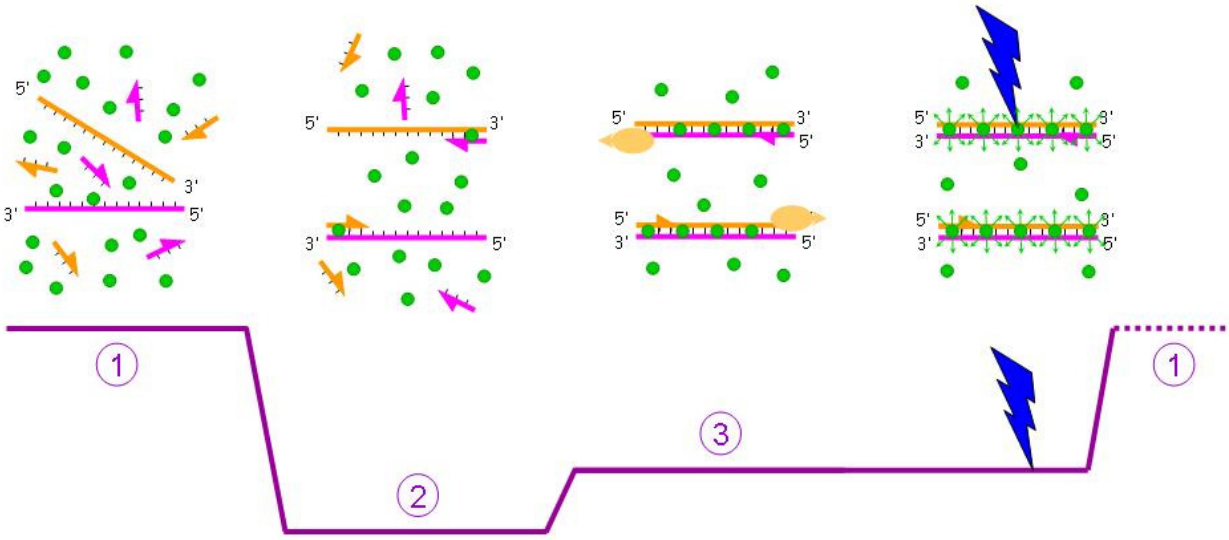
6.3. DOSAGE DE L'ARN TOTAL

L'ARN a été dilué au 100ème dans de l'eau pour réaliser une mesure, par densité optique à l'aide du Gene Quant II (Amersham Pharmacia, Sarclay, Orsay, France), de la concentration en ARN en µg/µL. Des solutions d'ARN à 10 ng/µL, ont été préparées par dilution.

6.4. TECHNIQUES DE REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINES

6.4.1. qRT-PCR

Les qRT-PCR ont été réalisées par la technique de SYBR Green *(Figure 17)*.Trois microgrammes d'ARN total de chaque échantillon ont subit une transcription inverse en utilisant *SuperScript® VILO® cDNA Synthesis* (Invitrogen) selon le protocole du fournisseur. La quantification relative de l'expression des gènes a été réalisée par PCR en temps réel sur le LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France) avec Universal ProbeLibrary (www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/ezhome). Les réactions de qRT-PCR ont été réalisées dans un volume total de 10 µl avec 20 ng d'ADNc en utilisant des sondes LightCycler 480 Master (Roche) et Universal ProbeLibrary assays conçus avec le logiciel ProbeFinder (Roche Applied Science). Les amorces utilisées sont identifiées dans le *Tableau X*.



<u>Figure 15 :</u> Représentation schématique de la qPCR réalisée à l'aide du SYBR® green après la reverse transcription des ANR totaux en ADNc.

Le SYBR® green est un très bon fluorochrome pouvant se fixer spécifiquement sur les acides nucléiques doubles brins et qui n'émet de la fluorescence que lorsqu'il est excité. Il est présent dans le mix lors de la réaction de qPCR et va permettre ainsi la quantification des nouveaux doubles brins d'ADN formés. Ainsi après la dénaturation des doubles brins d'ADN (1) et l'hybridation des amorces (2), lors de l'extension (3) le SYBR® green va s'intercaler dans les doubles brins d'ADN neo-formés et va permettre leur quantification par détection de la fluorescence émise par le SYBR® green après son excitation à l'aide d'un laser. La quantité d'ADN neo-formé étant proportionnelle à la quantité d'ADN au départ (correspondant aux ARN extraits) cela va permettre de quantifier l'expression des gènes.

Le LightCycler 480 a été programmé pour une dénaturation initiale (95°C, 10 minutes) à la suite de 45 cycles de 10 secondes à 95°C, 30 secondes à 60°C, 1 seconde à 72°C et une étape finale de refroidissement à 40°C pendant 10 secondes. Toutes les réactions ont été effectuées en triple exemplaire, et les valeurs moyennes ont été utilisées pour la quantification. Les données résultantes ont été analysées et quantifiées avec le logiciel LightCycler 480 1.5.0 (Roche) et analysées en utilisant la méthode de quantification relative de cycle seuil (C_T, threshold cycle). La valeur de C_T de la cible a été normalisée avec le contrôle interne ($\Delta Ct = Ct_{cible} - Ct_{contrôle\ interne}$) et relative à un étalon ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{cible} - \Delta Ct_{étalon}$), cela est exprimé en $2^{-\Delta\Delta CT}$. Le contrôle interne est le gène de la glycéraldéhyde-3-phosphate (GAPDH). Les résultats provenant de 3 expériences de qRT-PCR indépendantes ont été exprimés en moyenne ± ETM.

Tableau X : Liste des amorces utilisées en qRT-PCR

Gènes	Amorce 5'	Amorce 3'	Sonde
NANOG	atgcctcacacggagactgt	agggctgtcctgaataagca	#69
SOX2	ttgctgcctctttaagactagga	ctggggctcaaacttctctc	#35
POU5F1_1	agcaaaacccggaggagt	ccacatcggcctgtgtatatc	#35
POU5F1_2	tcttgaatcccgaatggaaa	tgatgtcctgggactggatt	#29
SHH	tgtactacgagtccaaggcaca	gaagcagcctcccgattt	#86
MMP2_1&2	ataacctggatgccgtcgt	aggcacccttgaagaagtagc	#70
MMP9	gaaccaatctcaccgacagg	gccacccgagtgtaaccata	#6
VCAM1_1&2	tgaatctaggaaattggaaaaagg	tgaatctctggatccttaggaaa	#39
ITGA4	gatgaaaatgagcctgaaacg	gccatactattgccagtgttga	#22
ITGA5	caacatctgtgtgcctgacc	ccaggtacacatggttctgc	#11
KITLG_a&b	gcgctgcctttccttatg	ccttcagttttgacgagagga	#68
JAG1	gaatggcaacaaaacttgcat	agccttgtcggcaaatagc	#42
BMP4_1&2&3	tccacagcactggtcttgag	ctgggatgttctccagatgtt	#31
SPP1_1&2&3	gcttggttgtcagcagca	tgcaattctcatggtagtgagttt	#63
SPARC	gtgcagaggaaaccgaagag	tgtttgcagtggtggttctg	#77
BGLAP	ggcgctacctgtatcaatgg	tcagccaactcgtcacagtc	#1
LPL	atgtggcccggtttatca	ctgtatcccaagagatggacatt	#25
ACTA2	ctgttccagccatccttcat	tcatgatgctgttgtaggtggt	#58
MYH11_SM1A,SM1B,SM2A&SM2B	cctcaagctgcggaactg	ctgcagcagtggcttcac	#22
PPARG_1&2&3&4	tgacaggaaagacaacagacaaat	gggtgatgtgtttgaacttgatt	#7

6.4.2. RT-PCR en temps réel TaqMan® TLDA

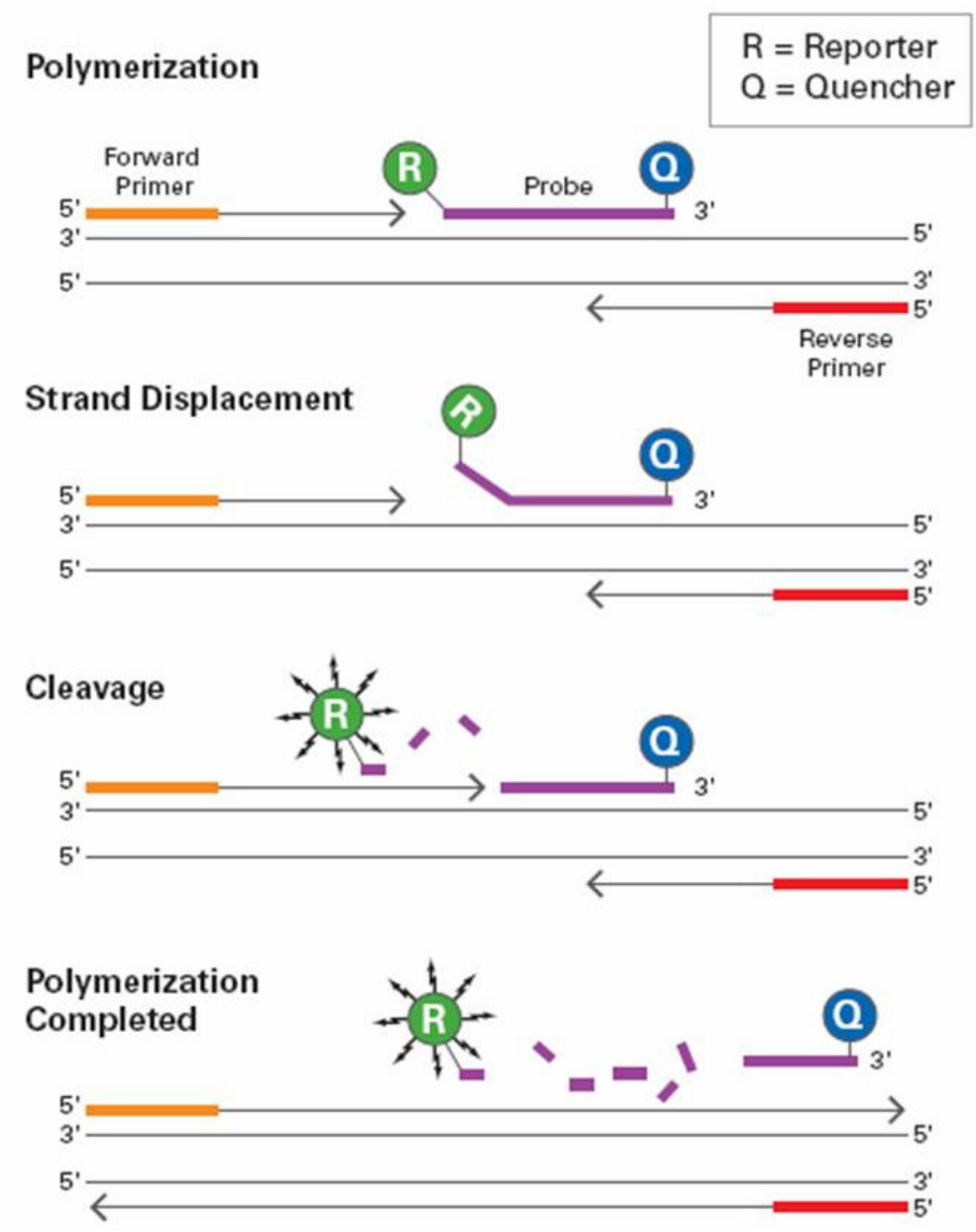
Des CSM confluentes, après le deuxième passage, stimulées ou non par le G-CSF ont été lysées directement dans les flacons de culture et leurs ARN ont été purifiés à l'aide du RNeasy Kit® (Qiagen). Des RT-PCR en deux étapes ont alors été réalisées en utilisant des TaqMan low density arrays® (TLDA) (Carte Micro Fluidique, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) *(Figure 16)*. Nous avons étudiés 12 gènes de protéases impliqués ou en relation avec la migration cellulaire. Dans un premier temps, l'ADNc simple brin a été synthétisé à partir de 3 µg d'ARN total en utilisant le High-Capacity cDNA Archive Kit® (Applied Biosystems). Les réactions de PCR ont ensuite été réalisées sur des cartes Micro Fluidic en utilisant l'ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System® (Applied Biosystems). Les sondes ont été marquées avec un reporter fluorescent 6-carboxyfluorescein (FAM®) en 5' et avec un quencher en 3' (Applied Biosystems). Pour effectuer cette deuxième étape, 100 ng d'ADNc combinés avec du 1X TaqMan Universal Master Mix® (Applied Biosystems) ont été déposés sur chaque puits des cartes Micro Fluidic et un cycle de 50°C pendant 2 min, 94.5°C pendant 10 min suivit de 40 cycles à 97°C pendant 30 sec et enfin 59.7°C à 1 min a été réalisé. Les données ont été obtenues en utilisant le logiciel Applied Biosystems SDS 2.2.1 software® et analysées en utilisant la méthode de quantification relative de cycle seuil (CT, threshold cycle). Le gène de ménage GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) a été utilisé comme référence afin de normaliser les données et de pourvoir calculer les $2^{-\Delta.CT}$ correspondant au ratio de l'expression du gène d'intérêt sur l'expression du gène GAPDH. Les résultats provenant de 3 expériences de RT-PCR indépendantes ont été exprimés en moyenne ± ETM.

7. CO-CULTURE CSM-CSH

7.1. CO-CULTURE A LONG TERME A CONCENTRATION SATURANTE

7.1.1. Etablissement de la couche stromale

Des CSM ont été mises en culture à la concentration de 5.10^3 cellules/cm² dans des flacons de 25 cm². Après 5 jours de culture les cellules ont été induites en différenciation A, O et V. Une fois arrivées au stade voulu de différenciation (J0, J3, J7, J14, J21) les cellules ont été traitées à la mitomycine.



<u>Figure 16 :</u> Représentation schématique de la TLDA (TaqMan Low Density Array) qui est une qPCR TaqMan® réalisée sur des plaques microfluidiques après la reverse transcription des ANR totaux en ADNc.

Cette PCR nécessite 2 amorces (5' et 3') ainsi qu'une sonde possédant un reporter (R) qui émet de la fluorescence une fois libéré du quencher (Q) qui l'inhibe. Ainsi après la dénaturation des doubles brins d'ADN, et l'hybridation des amorces et de la sonde, lors de l'extension des brins d'ADN cela va déplacer la sonde entraînant sa rupture et la libération du reporter qui n'étant plus sous l'inhibition du quencher, va pouvoir émettre sa fluorescence. La quantification des doubles brins d'ADN neo-formés est ainsi possible par détection de la fluorescence. La quantité d'ADN neo-formé étant proportionnelle à la quantité d'ADN au départ (correspondant aux ARN extraits) cela va permettre de quantifier l'expression des gènes.

7.1.2. Traitement à la mitomycine

Les CSM arrivées à confluence ont été lavées 3 fois avec du PBS 1X afin d'éliminer le sérum. Le milieu d'expansion a été remplacé par un milieu composé de 88 % d'αMEM sans nucléotides (Invitrogen), supplémenté de 10 % de SVF (Invitrogen), 2 mM de L-Glutamine (Invitrogen), 100 U/mL de Pénicilline-100 µg/mL de Streptomycine (Invitrogen) et 0,4 µg/mL de mitomycine C (Sigma-Aldrich). Les cellules ont été incubées 16 heures à 37°C à 5 % CO_2 à l'obscurité avant d'être lavés 2 fois en PBS 1X. Par la suite, le milieu des cellules a été remplacé par le même milieu utilisé précédemment mais dépourvu de mitomycine C, les cellules ont été incubées 48 heures à 37°C à 5 % CO_2. Après un lavage au PBS 1X les cellules ont été utilisées pour la co-culture.

7.1.3. Mise en culture des cellules hématopoïétiques

Des cellules $CD34^+$ ont été ajoutées sur les CSM à une concentration dite saturante de 1.10^4 cellules/mL. Cette co-culture a été réalisée en milieu de Dexter (voir chapitre 2.1.3). Les plaques ont ensuite été incubées à 37°C avec 5 % de CO_2 pendant 5 semaines.

La moitié du milieu a été renouvelée une fois par semaine. Le surnageant prélevé a été centrifugé et les cellules récupérées ont été ensuite mises en culture clonogénique.

7.2. CO-CULTURE A LONG TERME EN DILUTION LIMITE (TEST CAFC)

7.2.1. Etablissement de la couche stromale

Des CSM ont été mises en culture à la concentration de 5.10^3 cellules/cm² dans trois plaques 96 puits. Après 5 jours de culture les cellules ont été induites *in situ* en différenciation A, O et V.

7.2.2. Irradiation de la couche stromale

Une fois arrivées au stade voulu de différenciation (J0, J3, J7, J14, J21) les cellules ont été irradiées à 10 Gray pour inhiber leur croissance et conserver une couche monocellulaire.

7.2.3. Mise en culture des cellules hématopoïétiques

Des cellules $CD34^+$ ont été ajoutées sur les CSM en dilution limite, à une concentration de 200 cellules/puits à 5 cellules/puits. Cette co-culture a été réalisée en milieu de Dexter (voir chapitre 2.1.3.). Les plaques ont ensuite été incubées à 37°C sous 5 % de CO_2 pendant 5 semaines.

La moitié du milieu a été renouvelée une fois par semaine suivi de l'observation des plaques au microscope à contraste de phase (Leica, DM IL Wetzlar ; Leica microsystèmes) afin de dénombrer les puits positifs pour chaque concentration de cellules $CD34^+$.

7.3. CULTURE CLONOGENIQUE (PROGENITEURS)

Les cellules $CD34^+$ avant toute utilisation ont été mises en culture à la concentration de 1.10^3 cellules/mL en methylcellulose H4434 (StemCell Technologies). Après ajout de la suspension sur la methylcellulose, celle-ci a été vortexée 3 fois 10 secondes afin d'homogénéise la suspension dans la methylcellulose. Après 15 min de repos le mélange a été prélevé à la seringue et 1 mL a été déposé dans chaque puits de plaques 6 puits.

Après 14 jours de culture, les colonies ont été observées au microscope à contraste de phase (Leica, DM IL Wetzlar ; Leica microsystèmes) et dénombrées pour chaque conditions. Les colonies BFU-E et CFU-GM sont dénombrées selon les critères suivants. Une colonie BFU-E (Burst-forming unit-erythroid) est une colonie hémoglobinisée qui est constituée de plus de 200 érythroblastes dans une seule ou plusieurs sous-unités. Une colonie CFU-GM (Colony-forming unit-granulocyte, macrophage) est composée d'au moins 20 granulocytes (CFU-G), ou d'au moins 20 macrophages (CFU-M) ou alors des cellules des deux lignées (CFU-GM) non hémoglobinisée.

8. MIGRATION TRANSTROMALE DES CELLULES HEMATOPOÏETIQUES

8.1. PRINCIPE DU TEST

Les cellules hématopoïétiques ont été mises à migrer à travers des inserts comportant une membrane en polycarbonate avec des pores de 5 µm (Transwells® Costar, ATGC, Marne la vallée, France) *(Figure 17)* et disposés dans des plaques de 24 puits (Costar). Afin de mimer

le microenvironnement médullaire, les membranes ont été préalablement recouvertes de fibronectine (constituant essentiel de la MEC) puis d'une couche de cellules stromales (CSM).

La migration des cellules hématopoïétiques a été mesurée sous l'action ou non de la chimiokine SDF-1 au travers de cellules stromales pré-stimulées ou non avec du G-CSF. Le nombre de cellules ayant migré dans la chambre inférieure a été évalué par comptage à l'hématimètre de type Malassez (Fastread®, Fisher Scientific).

Le milieu de migration utilisé était composé de RPMI (Invitrogen) contenant 0,25 % de sérum d'albumine bovine (BSA) (Sigma-Aldrich).

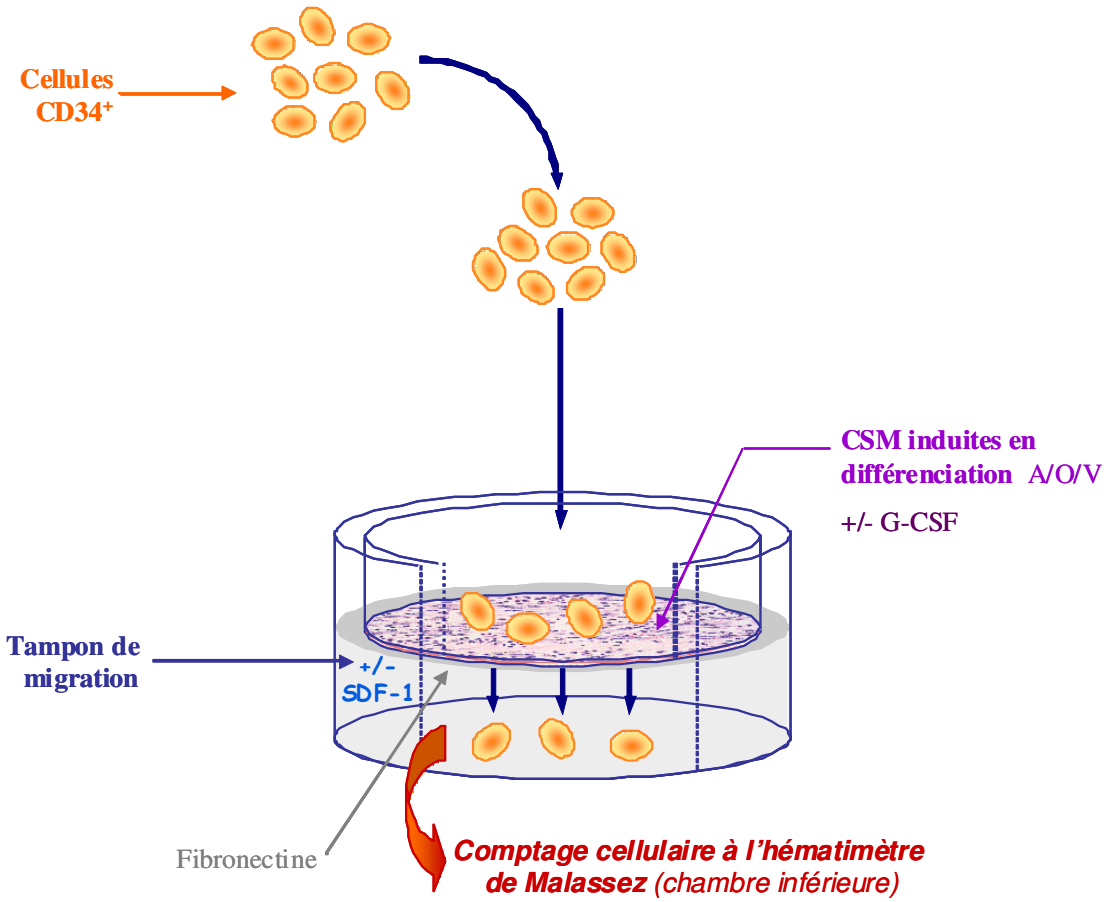


Figure 17 : Modèle *in vitro* de mobilisation des cellules hématopoïétiques.

Test de migration des cellules hématopoïétiques à travers une couche de cellules stromales stimulées ou non.

8.2. PREPARATION DES INSERTS RECOUVERTS DE CELLULES STROMALES

8.2.1. Recouvrement des inserts par la fibronectine

Dans un premier temps, les inserts ont été recouverts avec 100 µL de fibronectine (Fn) humaine à 20 µg/mL (Sigma-Aldrich) pendant 1h à 37°C ou une nuit à 4°C

8.2.2. Mise au point des conditions d'ensemencement de la couche stromale

Différentes concentrations de cellules ont été testées afin de déterminer quelle serait la concentration optimale de cellules permettant d'obtenir une couche stromale recouvrant la totalité de l'insert et permettant de garder le potentiel de différenciation des CSM, 100 µL de suspension cellulaire à 1.10^5 cellules/mL et 2.10^4 cellules/mL ont été placés sur des inserts préalablement recouverts par la Fn. Les plaques ont été incubées à 37°C sous 5 % de CO_2 pendant 7 jours en observant chaque jour le degré de confluence de la couche cellulaire par coloration au May Grunwald Giemsa. Les inserts ont été rincés au PBS 1X, puis 100 µL de May Grunwald 6 % (VWR) ont été déposés dans les inserts pendant 2 minutes. Deux rinçages ont été effectués à l'eau distillée puis 100 µL de Giemsa dilué au $1/10^{ème}$ ont été déposés sur l'insert pendant 10 minutes.

Après deux rinçages à l'eau distillée l'insert a été mis à sécher à 37°C pendant 30 minutes.

8.3. MIGRATION TRANS-STROMALE DES CELLULES HEMATOPOÏETIQUES

Cent microlitres de suspension de cellules stromales à une concentration de 2.10^4 cellules permettant d'atteindre la confluence (concentration optimale déterminée, voir chapitre résultats 2.2.1.1.1.) ont été déposés dans les inserts recouverts de fibronectine pendant 2 jours à 37°C. À cet état de confluence, les cellules ont été induites *in situ* dans les voies de différenciation, comme décrit précédemment. Au temps de différenciation choisi (J0, J3, J7, J14 et J21) le milieu de différenciation a été substitué par du milieu RPMI-0,25 % BSA dans les chambres inférieures et supérieures des inserts supplémenté de 50 ng/mL de G-CSF (cellules stimulées) ou non supplémenté (cellules non stimulées).

Les tests de migration ont été réalisés en double, avec en parallèle, une migration à travers des inserts nus et deux puits contrôles sans insert correspondant au 100 % de migration.

8.3.1. Addition des cellules hématopoïétiques

Pour réaliser les tests de migration, $1{,}1.10^4$ cellules $CD34^+$ ont été déposées dans la chambre supérieure sous un volume de 100 µL, avec ou non 100 µg/mL de SDF-1 (R&D Systems, Lille, France) dans le tampon de migration au niveau de la chambre inférieure sous un volume de 600 µL. Les plaques ont été ensuite incubées à l'étuve à 37°C sous 5 % de CO_2 pendant 4 heures.

8.3.2. Comptage des cellules ayant migré

Après les 4 heures de migration, les inserts ont été lavés avec du milieu de migration (en prenant bien soin de laver le dessous de l'insert). Le contenu des chambres inférieures de chaque insert a été transféré dans un tube de 5 mL en polystyrène (BD FALCON), puis centrifugé à 250 g pendant 10 minutes à 20°C. Le surnageant a été décanté et le culot cellulaire, laissé sous un volume de 100 µL, a été numéré à l'hématimètre Fastread® (Fisher Scientific). Les résultats ont été exprimés en pourcentage de migration, calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de migration} = \frac{\text{Nombre de cellules ayant migré dans la chambre inférieure}}{\text{Nombre total de cellules présentes dans le puits contrôle}} \times 100$$

Après avoir compté le nombre de cellules ayant migrées et donc évalué le pourcentage de migration des cellules, celles-ci ont été mises en culture clonogénique, permettant après 14 jours de culture d'évaluer le pourcentage de migration des CFU.

8.4. BLOCAGE DE LA MMP-2

Afin de quantifier la migration des CSH au travers des CSM non dépendante de la MMP-2, un test de migration bloquant la MMP-2 a été mis au point. Une solution d'anticorps anti-MMP-2 (clone CA-4001 ; Chemicon, Millipore, Molsheim, France) à la concentration de 4 µg/ml a été déposée sur les inserts. Cette opération a été réalisée 30 minutes avant l'ajout des cellules hématopoïétiques. En parallèle un contrôle isotypique négatif de l'anti-MMP-2 a été déposée sur les inserts (IgG1, clone DD7 ; Millipore).

9. L'ARN INTERFERENCE

La technique d'ARN interférence a été utilisée pour inhiber stablement et de façon spécifique le récepteur au G-CSF. Pour cela, des plasmides codant les shRNA ciblant le transcrit du GCSF (CSF3R Human shRNA plasmids 29-mer, ref:TR313700 ; OriGene, Rockville, USA) ont été amplifiés et transfectés dans des cellules souches mésenchymateuses.

9.1. AMPLIFICATION DES SHRNA

9.1.1. Transformation

Les bactéries *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen) ont été rendues compétentes par traitement au $CaCl_2$. Les bactéries ont été cultivées sous agitation à 37°C jusqu'en phase exponentielle de croissance (A_{600nm} = 0,4) dans du milieu LB, puis centrifugées 10 min à 2500 g à 4°C. Le culot bactérien a été remis en suspension dans du $CaCl_2$ 50 mM, incubé 30 min dans la glace, puis les bactéries ont été centrifugées 10 min à 2500 g à 4°C. Les bactéries ont été ensuite reprises dans la solution de conservation ($CaCl_2$ 50 mM, glycérol 20 %) et stockées à -80°C par aliquot de 100 µl. Après décongélation lente des bactéries compétentes dans la glace, 30 µl de plasmide codant un shRNA ont été ajoutés. La suspension a été incubée dans la glace 30 min, un choc thermique a été réalisé en plaçant l'échantillon 1 min 30 sec à 42°C puis 5 min dans la glace. Les bactéries ont été remises en culture, pendant 1 h à 37°C sous agitation, en ajoutant 1 ml de milieu LB, puis étalées sur du milieu LB/agar (32 g/l ; Invitrogen)/ampicilline (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich).

9.1.2. Purification d'ADN plasmidique

La purification de plasmides par lyse alcaline dérive de la technique de Birnboim et Doly (Birnboim and Doly, 1979). Une colonie bactérienne a été inoculée dans 2 ml de milieu LB additionné de 100 µg/ml d'ampicilline et cultivée pendant 16 h sous agitation à 37°C. La culture a été centrifugée à 14000 g pendant 1 min, le culot bactérien a été remis en suspension dans 100 µl de solution I (Tris-HCl 20 mM, EDTA 10 mM, pH 8, glucose 50 mM). Les bactéries ont ensuite été lysées par 200 µl de solution II (NaOH 0,2 N, SDS 1 %). Après 5 min à température ambiante, l'ADN génomique et les protéines ont été précipités par addition de 150 µl de solution III (acétate de sodium 3 M, pH 5,5). Après 15 min dans la glace, le

précipité a été séparé par une centrifugation de 10 min à 14000 g à 4°C. L'ADN plasmidique, présent dans le surnageant, a été purifié par traitement au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 Vol/24 Vol/1 Vol, Invitrogen), puis centrifugé à 14000 g pendant 5 min à 20°C. La phase aqueuse a été récupérée et additionnée de 0,6 Vol d'isopropanol absolu. Après une centrifugation de 10 min à 14000 g à 20°C, le culot d'ADN a été lavé avec de l'éthanol 70 % puis séché à température ambiante. Le culot a ensuite été solubilisé dans 25 µl d'H_2O contenant 0,2 mg/ml de ribonucléase A (Sigma-Aldrich). La quantité d'ADN purifié a été mesurée par spectrophotométrie à 260 et 280 nm.

9.2. TRANSFECTION DES CSM

Six boites de 75 cm² (BD FALCON) de CSM à 70 % de confluence ont chacune été transfectées avec 37,5 µg d'ADN total (shRNA) à l'aide de 72 µl d'agent de transfection Fugene6 (Roche). Le mélange d'ADN-agent de transfection additionné de 2 ml de DMEM a été déposé sur les cellules. Après 5 h, 3 ml de milieu DMEM supplémenté comme ci-dessus ont été ajoutés. Soixante douze heures post-infection, les cellules ont été récupérées et l'inhibition de l'expression des protéines cibles a été contrôlée par Western-blot sur l'extrait membranaire total (voir chapitre 2.2.3.2), avant de réaliser les tests fonctionnels de migration (voir chapitre 8) sur des CSM transfectées comme ci-dessus.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

A- ETUDE PHENOTYPIQUE ET FONCTIONNELLE DES CSM AU COURS DE LEUR DIFFERENCIATION

Le but de ce travail est d'étudier la capacité des CSM à réguler l'hématopoïèse au cours des différenciations A, O ou V, puisque les adipocytes, les ostéoblastes et les cellules vasculaires musculaires lisses font partie intégrante des cellules du microenvironnement.

La régulation de l'hématopoïèse sera testée selon deux critères, la capacité de soutien de l'hématopoïèse à long terme et la capacité de migration des progéniteurs hématopoïétiques au travers des CSM. La fonction hématopoïétique des CSM a été estimée dans les 3 voies de différenciation ainsi qu'à différents stades de la différenciation A, O ou V.

1. EVALUATION DE LA MULTIPOTENCE ET DU PHENOTYPE DES CSM

1.1. CAPACITE DE DIFFERENCIATION MESENCHYMATEUSE DES CSM

Dans les années 1970, Friedenstein met en culture des cellules de moelle osseuse de cobaye ou de souris en milieu liquide et observe la formation de colonies clonales de cellules adhérentes d'apparence fibroblastique qu'il nomme les CFU-F (colony-forming unit-fibroblasts) (Friedenstein *et al.*, 1970). Ces cellules placées individuellement sous la capsule rénale de souris syngénique, génèrent après quelque semaines, du tissu fibreux, de l'os (pour 15 % des cellules) et dans certains cas, de l'os associé à de la moelle osseuse (15 %). L'utilisation d'animaux chimériques permet de montrer que l'os et la moelle sont issus des cellules du donneur, alors que les cellules hématopoïétiques qui s'y associent sont originaires de l'hôte.

À partir de ces résultats, deux hypothèses majeures ont été posées : la première sur l'existence, au sein de la moelle osseuse, d'un progéniteur des cellules ostéogéniques et du tissu fibreux, et la seconde sur l'existence d'un microenvironnement, issu du développement de CFU-F, capable de fournir les conditions cellulaires et moléculaires adéquates pour le nichage et la croissance des CSH. Cette seconde hypothèse correspond à celle de la niche hématopoïétique ainsi qu'exposé par Schofield.

Ces CFU-F présentent un certain nombre de caractéristiques qui permettent de les assimiler à des cellules souches du tissu conjonctif, d'où la dénomination de Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM). Prockop et Caplan définissent les CSM comme des cellules capables de générer des ostéoblastes, des chondrocytes, des adipocytes, des cellules du tendon

et du muscle (Caplan, 1991; Prockop, 1997). Prockop pose la question de l'identité de ces cellules avec les cellules stromales responsables du soutien de l'hématopoïèse.

Pour chacune des 3 différenciations étudiées (A, O et V), les cellules différenciées ont été analysées au niveau cellulaire par une coloration histochimique ou par immunofluorescence, par analyse des protéines spécifiques (Western blot) et au niveau moléculaire par la mise en évidence des transcrits tissus spécifiques par qRT-PCR. Un pool de chaque population de cellules différenciées est réservé à l'analyse de la perte d'immaturité des cellules. Parallèlement la capacité de différenciation des CSM dans la voie chondrocytaire a également été vérifiée.

1.1.1. Différenciation adipogénique

La différenciation adipogénique est obtenue au bout de 14 jours de culture en milieu inducteur. Afin d'observer l'évolution des cellules au cours de la différenciation les cellules ont été observées après 3, 7, 14 et 21 jours de différenciation.

La coloration des vésicules lipidiques des adipocytes au Rouge de Nile a permis de mettre en évidence l'apparition de la formation de vésicules lipidiques de grande taille et l'augmentation du nombre d'adipocyte au cours de la différenciation. Aucune vésicule lipidique n'est observée à l'état basal (j0), après trois jours de différenciation (j3) des vésicules lipidiques intracytoplasmiques de couleur jaune, aux bords irréguliers et peu nets sont observables. À partir de j7 et jusqu'à j21, des vésicules aux contours réguliers et nets, sont plus clairement visibles et plus nombreuses *(Figure 18A).*

L'analyse par Western blot confirme cette différenciation, en montrant l'augmentation tout au long de la cinétique de deux protéines spécifique de la différenciation adipogénique : la leptine et le ppargamma (PPARγ). Une forte augmentation des protéines est observée, après intégration des signaux à l'aide du logiciel ImageJ®, l'intensité à j14 est doublée en comparaison à j0, il est a noté qu'avant toute induction adipogénique (j0) les CSM expriment déjà significativement la leptine (17 kDa) et le PPARγ (67 kDa) *(Figure 18B)*.

L'induction dans la voie adipogénique est confirmée par l'analyse par qRT-PCR de l'expression du gène PPARγ et de la lipoprotéine lipase (LPL). L'expression des gènes à tout d'abord été quantifiée à l'état non différencié (j0) puis au cours de la différenciation par rapport à l'état non différencié.

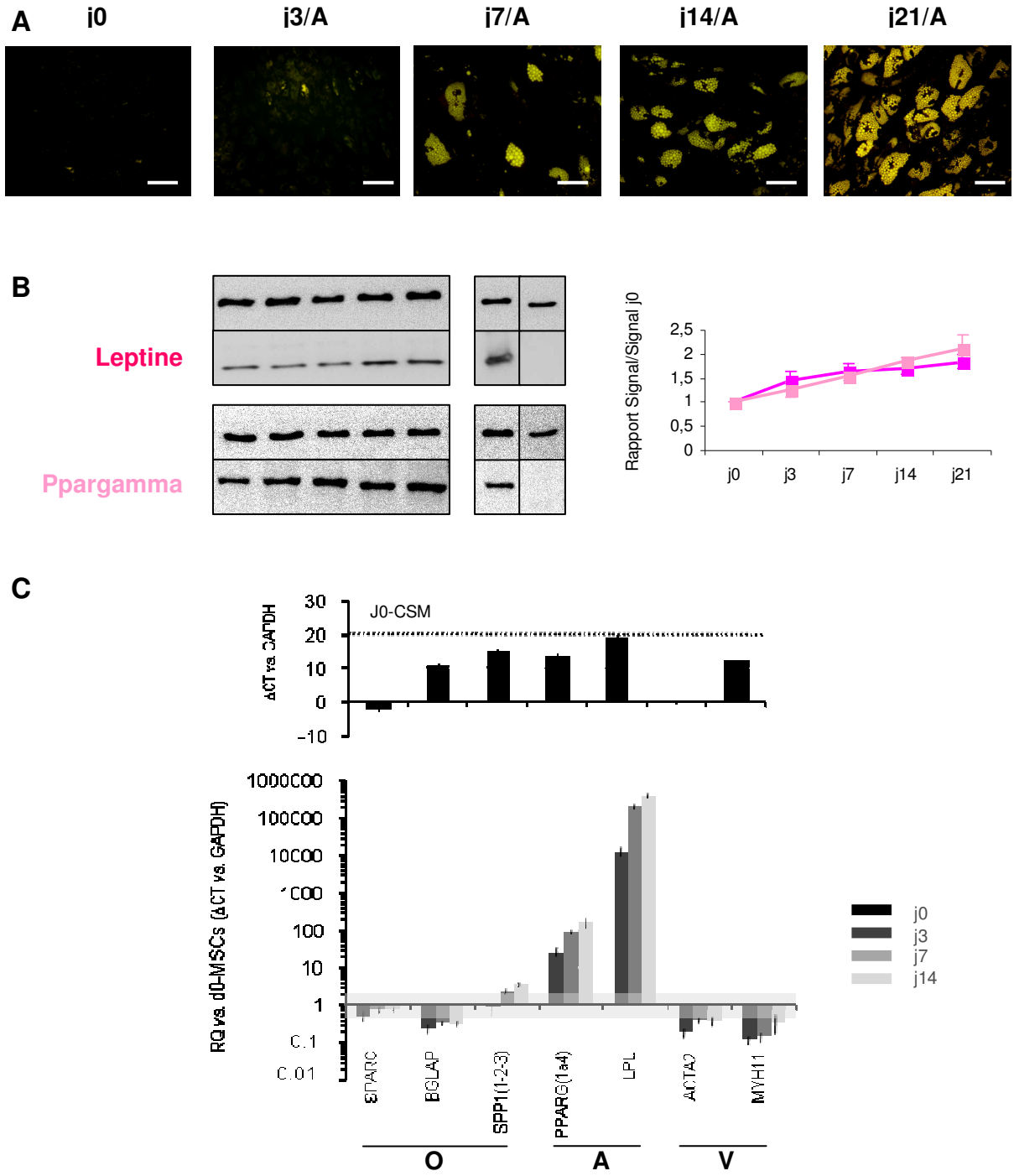


Figure 18 : Contrôle de la différenciation adipocytaire.

(A) coloration au rouge de Nile des CSM induites en différenciation, observation au microscope à fluorescence (X20). L'échelle représente 200 µm. **(B)** Détection des protéines leptine et Ppargamma par Western blot et intégration des signaux au cours de la cinétique de différenciation par rapport à l'état basal (j0). **(C)** Étude des transcrits des gènes SPARC (Ostéonectine), BGLAP (Ostéocalcine), SPP1 (Ostéopontine), PPARG (Ppargamma), LPL (Lipoprotéine lipase), ACTA2 (Actine alpha 2) et MYH11(Myosine chaîne lourde 11) par qRT-PCR. Les résultats proviennent de 3 expériences indépendantes (n=3).

L'évolution de l'expression des gènes est considérée significative lorsque l'expression est augmentée d'un facteur 2 ou diminué d'un facteur 0,5. L'analyse montre une induction progressive de PPARγ et de LPL au cours de la différenciation adipogénique *(Figure 18C)*. Concernant l'expression des gènes spécifiques de la voie O aucune variation d'expression n'est observable tout au long de la cinétique de différenciation. De plus, la diminution de l'expression de gènes spécifiques de la voie V fortement exprimée à l'état non différencié est également observée (ACTA2 et MYH1) et cela dès 3 jours de différenciation.

1.1.2. Différenciation ostéogénique

La différenciation ostéogénique est obtenue au bout de 21 jours de culture en milieu inducteur. Afin d'observer l'évolution des cellules au cours de la différenciation les cellules ont été observées après 3, 7, 14 et 21 jours de différenciation.

Les CSM ont été placées en milieu de différenciation ostéogénique et colorées au Rouge d'Alizarine à chaque temps de différenciation afin d'observer l'apparition de complexes rouges représentant la complexation du rouge d'alizarine et des sels de calcium au cours de la différenciation ostéogénique.

Dès le troisième jour de différenciation, il y a apparition de sels de calcium en rouge représentant des foyers de minéralisation. Leur nombre augmente de manière significative au cours de la cinétique de différenciation et cela progressivement jusqu'à 21 jours (Figure 19A).

L'analyse des protéines spécifique de la voie ostéogénique : le récepteur à la parathormone (PTHR) et le récepteur sensible au calcium (CaSR) montre d'une part une très nette augmentation du CaSR (120 kDa) après 14 jours de différenciation alors que le PTHR (80 kDa) est présent avant toute induction en différenciation ostéogénique et garde un niveau constant tout au long de la cinétique de différenciation. De plus la mesure semi-quantitative de l'intensité des signaux confirme ce résultat en montrant que la quantité de protéine de CaSr était multipliée par six en fin de différenciation et que la quantité de protéine de PTHR ne varie pas au cours de la différenciation. De la même façon que pour la différenciation adipogénique, il y a déjà présence de ces deux protéines spécifiques de la différenciation ostéogénique avec des CSM non différenciées, ces protéines sont déjà présentes à l'état basal *(Figure 19B)*.

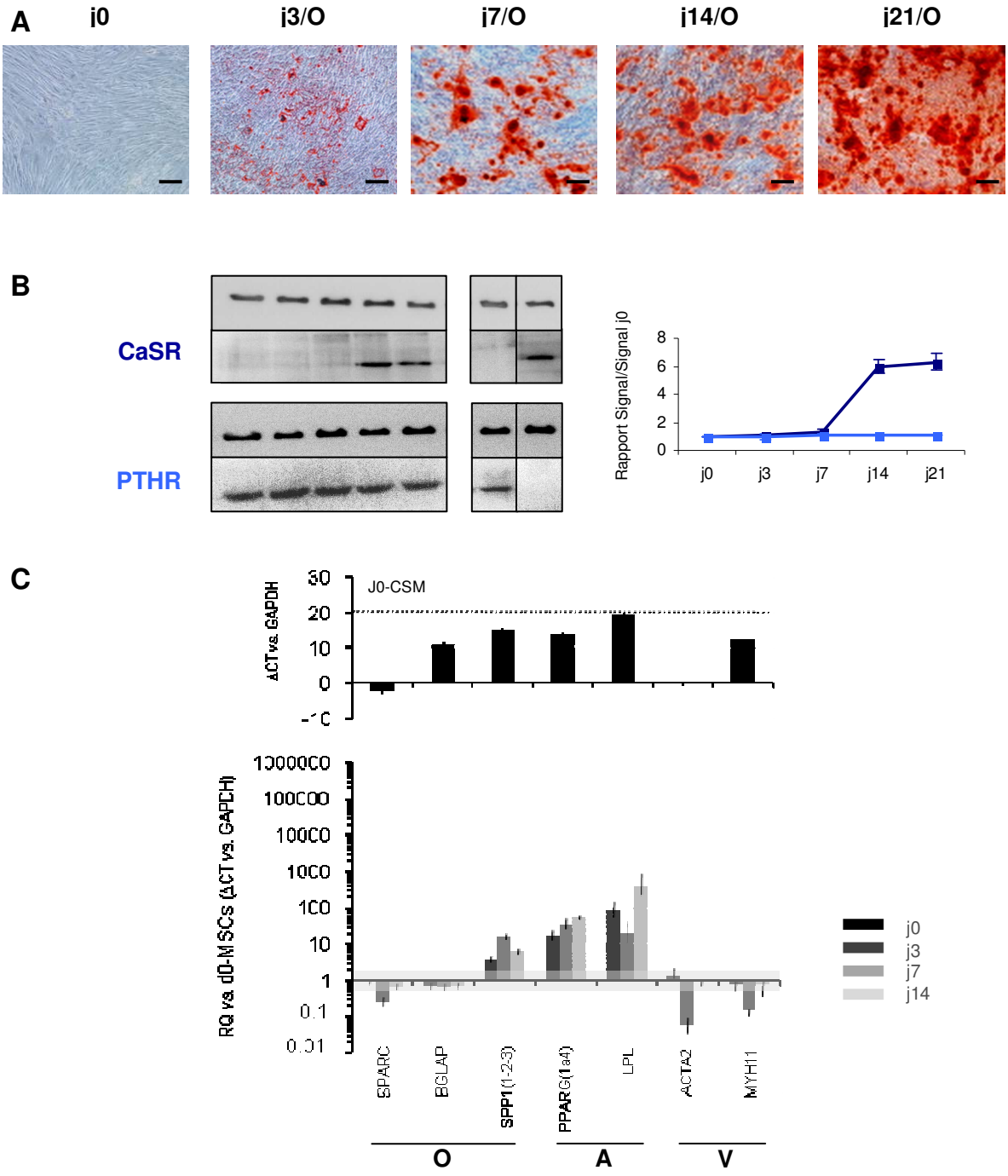


Figure 19 : Contrôle de la différenciation ostéocytaire.

(A) coloration au rouge d'Alizarine des CSM induites en différenciation, observation au microscope inversé à contraste de phase (X10). L'échelle représente 150 µm. **(B)** détection des protéines CaSR et PTHR par Western blot et intégration des signaux au cours de la cinétique de différenciation par rapport à l'état basal (j0). **(C)** Étude des transcrits des gènes SPARC (Ostéonectine), BGLAP (Ostéocalcine), SPP1 (Ostéopontine), PPARG (Ppargamma), LPL (Lipoprotéine lipase), ACTA2 (Actine alpha 2) et MYH11(Myosine chaîne lourde 11) par qRT-PCR. Les résultats proviennent de 3 expériences indépendantes (n=3).

L'induction dans la voie ostéogénique est confirmée par l'analyse par qRT-PCR de l'expression du gène de l'ostéopontine (SPP1) qui augmente au cours de la différenciation jusqu'à 7 jours de différenciation, mais l'analyse des transcrits ostéogénique ne permet pas de distinguer une différence d'expression au cours de la cinétique de différenciation de e autres gènes spécifiques de la différenciation O, l'ostéonectine (sparc) ainsi que de l'ostéocalcine (Bglap) *(Figure 19C)*. Toutefois, une diminution de l'expression des gènes spécifiques de la voie V est observée après 7 jours de différenciation O. Parallèlement, une augmentation des gènes spécifiques de la voie adipogénique est remarquée, les gènes PPARγ et LPL augmentant fortement après 3 jours de différenciation ostéogénique, et continuant à augmenter au cours de la différenciation.

1.1.3. Différenciation vasculaire musculaire lisse

La différenciation vasculaire musculaire lisse est obtenue de façon terminale après 21 jours de culture en milieu inducteur. Afin d'observer l'évolution des cellules au cours de la différenciation les cellules ont été observées après 3, 7, 14 et 21 jours de différenciation.

La capacité à former du tissu vasculaire musculaire lisse est montrée par l'induction au cours du traitement du smooth muscle 22 alpha (Sm22α). Le marquage par immunofluorescence a permis d'observer *in situ* l'augmentation de sm22α au cours de la différenciation V. Il est a noté qu'il y a déjà un marquage du sm22α à l'état basal des CSM mais celui-ci augmente fortement au cours de cette différenciation *(Figure 20A)*.

L'analyse par Western blot confirme cette différenciation, en montrant la présence de la protéine alpha smooth muscle actin (ASMA) et de la protéine caldesmone. Ces protéines spécifiques de la voie vasculaire musculaire lisse sont également présentes à l'état non différenciée des CSM et augmentent progressivement au cours de la cinétique de différenciation jusqu'à doubler à j14. Toutefois il est à noter une légère diminution après 21 jours de différenciation de la protéine ASMA, qui est retrouvée systématiquement dans toutes les expériences.

D'autre part, l'analyse des transcrits spécifiques de la différenciation vasculaire musculaire lisse ne permet pas de distinguer une différence d'expression au cours de la différenciation pour l'actine (ACAT 2) ni pour la myosine (MYH1) *(Figure 20B, 20C)*, bien que ces gènes soit déjà fortement exprimés à l'état basal.

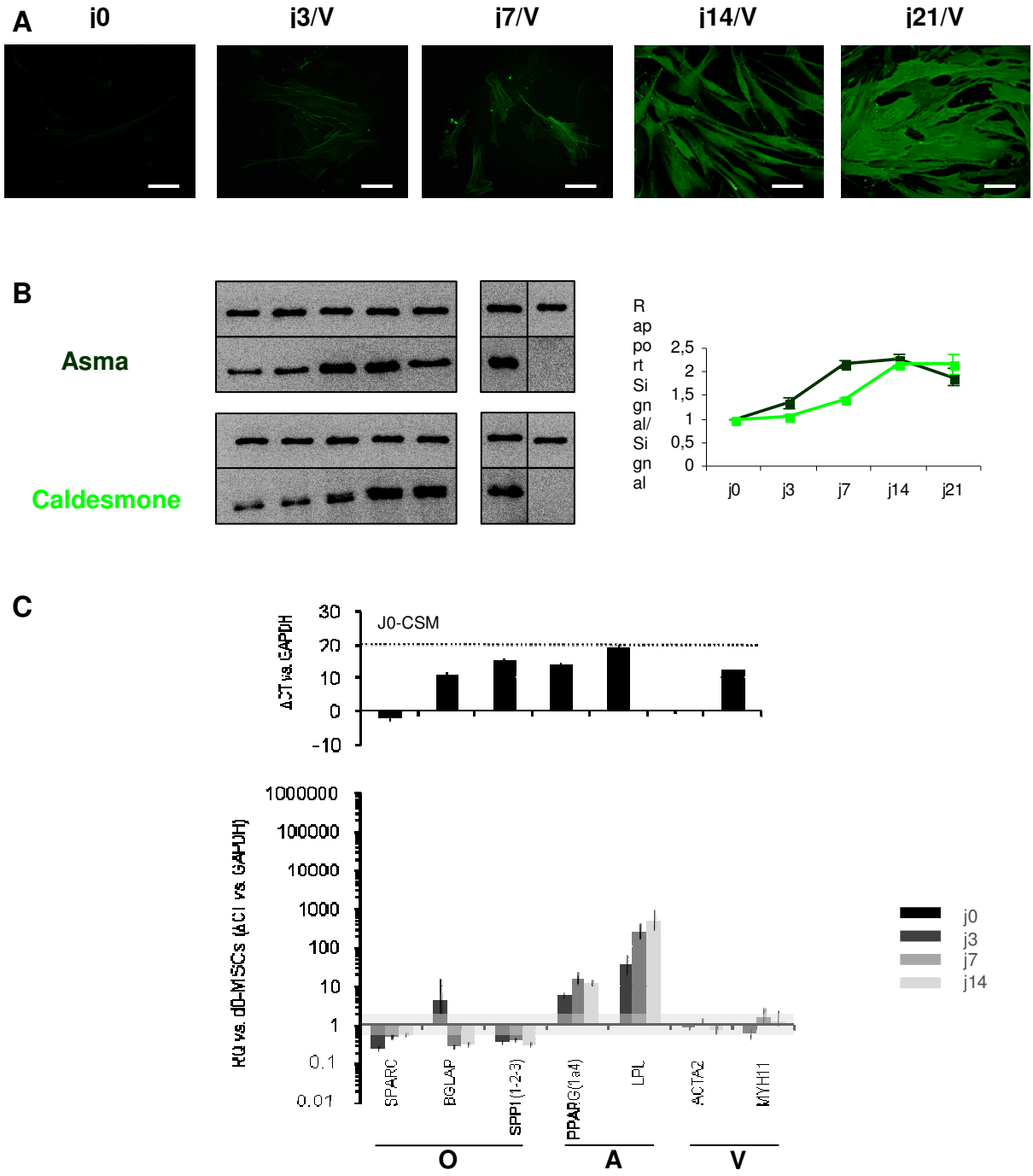


Figure 20 : Contrôle de la différenciation vasculaire musculaire lisse.

(A) marquage du sm 22 α en immunofluorescence *in situ*, observation au microscope à fluorescence (X20). L'échelle représente 200 µm. **(B)** Détection des protéines asma et caldesmone par Western blot et intégration des signaux au cours de la cinétique de différenciation par rapport à l'état basal (j0). **(C)** Étude des transcrits des gènes SPARC (Ostéonectine), BGLAP (Ostéocalcine), SPP1 (Ostéopontine), PPARG (Ppargamma), LPL (Lipoprotéine lipase), ACTA2 (Actine alpha 2) et MYH11(Myosine chaîne lourde 11) par qRT-PCR. Les résultats proviennent de 3 expériences indépendantes (n=3).

Tout comme pour la différenciation ostéogénique, une augmentation de l'expression des gènes spécifiques à la voie adipogénique est observée. L'augmentation de l'expression du gène PPARγ semble suivre l'évolution retrouvée avec la différenciation ostéogénique, mais avec des valeurs inférieures, en comparaison l'expression de LPL suit également la même évolution que dans la différenciation ostéogénique mais avec des valeurs d'expression beaucoup plus élevées. Il est a noter que l'augmentation de l'expression des gènes spécifiques de la différenciation adipogénique retrouvé dans la différenciation O et V est significativement observée mais inférieure à l'augmentation spécifique retrouvée avec la différenciation adipogénique. Cependant aucune variation de l'expression des gènes spécifiques de la différenciation O n'est retrouvée.

1.1.4. Différenciation chondrocytaire

Dans un nombre limité de cas, la différenciation chondrocytaire a été vérifiée après 21 jours de culture en milieu inducteur. Les CSM ont été cultivées en micromasse afin de faciliter la chondrogénèse. Les culots différenciés de CSM présentaient sur leur partie centrale, un marquage positif pour trois colorants distincts, la safranine O, le bleu de toluidine et le bleu alcian, ce qui confirme la présence de glycoaminoglycanes (chondroïtine sulfate et kératane sulfate) au niveau de la matrice extracellulaire ainsi que des structures hypertrophiées caractéristiques du cartilage. La coque externe par contre n'était pas marquée *(Figure 21)*.

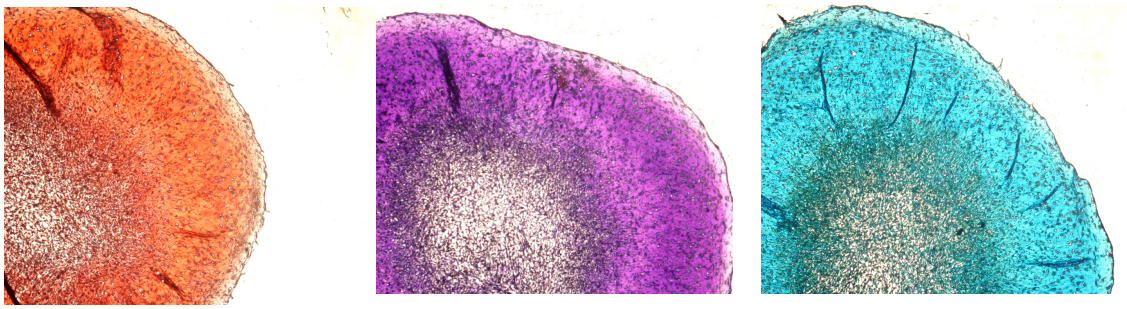


Figure 21 : Etude histologique des CSM induites en différenciation chondrogénique.

Coloration de la matrice extracellulaire avec la safranine O, le bleu de toluidine et le bleu alcian des micro masses obtenues après 21 jours d'induction chondrogénique sur les lignées et des CSM au grossissement X20. La barre représente 150µm.

1.2. EXPRESSION DES MARQUEURS D'IMMATURITE DES CSM

Afin d'étudier l'évolution de l'immaturité des CSM au cours de la différenciation nous nous sommes plus particulièrement intéressés à des marqueurs de cellules embryonnaires, puisque les cellules embryonnaire représentent le stade le plus précoce et donc caractérisent le stade le plus immature des CSM.

En ce qui concerne les cellules embryonnaires, celles-ci sont dérivées de la masse interne du blastocyste en stade précoce *(Figure 22)* et sont capables de former un organisme entier (Trounson, 2006). Pendant leurs premières divisions elles, sont dites totipotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier en n'importe quelle cellule des trois feuillets embryonnaires à savoir l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme.

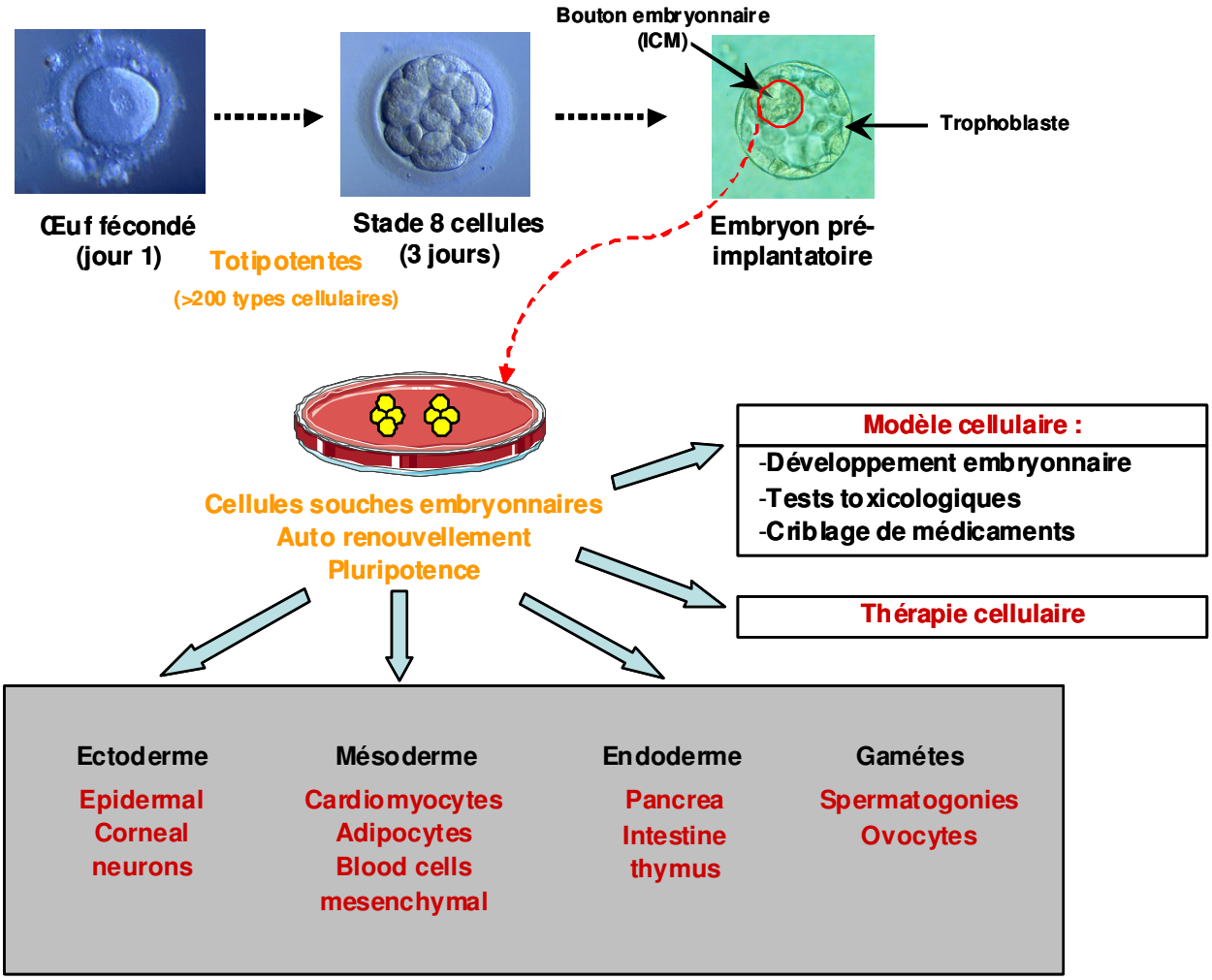


Figure 22 : Origine des cellules souches embryonnaires

Plus particulièrement ces cellules expriment des marqueurs communs à toutes les cellules souches indifférenciées comme les CD 9 et 24, Oct-4, Nanog, Pal, LIN28, Rex-1, Cripto/TDGF1, DNMT3B, SOX2, EBAF, Thy-1, SSEA-3 et –4 et TRA-1-60 et –1-81 (Richards *et al.*, 2004). De plus, l'expression à très long terme de la télomérase confère aux cellules ES la capacité de s'auto-renouveler indéfiniment et de se différencier en toutes les cellules souches et progéniteurs adultes et foetaux. Le gène *Bmi1* semble aussi avoir un rôle clef dans la régulation de l'auto-renouvellement et de la prolifération des CS et des progéniteurs, comme le montre son expression restreinte aux cellules primitives de la moelle osseuse chez la souris et l'humain (Lessard *et al.*, 1998). Cependant aujourd'hui, il n'est toujours pas possible de maitriser leur différenciation complète en une population homogène qui puisse être transplantée chez des patients. Les cellules souches embryonnaires suscitent un débat éthique mondial. En effet leurs vastes propriétés laissent envisager la possibilité de cloner, un jour, l'être humain. Plus raisonnablement il est possible d'espérer recréer des tissus, voir des organes *in vitro*. Le risque majeur d'utilisation des cellules ES en clinique vient de leur pouvoir tumorigène. En effet, la persistance de cellules indifférenciées dans une population greffée engendre de graves risques de développement de cancers. Il a déjà été démontré que les cellules ES provoquaient *in vivo* des tératomes (Amit *et al.*, 2000) et c'est pour ces raisons que nous avons utilisé comme témoin positif pour les immunofluorescence une lignée de cellules humaine de tératomes d'origine embryonnaire (NTera-2).

Parmis les marqueurs communs à toutes les cellules souches indifférenciées cités précédemment nous nous sommes plus particulièrement intéressés à Nanog, Oct4, Sox2 et Bmi-1.

Nanog est une homéoprotéine qui a été récemment identifiée par sa forte expression dans les cellules ES de souris, et également chez l'humain. Son expression est down-régulée au cours de la différenciation. Deux groupes ont montré que Nanog est requis pour l'auto-renouvellement des cellules ES et que sa sur-expression est suffisante pour maintenir un haut niveau d'expression d'Oct3/4, Nanog agissant de concert avec LIF, mais ne semble moduler ni la voie LIF, ni la voie BMP. Les cibles de Nanog ne sont pas clairement identifiées, il semble toutefois que la voie de signalisation TGFβ soit régulée par Nanog (Chambers *et al.*, 2003; Mitsui *et al.*, 2003).

Oct-4 est une protéine appartenant à la famille des facteurs de transcription POU. Ces protéines ont toutes en commun leur domaine de liaison à l'ADN, le domaine POU. POU est

l'acronyme de Pit-1, Oct-1 et Unc86, les trois facteurs de transcription à partir desquels ce domaine a été décrit. Le facteur de transcription octamer motif binding Oct3/4, est un facteur ayant été identifié (il y a près de 20 ans) comme exprimé très tôt au cours du développement, et exprimé par la plupart des lignées de cellules ES (indifférenciées, disparait rapidement après *in vitro* différenciation). Un niveau précis d'expression de ce facteur est requis pour maintenir l'état des cellules ES, puisque sa sur-expression et sa sous-expression entraînent des changements de cet état. Le promoteur de Oct3/4 a été caractérisé, il contient des sites de liaison pour plusieurs facteurs, comme le facteur de transcription Sox2 (SRY type High Mobility Group protein, famille d'environ 20 membres). Les facteurs extrinsèques régulant l'expression de Oct3/4 n'ont pas été identifiés, mais il se pourrait que l'acide rétinoïque soit impliqué dans ce processus (Taranger *et al.*, 2005). Les effecteurs de la voie Oct3/4-Sox ne sont pas identifiés. La voie Oct3/4 et la voie LIF-STAT ne semblent pas se réguler l'une l'autre et il est probable qu'elles agissent en parallèle (Chambers *et al.*, 2003).

Le gène *SOX2* est localisé sur le chromosome 3 au niveau du locus q26.3-q27. La région codante comprend un unique exon. Il appartient au groupe des gènes *SOXB* comprenant aussi *SOX1*, *SOX3*, *SOX14*, et *SOX21*. Le produit de ce gène est une protéine de 317 acides aminés. Cette molécule s'exprime dans les cellules souches embryonnaires comme facteur de transcription pour plusieurs gènes de développement notamment au niveau oculaire et neurologique. Sox2 en tant que facteur de transcription lors de l'embryogenèse se retrouve donc impliqué dans plusieurs processus biologiques tels que la neurogénèse, la formation de l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme (Boyer *et al.*, 2005). Sox2 n'agit pas seul, il forme un complexe avec d'autres facteurs de transcription tels que Nanog, Oct4, Oct1 lors de l'embryogenèse. En ce qui concerne le complexe Nanog/Oct4/Sox2, il a été démontré qu'il pourrait s'autoréguler par la propre régulation de chacun des facteurs (Boyer *et al.*, 2005).

Lors de la culture de cellules souches embryogéniques, il faut ajouter des facteurs de transcription tels que NANOG, Oct1/4 et SOX2 pour maintenir l'auto renouvellement des cellules souches indifférenciées (Takahashi and Yamanaka, 2006).

BMI1 est un gène appartenant à la famille des gènes polycombes impliqués dans la régulation de nombreux autres gènes. Les protéines faisant partie de cette famille sont capables de remodeler la chromatine pour empêcher la fixation de facteurs de transcription sur les promoteurs des gènes cibles et ainsi réprimer leur expression. En plus d'être présent dans les cellules primitives de la moelle osseuse humaine, Bmi-1 a un rôle critique, et dose-dépendant, dans la régulation de la prolifération des progéniteurs primitifs de la moelle

osseuse (Lessard *et al.*, 1999). De même, dans le cas de la LAM, le gène *BMI1* semble être essentiel au maintien des cellules souches leucémiques. En effet, les cellules leucémiques délétées pour ce gène peuvent engendrer une leucémie chez un premier hôte mais pas dans un deuxième. À l'inverse, si *BMI1* est réintroduit dans ces mêmes cellules par l'intermédiaire d'un vecteur, les cellules sont alors capables de générer une leucémie dans le deuxième hôte. Ceci permet de mettre en évidence le rôle clef de Bmi-1 dans l'auto-renouvellement et le maintien à long terme des CS (Lessard and Sauvageau, 2003).

Nous avons analysé dans cette étude l'état d'immaturité des CSM au cours des différenciations A, O et V via ces molécules spécifiques de l'immaturité. Pour cela nous avons observé les marqueurs d'immaturité au niveau cellulaire par immunofluorescence et suivi au cours de la différenciation au niveau moléculaire par la mise en évidence des transcrits par qRT-PCR.

L'analyse de Nanog et de Oct-4 par immunofluorescence ne montre aucune fluorescence spécifique pour les deux marqueurs et cela même pour les CSM non différenciées (j0). Ce résultat n'est pas confirmé par l'analyse par qRT-PCR où l'expression des gènes NANOG POU5F1 (1 et 2) (Oct-4) est présente à l'état non différencié. Lévolution de ces 2 gènes est différente selon la voie de différenciation prise par les CSM. En ce qui concerne l'expression du gène NANOG celle-ci est diminuée au cours des différenciations A et V mais une augmentation de l'expression de ce gène au cours de la différenciation ostéogénique est observé. De la même manière l'expression du gène POU5F1 (1 et 2) (Oct-4) est plus faiblement détectée à j0 que l'expression du gène NANOG puis est augmenté au cours de la différenciation ostéogénique, avec aucune évolution de l'expression au cours de la cinétique O *(Figure 23)*. Parallèlement au cours des différenciations A et V aucune modification de l'expression de POUF5F1 est observée seul au temps j3/A une diminution significative est obtenue.

De la même manière, l'analyse de Sox2 et Bmi-1 a été réalisée par immunofluorescence et celle-ci montre un marquage spécifique des noyaux cellulaire des CSM à l'état basal. L'analyse par qRT-PCR de l'expression du gène *SOX2* montre une expression très faible à j0 qui n'évolue pas pendant la différenciation A, contrairement à la différencitaion V où une légère diminution est observée après 14 jours de différenciation. Parralèlement l'expression de SOX2 augmente à j3/O pour rester constante ensuite tout au long de la différenciation O *(Figure 23)*.

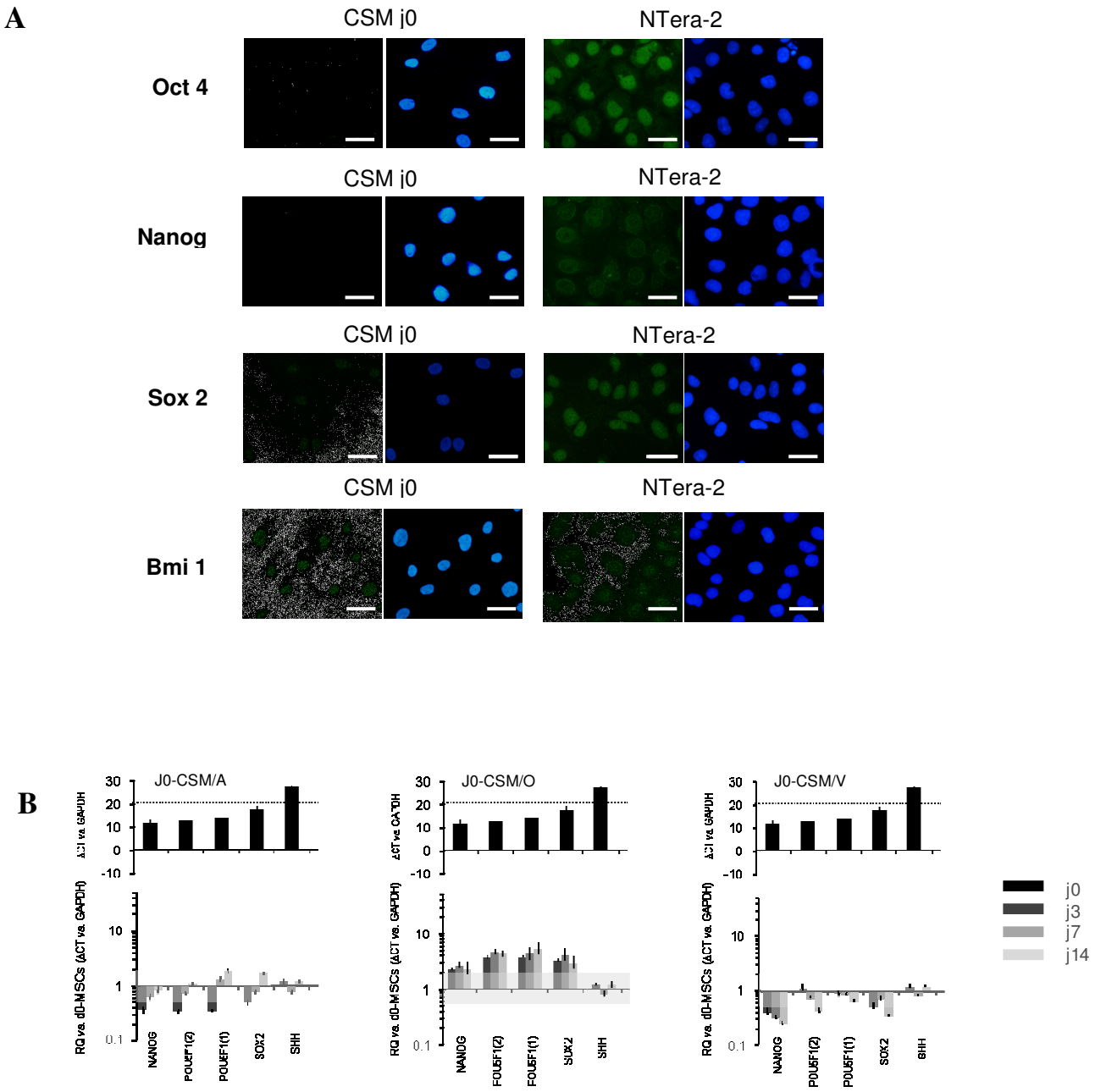


Figure 23 : Etude des marqueurs d'immaturité.

(A) Immunofluorescence *in situ* des CSM avant et après 14 jours de culture en milieu d'induction A, O ou V et immunofluorescence *in situ* des N-Tera2. Observation au microscope à fluorescence (X40) l'échelle correspond à 100 µm. **(B)** Étude des transcrits des gènes NANOG (Nanog), POU5F1 (Oct4), SOX2 (Sox2) et SHH (Sonic hedgehog) par qRT-PCR. Les résultats proviennent de 3 expériences indépendantes (n=3).

Au cours de cette étude moléculaire nous avons également suivi par qRT-PCR l'évolution de l'expression d'un autre gène qui pourait-être important dans l'état d'immaturité des cellules il s'agit de SHH qui est un des trois facteurs Hedgehog indispensables au développement embryonnaire. Les CSM non différenciées expriment extrêmement faiblement le gène SHH et aucune évolution n'apparaît visible au cours des 3 différenciations A, O ou V *(Figure 23)*.

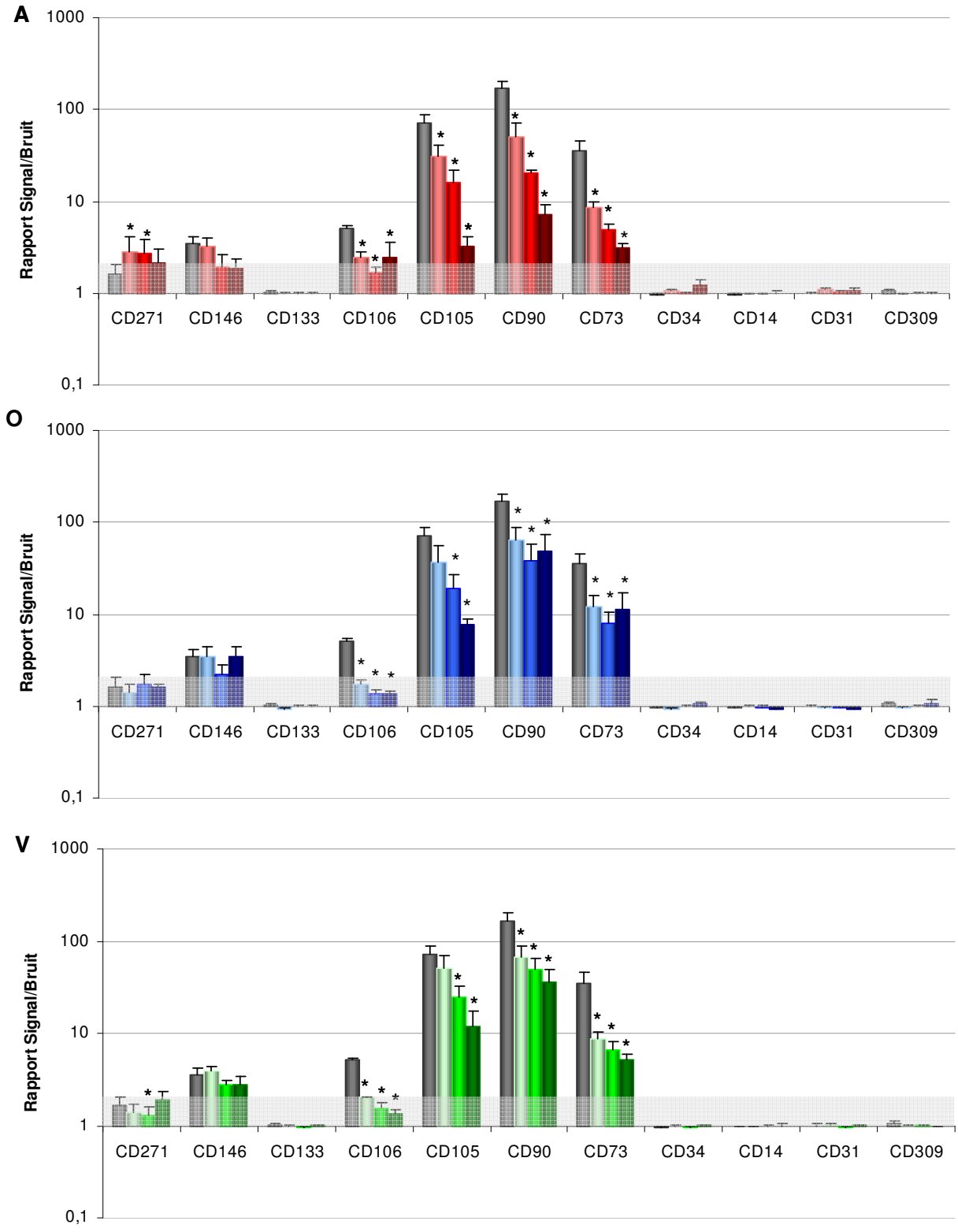
Lors de cette première partie du travail nous avons vérifié l'induction des CSM dans les 4 voies de différenciation. Les CSM ont acquis les marqueurs spécifiques de chaque voies A, O, V et C mais ont également perdu des marqueurs d'immaturité validant l'engagement des CSM dans une voie de différenciation. Pour la suite du travail nous avons utilisé les CSM engagées dans les voies de différenciation A, O et V afin de tester leur capacité de soutien de l'hématopoïèse et leur capacité à faire migrer les CSH.

1.3. EVALUATION DU PHENOTYPE MEMBRANAIRE DES CSM

L'étude de l'expression de protéines membranaires, dont la présence ou l'absence caractérise les CSM, a été faite sur les différentes cellules en différenciation. Les marqueurs d'immaturité ont d'abord été étudiés. Les résultats du phénotypage membranaire montre que le CD271 n'est pas représenté significativement à l'état indifférencié des CSM et n'évolue presque pas au cours des différenciations, seul pour les temps j3/A et j7/A nous observons une légère augmentation. De même le CD146 est présent à l'état basal dans les CSM mais aucune variation significative n'est montrée au cours des différenciations O et V, et disparaît après 7 jours de différenciation A, alors que le CD133 est lui complètement absent sur les trois différenciations *(Figure 24)*.

Pour les marqueurs classiquement retrouvés sur les CSM, nous avons observé la diminution de l'expression du CD105, du CD90 et du CD73 au cours des 3 différenciations. Pour ces trois marqueurs la diminution commence dès l'engagement des CSM dans une voie de différenciation et diminue parallèlement à l'évolution en différenciation des cellules, ce qui confirme l'engagement des CSM dans une voie de différenciation *(Figure 24)*.

L'étude des marqueurs hématopoïétiques et endothéliaux indique l'absence des récepteurs membranaires à la surface des cellules tout au long de la cinétique de différenciation. Elles ne possèdent ni le marqueur CD34 retrouvé chez tous les progéniteurs et cellules souches d'origine hématopoïétique, ni le CD14, marqueur de la lignée monocytaire.



<u>Figure 24 :</u> Phénotype membranaire des CSM au cours des différenciations A, O ou V.

Les résultats proviennent de 3 expériences indépendantes (n=3). * Résultats similaires dans les 3 expériences. La valeur seuil du rapport signal bruit a été choisie arbitrairement à 2 ( ).

j0 ( ), j3/A ( ), j7/A ( ), j14/A ( ), j21/A ( ), j3/O ( ), j7/O ( ), j14/O ( ), j21/O ( ), j3/V ( ), j7/V ( ), j14/V ( ), j21/V ( ),

Aucune expression du CD31, un des constituants majeurs des jonctions intercellulaires des cellules endothéliales vasculaires ou du CD309 n'est retrouvée au cours des trois différenciations *(Figure 24)*.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à une molécule d'adhérence : VCAM-1 (CD106) celle-ci ayant un rôle important pour les cellules d'origine mésenchymateuse puisque la liaison VCAM-1/VLA4 est décisive au maintien des CSH dans la niche. Au cours de cette étude le marqueur CD106 est exprimé par les CSM à l'état basal, mais cette expression est très fortement diminuée dès 3 jours d'engagement des CSM en voie de différenciation A, O ou V. Cette chute continue au cours de la cinétique et cela de façon équivalente dans les 3 différenciations *(Figure 24)*.

En conclusion de cette étude phénotypique faite par cytométrie en flux, nous pouvons retenir qu'il existe peu de différences entre les 3 différenciations. Une absence des marqueurs hématopoïétiques et endothéliaux est confirmée. De plus les CSM engagées dans une voie de différenciation perdent les marqueurs mésenchymateux, mais maintiennent les marqueurs d'immaturité. Enfin les différenciations A, O ou V entraînent une diminution de VCAM-1, cette diminution pourrait avoir une incidence sur le maintien des CSH dans leur niche et donc sur le maintien du soutien de l'hématopoïèse.

1.4. EXPRESSION DES TRANSCRITS DES PROTEINES POTENTIELLEMENT IMPLIQUEES DANS LA NICHE

L'analyse des transcrits spécifiques de l'hématopoïèse montre des différences d'expression entre les différentes différenciations. Nous avons étudié l'expression des ARNm des CSM différenciées dans les voies A, O et V et plus particulièrement l'expression des ARNm des gènes ITGA5 (VLA5), VCAM-1, JAG-1 (jagged), ITGA4 (VLA4), BMP4 et KTLG (SCF). L'expression des gènes à tout d'abord été quantifié à l'état non différencié (j0) puis quantifié au cours de la différenciation par rapport à l'état non différencié. L'évolution de l'expression des gènes est considérée significative lorsque l'expression est augmentée d'un facteur 2 ou diminué d'un facteur 0,5 *(Figure 25)*.

L'analyse des transcrits montre de grandes disparités de l'expression des gènes entre les différenciations A, O et V.

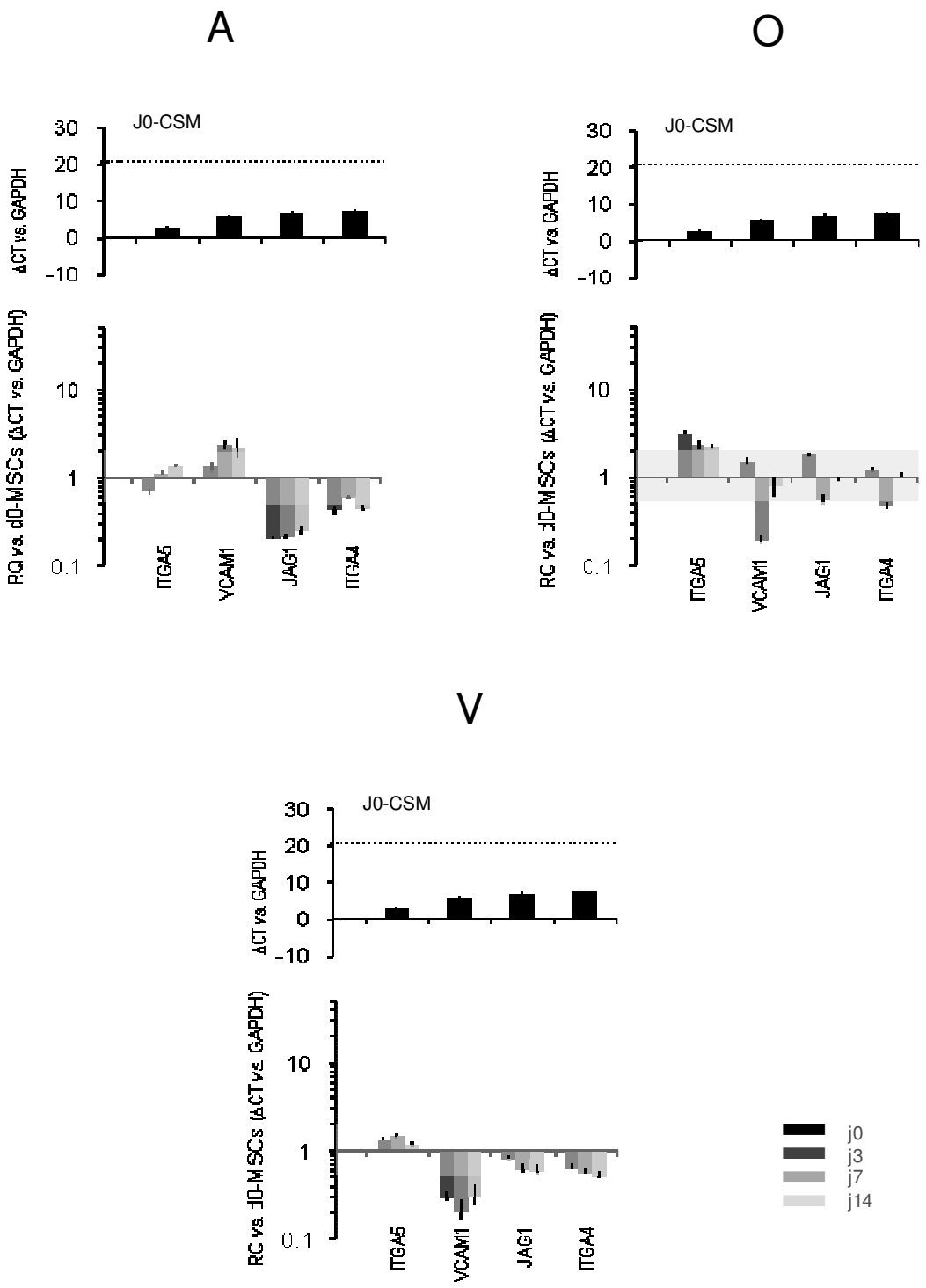


Figure 25 : Analyse des gènes impliqués dans l'hématopoïèse par qRT-PCR.

Les résultats proviennent de 3 expériences indépendantes (n=3).

Tout d'abord, l'expression de ces 4 gènes dans les CSM à l'état basal j0 a été quantifiée enfin de mettre en avant l'évolution de l'expression de ces gènes au cours des différenciations. A l'état basal (j0), ces gènes sont fortement exprimés dans les CSM. Les gènes ont été analysés selon leur niveau d'expression décroissante dans les CSM à l'état basal.

Le gène ITGA5 est le plus exprimé sur les CSM non différenciées mais son expression ne subit que peu d'évolution au cours des différenciations A, O ou V ; seule une très faible augmentation de l'expression de ITGA5 n'est révélée à 3 jours de différenciation O.

Il est observé une forte diminution de l'expression du gène VCAMA, comme cela était déjà prédit par la cytométrie en flux. Cependant cette diminution n'est observée que pour les différenciations O et V, aucune variation significative n'étant obtenue pour la différenciation A, il est a noté une très forte diminution aux temps j7 O et V. Au sujet de l'expression du gène JAG1, celle-ci est retrouvé de façon importante à j0 mais n'évolue pas au cours des différenciations O et V ; seule une baisse de l'expression de JAG1 est observable dans la différenciation A, cette baisse de l'expression reste constante tout au long de la différenciation. Enfin, concernant le gène ITGA4, son expression est la plus faible dans les CSM à j0 et n'évolue pas au cours des 3 différenciations *(Figure 25)*.

Les différences d'expression des gènes au cours des 3 différenciations nous montrent bien la spécificité de chaque milieu inducteur, et l'engagement des cellules dans une voie de différenciation. La diminution dans les 3 voies de différenciation A, O, V de l'expression du gène *VCAM1,* confirme ce qui a été retrouvé avec l'analyse en cytométrie en flux, et pourrait avoir un rôle important dans la perte de la capacité de soutien de l'hématopoïèse des cellules induites en différenciation A et V comme cela avait été déjà trouvé par la cytométrie en flux. Parallèlement le gène *ITGA4* qui code pour VLA-4 (qui constitue la moitié du récepteur au VCAM-1) et le gène *ITGA5* qui code pour VLA-5 n'évoluent pas ou peu au cours de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses. Le gène *BMP4,* quant à lui, a pour rôle la régulation de la prolifération des CSH et d'augmenter la survie de la prise de greffe de CSH humaines. Enfin, le gène *JAG1* (jagged) est sous exprimé au cours de la différenciation A, ce qui pourrait avoir pour conséquence une différenciation marquée des CSH avec un appauvrissement du compartiment des CSH puisque l'activation de la voie Notch/Jagged empêche leur différenciation des CSH et, plus précisément, Jagged stimule leur croissance.

2. EVALUATION DE LA FONCTION HEMATOPOÏETIQUE DES CSM

2.1. CAPACITE DE SOUTIEN DE L'HEMATOPOÏESE

L'hématopoïèse intervient dans une région anatomique particulière appelée « niche hématopoïétique » au sein de laquelle les CSH sont associées à un microenvironnement spécifique qui est à la fois le support physique de l'hématopoïèse mais aussi un élément essentiel de sa régulation locale (Schofield, 1978). Ce microenvironnement local, composé de cellules stromales, exerce sa fonction régulatrice favorable au maintien, à la prolifération ou à la différenciation des CSH par l'intermédiaire de l'expression de molécules d'adhérence (Papayannopoulou *et al.*, 1995), de récepteurs de cytokines (Coulombel *et al.*, 1983; Rafii *et al.*, 1995), de la sécrétion de nombreuses cytokines (Verfaillie, 1992; Mohle *et al.*, 1997a; Li *et al.*, 2000) et par la formation de la MEC (Lerat *et al.*, 1993). Cet environnement nécessaire au développement des cellules hématopoïétiques implique donc des interactions étroites avec les cellules stromales ainsi que la présence de molécules indispensables au bon déroulement de l'hématopoïèse.

Les cellules stromales représentent une population très hétérogène composée de cellules d'origine mésenchymateuse tels que les cellules stromales (à différenciation vasculaire musculaire lisse), les adipocytes et les ostéoblastes. Les macrophages, qui ont une origine hématopoïétique, sont en général exclus de la notion de stroma mais peuvent être tout de même considérés comme faisant partie du microenvironnement hématopoïétique. Les cellules endothéliales, qui peuvent avoir une origine mésenchymateuse ou hématopoïétique, bordent les sinus veineux et forment une barrière lors de la migration des CSH dans le sang circulant mais aussi lors de leur retour à la moelle osseuse (Lichtman, 1981; Tavassoli and Hardy, 1990). Les cellules stromales ont un rôle majeur dans l'hématopoïèse car ils sécrètent de nombreuses cytokines régulatrices de l'hématopoïèse. Ils produisent également certains constituants de la MEC permettant le maintien des CSH dans la logette hématopoïétique. Enfin, ils sont nécessaires au maintien d'une hématopoïèse à long terme *in vitro* (Dexter *et al.*, 1977).

Les cellules stromales de la moelle osseuse (MO) sont donc indispensables à la régulation de la balance autorenouvellement/différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Cette régulation, localisée au sein de la niche hématopoïétique, est assurée (au moins en partie) par une sous-population d'ostéoblastes immatures (Spindle-shaped N-cadherin$^+$

Ostéoblasts). Une autre catégorie de cellules souches médullaires, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont à l'origine des cellules stromales et ont, en outre, la propriété de donner naissance aux tissus adipogénique, osseux, vasculaire musculaire lisse ou chondrocytaire. Le rôle des CSM dans la régulation de l'hématopoïèse n'est pas encore bien connu.

Afin de connaître le rôle des CSM dans le soutien de l'hématopoïèse, nous avons comparé *in vitro* lors de cette étude les capacités de soutien de l'hématopoïèse et plus particulièrement du soutien des $CD34^+$ par des CSM lorsque celles-ci sont engagées dans une voie de différenciation A, O ou V et selon leur stade de différenciation à j0, j3, j7 et j14. Pour cela nous avons tout d'abord réalisé des tests de co-culture à long terme à concentration saturante en cellules hématopoïétiques où nous avons évalué en parallèle le nombre de cellules produites au cours des 5 semaines de culture et le nombre de CFU produites tout au long de la co-culture. Par la suite, des tests de co-culture à long terme en dilution limite ont été réalisés afin de préciser les résultats obtenus précédemment en condition saturante notamment pour quantifier les cellules primitives que les CSM ont pu maintenir. Préalablement, nous avons vérifié que le nombre de CSM n'évoluait pas après différenciation *in situ* dans les puits de culture mais également au bout des 5 semaines co-culture.

2.1.1. Culture à long terme à concentrations saturantes

Afin d'évaluer la capacité de soutien de l'hématopoïèse des CSM engagées ou non dans les voies A, O ou V, une couche stromale de CSM plus ou moins différenciées a été établie sur laquelle des CSH ont été mises en culture à concentration saturante afin de suivre l'évolution du nombre de cellules et du nombre de CFU produits au cours des 5 semaines de co-culture.

En ce qui concerne le nombre de cellules produites plusieurs phénomènes sont remarquables. Tout d'abord, lors de la première semaine de culture, la production cellulaire pour la condition non différenciée j0 produit 17000±811 cellules, production quasi équivalente pour les conditions j3/A, j3/O et j3/V. Parallèlement, une forte quantité de cellules est observée pour les temps de différenciation assez longs (j7 et j14), respectivement de 34124±11910 et 43751±16766 cellules en moyenne et cela dans les 3 voies de différenciation. Cela ne reflète peut-être pas la production directe de cellules mais représente plutôt un défaut d'implantation des cellules $CD34^+$ dans la couche stromale constituée de CSM différenciées et qui restent alors en suspension dans le surnageant (cellules non-adhérentes) *(Figure 26)*.

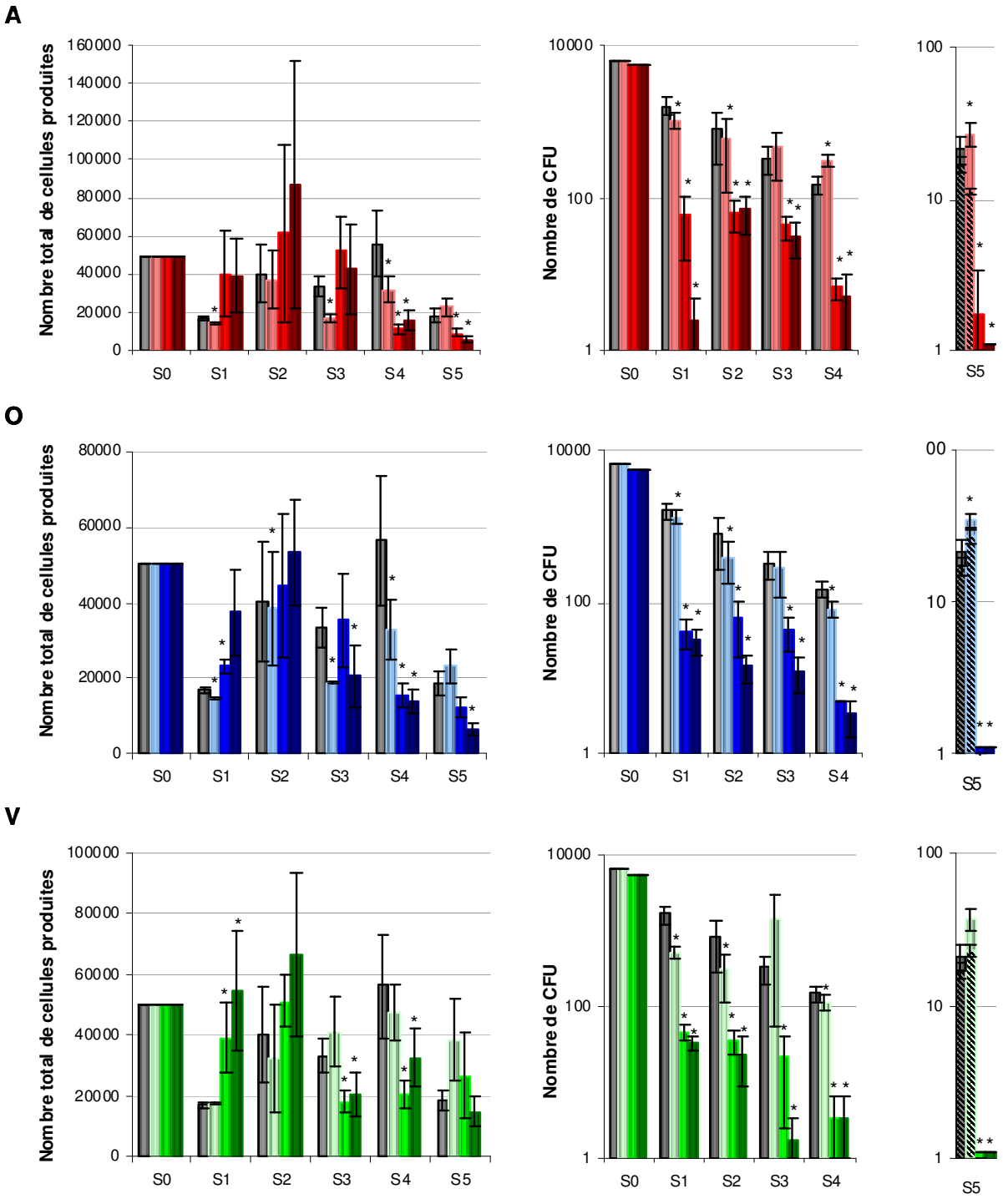


Figure 26 : Co-culture à long terme à concentrations saturantes.

Les CSM sont induites en différenciation A, O ou V. Les résultats proviennent de 3 expériences indépendantes (n=3). * Résultats similaires dans les 3 expériences.

j0 (), j3/A (), j7/A (), j14/A (), j21/A (), j3/O (), j7/O (), j14/O (), j21/O (), j3/V (), j7/V (), j14/V (), j21/V (),

A la troisième et quatrième semaine, la plus grande production de cellules est retrouvée sur les CSM non différenciées (avec une moyenne de 44830 cellules produites, production de 40 % supérieure à celle sur les CSM différenciées). À 5 semaines de co-culture la quantité de cellules produites dans le surnageant est similaire sur les CSM non différenciées et les CSM à un temps précoce de différenciation (j3), alors qu'elle plus basse sur les CSM à des temps plus tardifs de différenciation des CSM (j7 et j14) *(Figure 26)*.

En ce qui concerne le nombre de CFU produites au cours des 5 semaines de culture, au cours de cette étude, nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les proportions des différents progéniteurs clonogéniques (BFU-E, CFU-M ou CFU-GM). Nous prendre en compte donc par la suite la totalité des CFU, comprenant l'ensemble des BFU-E, CFU-G et CFU-GM dénombrées

Le nombre de CFU produites a été suivi au cours des 5 semaines de culture. La production de CFU a été la plus importante avec les CSM non différenciées (S1 : 1638±425 cellules, S2 : 807±530 cellules) et a diminué en fonction du temps de différenciation des CSM. Après 3 jours de différenciation des CSM, la production a été diminuée de 42 % à S1 et de 47 % à S2, puis on a constaté une chute brutale de 95 et 88 % du nombre de CFU à S1 et S2 sur les CSM différenciées à j7, a diminué encore de 55 et 33 % sur les CSM différenciées à j14 *(Figure 26)*. A la semaine 3 le même schéma était observable pour les différenciations A et O alors que la plus grande production de CFU (1453±1398 cellules) a été observée sur les CSM à 3j de différenciation V. Enfin, à la 4ème semaine le phénomène s'est accentué avec une diminution drastique du nombre de CFU sur les CSM à partir de 7 jours de différenciation et cela pour les 3 voies (diminution moyenne de 97 %). La production de CFU étatt cependant sensiblement identique sur les CSM différenciées pendant seulement 3 j (171±35 cellules) par rapport aux CSM non différenciées (150±38 cellules) *(Figure 26)*. À la 5ème semaine, la production de CFU des cellules en suspension dans le surnageant (cellules non-adhérentes) a été étudiée parallèlement aux cellules adhérentes à la couche stromales. Le nombre de CFU totales (cellules non adhérentes + cellules adhérentes) produites sur les CSM non différenciées et différenciées pendant 3 jours était similaire. Ceci contrastait avec la production quasiment nulle retrouvée sur les CSM après 1 et 2 semaines de différenciation *(Figure 26)*.

Lors de cette étude nous avons mis en évidence que les CSM différenciées après 7 ou 14 jours dans les voies A, O et V ne permettent pas de soutenir l'hématopoïèse. Cependant les

CSM non différenciées et les CSM différenciées précocement pendant 3 jours dans ces mêmes voies semblent avoir la même capacité de soutien de l'hématopoïèse. Afin de confirmer ces résultats et de quantifier les cellules primitives soutenues par les CSM plus ou moins différenciées, une étude de co-culture à long terme en dilution limite a été mise en place en utilisant comme cellules stromales contrôles des cellules MS-5. Ces cellules sont connues pour permettre la prolifération et le soutien de l'hématopoïèse des cellules souches hématopoïétiques adhérentes très primitives ($CD34^+$, $CD38^-$) dans les cultures à long terme (Issaad *et al.*, 1993).

2.1.2. Culture à long terme en dilution limite : test de CAFC

Des tests de CAFC ont été réalisés avec des CSM issues des trois moelles différentes de patients et induites de façon identique en différenciation A, O et V. Les CAFC ont été dénombrées au cours des 5 semaines de co-culture.

Les progéniteurs CAFC ont été initialement décrits par Ploemacher (Ploemacher *et al.*, 1989; Ploemacher *et al.*, 1991). Ils ont été mis en évidence en cocultivant des cellules hématopoïétiques purifiées en présence de cellules stromales. Les progéniteurs de type CAFC adhèrent à cette couche adhérente et se développent localement en formant un îlot adhérent aux cellules stromales reconnaissable au microscope et désigné sous le nom de *cobblestone area* *(Figure 27)*. Si les cultures sont faites avec un nombre de cellules suffisamment faible pour éviter la fusion des îlots, la technique permet une quantification précise des îlots et donc de leurs progéniteurs. En évaluant chaque semaine le pourcentage de puits positifs en dilution limite, au bout de ces 5 semaines nous estimons la fréquence des cellules souches hématopoïétiques primitives mises en culture initialement. Les CAFC détectées aux semaines 1 et 2 sont plus matures que les CAFC détectées aux semaines 3 et 4.

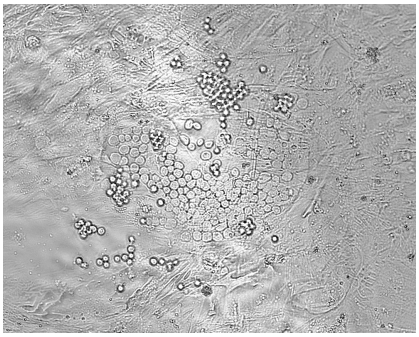


Figure 27 : Aire de cobblestone en microscopie inversé (X20).

L'échelle représente 150 nm

Lors de cette étude nous avons tout d'abord évalué la capacité de soutien de l'hématopoïèse de cellules médullaires, les MS-5, permettant de quantifier la fréquence de CAFC qu'il est possible d'obtenir avec les $CD34^+$ utilisées avec un stroma ayant la capacité à soutenir l'hématopoïèse. Cette fréquence nous servira donc de témoin concernant l'état de survie des cellules hématopoïétiques au cours de la co-culture mais aussi de repère pour déterminer si la couche testée à ou non une capacité à soutenir l'hématopoïèse.
Au cours des différentes expérimentations, nous avons retrouvé de façon systématique pour les cellules MS-5 la même fréquence de 1 CAFC pour 15 cellules $CD34^+$ ensemencées que nous considérerons comme notre référence.

Par la suite, les résultats des courbes de fréquence présentés seront ceux de la moelle MO51 représentative des résultats obtenus avec les deux autres moelles. Lors de l'étude des CSM de la moelle MO51, la fréquence des CAFC observée après 5 semaines de co-culture avec des CSM non différenciées est de 1 CAFC pour 17 cellules $CD34^+$ ensemencées. Cette fréquence proche de la fréquence retrouvée avec les cellules MS-5 indique que les CSM ont une bonne capacité de soutien de l'hématopoïèse. Les fréquences retrouvées avec les CSM engagées dans une voie de différenciation sont beaucoup plus faibles que la fréquence retrouvée avec les CSM non différenciés. Dès 3 jours d'engagement dans une voie de différenciation, la fréquence chute brutalement. Ainsi la fréquence obtenue est de 1/53 pour la voie adipogénique, pour la voie ostéogénique celle-ci est de 1/51 et pour la voie vasculaire musculaire lisse de 1/77. Cette fréquence ré-augmente légèrement à j7 pour diminuer drastiquement à j14 au point de ne pas permettre l'évaluation de la fréquence des CAFC à j21. Les CSM différenciées à j14, ont donc une très faible capacité de soutien de l'hématopoïèse et à j21 cette capacité est totalement perdue *(Figures 27 et 28)*.

Sur l'ensemble des 3 moelles étudiées, le nombre des CAFC obtenues après 5 semaines de culture a été calculé et exprimé pour 10 000 cellules CD34+ ensemencées. Les CSM non différenciées permettent d'observer 600 CAFC pour 10 000 cellules CD34+, alors que cette fréquence a diminué de 64 % après 3 jours de différenciation A, de 60 % après 3 jours de différenciation O et de 62 % après 3 jours de différenciation V *(Figure 29)*. Après 14 jours de différenciation A, O ou V des CSM, la fréquence des CAFC pour 10 000 cellules $CD34^+$ a considérablement diminué de façon uniforme de 96 % dans les 3 voies de différenciation.

Lors de cette étude nous avons ainsi montré que les CSM non différenciées permettent le meilleur soutien de l'hématopoïèse en comparaison des CSM induites en différenciation. Lorsque les CSM s'engagent dans les voies de différenciation O, A et V elles perdent très rapidement leur capacité de soutien et cela dès 3 jours d'engagement dans une voie de différenciation.

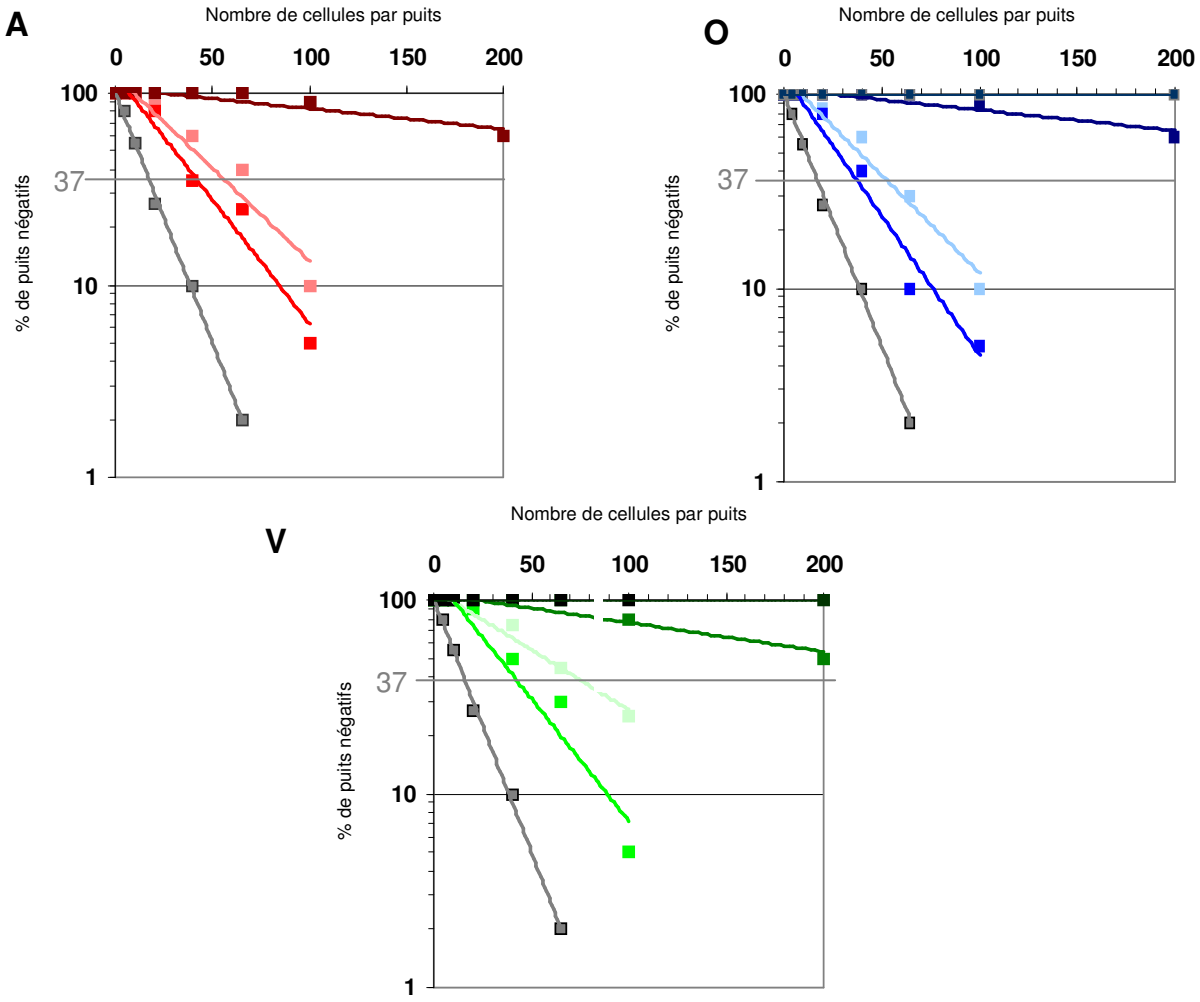


Figure 28 : Co-culture à long terme en dilution limite.

Les résultats proviennent de 3 expériences indépendantes (n=3).

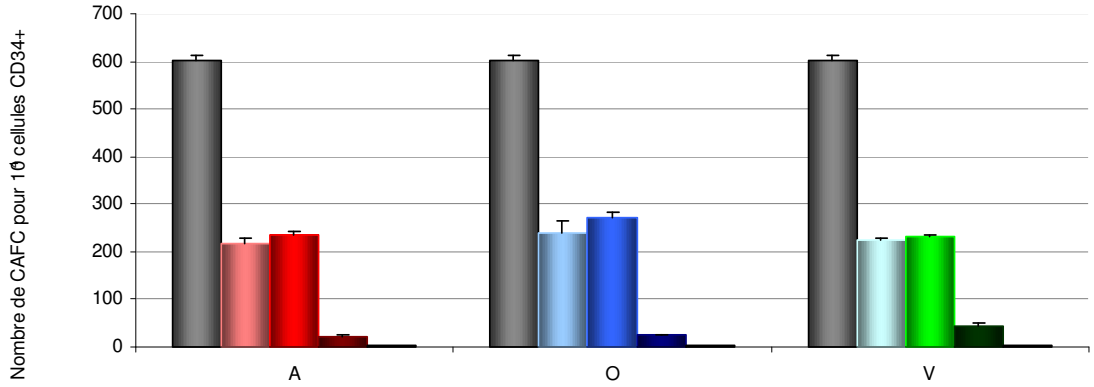


Figure 29 : Fréquence du nombre de CAFC obtenue par co-culture à long terme.

Les résultats proviennent de 3 expériences indépendantes (n=3). * Résultats similaires dans les 3 expériences. ND : non détectable.

j0 ( ), j3/A ( ), j7/A ( ), j14/A ( ), j21/A ( ), j3/O ( ), j7/O ( ), j14/O ( ), j21/O ( ), j3/V ( ), j7/V ( ), j14/V ( ), j21/V ( ),

2.2. CAPACITE DE MIGRATION DES PH

Dans la MO, les cellules hématopoïétiques sont en contact étroit avec un microenvironnement comprenant des cellules stromales sécrétant une MEC. Dans cette association, la cellule stromale est à la fois un support physique mais aussi un élément de régulation de l'hématopoïèse en permettant le maintien de l'équilibre entre autorenouvellement et engagement des CSH vers les voies de différenciation (comme étudiée précédemment) et leur migration. Ainsi le microenvironnement et les CSH présentent des contacts par l'intermédiaire de molécules d'adhérence ou des molécules de la MEC (comme la fibronectine) et des facteurs solubles produits par les cellules stromales (comme le SDF-1) dont les récepteurs sont exprimés par les cellules hématopoïétiques. Les CSH sont capables de migrer hors du microenvironnement comme au cours du développement (Peault and Tavian, 2003). Cette mise en circulation est également observée pendant la vie adulte, soit de façon physiologique (Wright *et al.*, 2001; Abkowitz *et al.*, 2003), soit après mobilisation par des facteurs de croissance comme le G-CSF (Molineux *et al.*, 1990). Les CSH présentes dans la circulation périphérique sont capables de regagner les zones hématopoïétiques (phénomène de domiciliation) et d'interagir avec le stroma médullaire pour ensuite le coloniser et initier l'hématopoïèse (Tavassoli and Hardy, 1990). Lors de ce phénomène de migration (mobilisation et domiciliation) le rôle de la chimiokine SDF-1 est essentiel, cette chimiokine étant pratiquement la seule à exercer une activité chimiotactique sur les CSH par l'intermédiaire de son récepteur CXCR4 (Chemiokine (C-X-C) Receptor4) (Mohle *et al.*, 1998).

Nous nous sommes tout particulièrement intéressés, dans ce modèle de migration trans-stromale, à la nature exacte des cellules stromales constituant le microenvironnement. Dans ce but, nous avons étudié la migration *in vitro* de cellules $CD34^+$ au travers d'inserts recouverts de CSM engagées dans différentes voies de différenciation et ceci à différents temps de différenciation.

2.2.1. Mise au point de la technique de migration *in vitro*

2.2.1.1. Mise au point de l'utilisation des cellules stromales dans le test de migration

2.2.1.1.1. Détermination de la densité optimale d'ensemencement

Précédemment au laboratoire, la confluence des CSM sur insert avait été fixée à environ 80%, mais dans la perspective d'induire ces cellules en différenciation, une confluence supérieure était nécessaire.

Auparavant, les cellules avaient été ensemencées à une concentration de 1.10^4 cellules par insert et utilisées 2 jours après pour le test de migration (condition 1), pour obtenir une confluence plus importante les cellules ont été ensemencées à une concentration de 2.10^4 cellules par insert et utilisées 2 jours après pour le test de migration (condition 2) *(Figure 30)*.

Pour obtenir la condition optimale de confluence, la condition 1 nécessite sept jours de culture alors que pour la condition 2, seulement 2 jours de culture ont permis d'avoir un stroma bien adéquat à la migration. Pour la suite du travail, la seconde condition a été appliquée pour chaque essai, afin de diminuer le temps d'expérimentation.

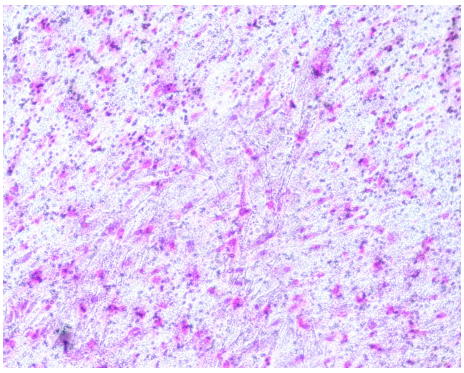
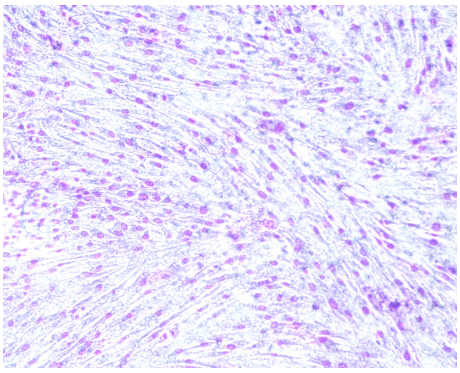
A  B 

Figure 30 : Etablisement de la couche stromale optimale

(**A**) CSM en condition 1 après coloration au MGG, (**B**) CSM en condition 2 après coloration au MGG. Observation au microscope (X200)

2.2.1.1.2. Capacité de différenciation des cellules stromales

Pour les différenciations A et O, les colorations respectives ont été réalisées, et pour la différenciation V a été évaluée par immunofluorescence. Une augmentation de l'intensité des colorations et de la fluorescence a été globalement observée au fur et à mesure de la cinétique de différenciation.

La coloration avec le Rouge d'Alizarine a montré une complexation avec les sels de calcium de plus en plus nette au fil de la différenciation ostéogénique, indiquant l'apparition d'ostéoblastes mais également l'augmentation de leur nombre au cours de la cinétique de différenciation *(Figure 31A)*.

La coloration des vésicules lipidiques des adipocytes au Rouge de Nile a permis également de mettre en évidence l'apparition de vésicules lipidiques et l'augmentation progressive du nombre d'adipocytes au cours de la différenciation A *(Figure 31B)*.

Le marquage par immunofluorescence de SM22α a permis d'objectiver la différenciation V par une augmentation de la fluorescence *(Figure 31C)*.

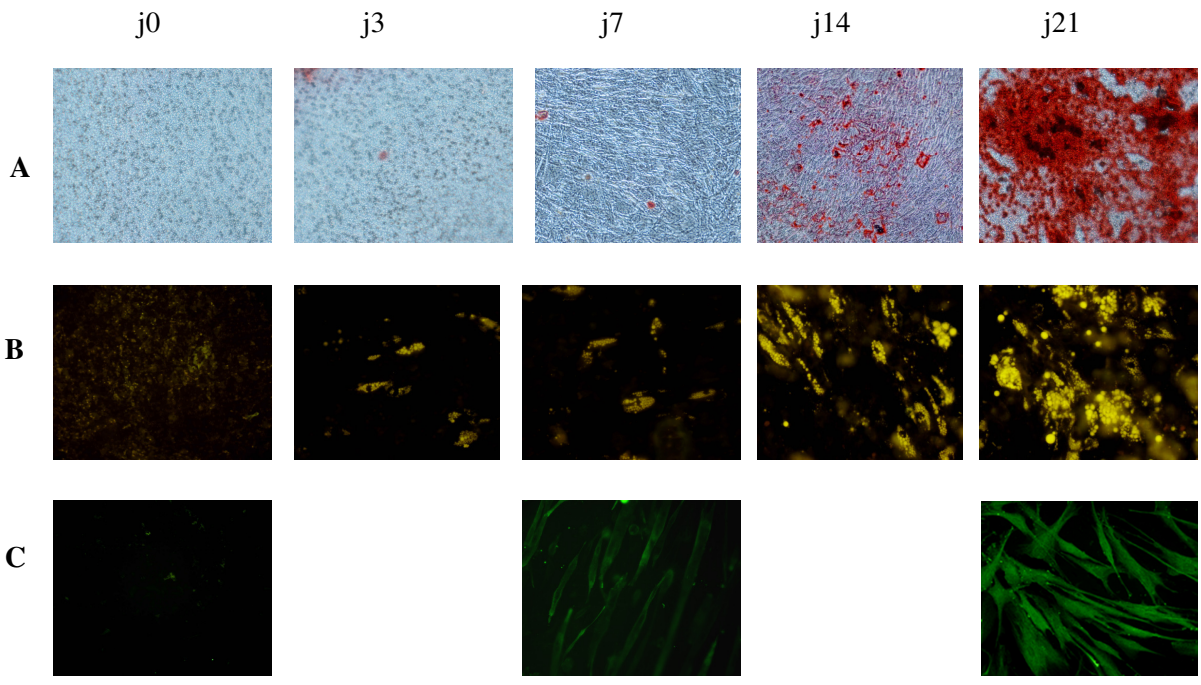


Figure 31 : Contrôle de différenciation sur inserts

(A) Coloration au Rouge d'Alizarine (x10), (B) au Rouge de Nile (x2O) et (C) immuno-histochimie (x20) à différents temps de la cinétique de différenciation (j0, j3, j7, j14, j21).

2.2.1.1.3. Vérification de la stabilité du nombre de cellules ensemencées

Afin de vérifier que la quantité de cellules stromales n'a pas été modifiée au cours des différenciations, un comptage des cellules avant et après chaque différenciation a été réalisé. Une homogénéité du nombre de cellules est observée à la fin de chaque différenciation que les cellules soient engagées dans la différenciation A, O ou V avec une moyenne de $7{,}5.10^4 \pm 125$ cellules par insert.

2.2.1.1.4. Détermination de la cinétique optimale de migration

Afin de pouvoir avoir une approche de la migration trans-stromale sur CSM différenciées dans les voies A, O et V, des migrations préliminaires ont été réalisées à l'aide de cellules MO7e. Ces migrations ont été réalisées au cours d'une cinétique de différenciation à temps précis : j0 (CSM non différenciées), j3 (trois jours après avoir induit les cellules en différenciation), j7 (sept jours après l'induction), j14 (14 jours après induction) et enfin j21 (21 jours après cette induction). Ces migrations ont été réalisées en présence de SDF-1 (100 ng/mL) *(Figure 32)*.

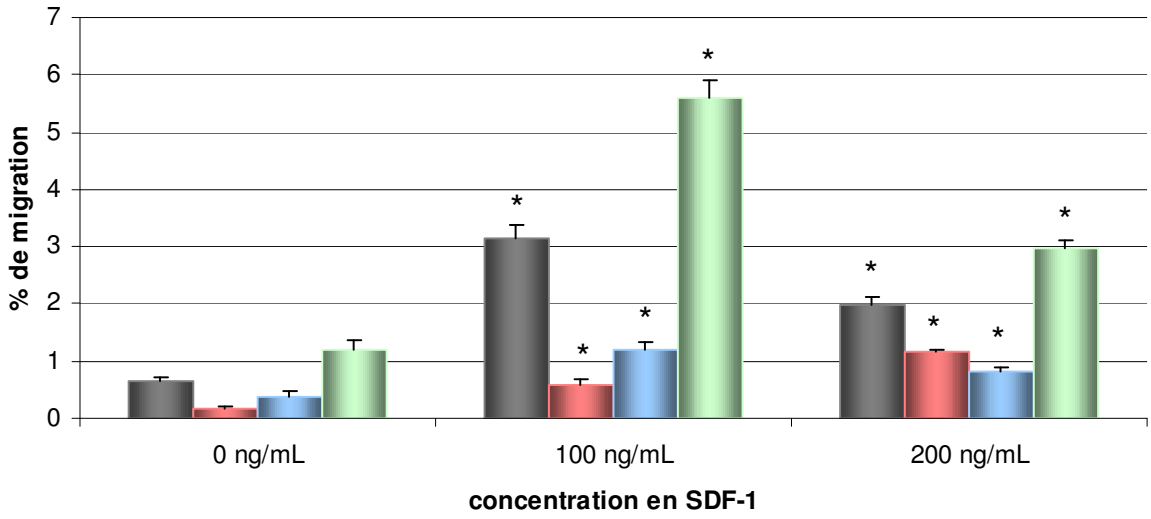


Figure 32 : Pourcentage de migration trans-stromale des MO7e au travers de CSM non différenciées en fonction de la concentration en SDF-1.

Les résultats proviennent de 3 expériences indépendantes (n=3). * Résultats similaires dans les 3 expériences. j0 (■), j3/A (■), j3/O (■), j3/V (■)

Aucune modification de migration des MO7e n'est observée lorsque les CSM sont engagées pendant 3 jours dans la voie de différenciation V, avec 5,37±0,86 % de migration contre 3,83 ±0,6 % de migration lorsque les cellules ne sont pas différenciées. Cette migration n'est pas retrouvée après 7 jours de différenciation V, avec seulement 0,67±0,2 % de migration. Parallèlement, lorsque les CSM sont engagées dans les voies de différenciation A et O il y a une chute de la migration dès j3 par rapport à j0. À 7 jours d'engagement dans les 3 voies de différenciations, une disparition quasi-totale de la migration des Mo7e est observée.

À la suite de ces expériences préliminaires, les migrations de cellules $CD34^+$ ont été réalisées sur des CSM engagées dans les 3 voies jusqu'à 14 jours de différenciations, puisqu'il semble que les cellules ne migrent plus au-delà de ce stade de différenciation.

2.2.1.2. Détermination de la concentration optimale de SDF-1

La chimiokine SDF-1 est le facteur chimiotactique majeur des leucocytes matures et des CSH qui expriment son récepteur CXCR-4 (Nagasawa *et al.*, 1996b; Aiuti *et al.*, 1997; Peled *et al.*, 1999; Peled *et al.*, 2000). Il est le seul facteur soluble capable d'induire la migration *in vitro* des CSH (Wright *et al.*, 2002). SDF-1 est exprimé constitutivement par de nombreux tissus (Shirozu *et al.*, 1995), telle que la moelle osseuse (Ponomaryov *et al.*, 2000), sous deux isoformes issus d'un épissage alternatif du gène *SDF1*, la forme α, prédominante, et la forme β qui contient quatre acides aminés supplémentaires au niveau de l'extrémité carboxy-terminale de la protéine.

Sur la base de travaux antérieurs réalisés au laboratoire, la concentration de SDF-1 dans la chambre inférieure, avait été fixée à 100 ng/mL. Afin de vérifier si cette concentration était optimale dans notre étude une première migration a été réalisée avec 3 concentrations différentes de SDF-1. Les concentrations de 0, 100 et 200 ng/ml de SDF-1 ont été testées *(Figure 33)*. Ces résultats ont permis de confirmer la concentration de SDF-1 optimale de 100 ng /mL. En effet en comparaison avec la condition sans SDF-1, la migration est supérieure. De plus, à une concentration de 200 ng/mL, la migration observée est inférieure à celle obtenue avec 100 ng/mL.

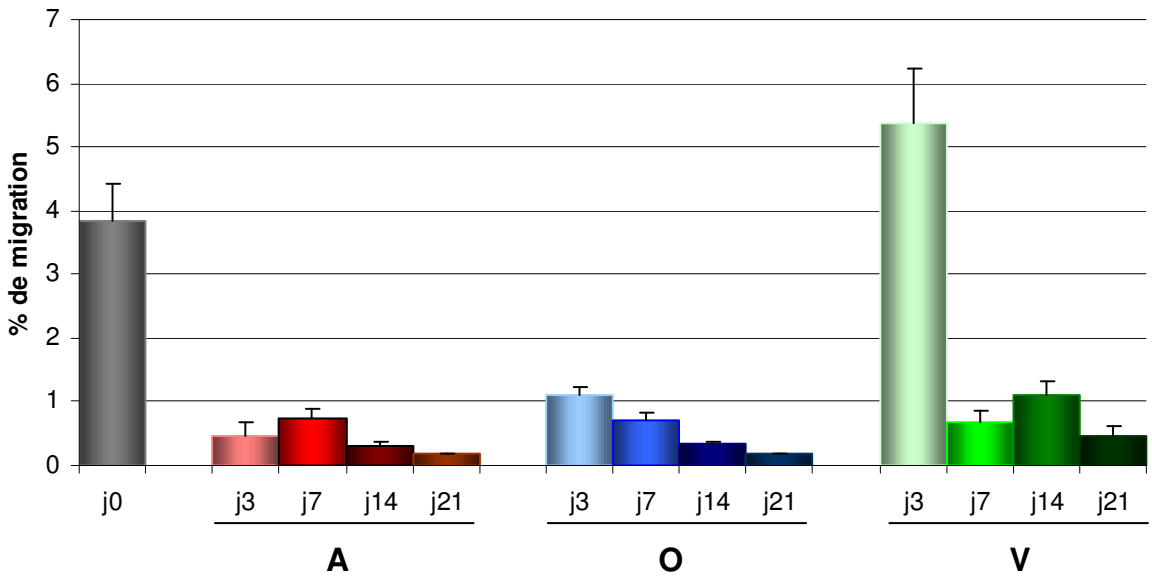


Figure 33 : Migration trans-stromale de MO7e au travers de CSM plus moins différenciées dans le voie A, O ou V.

Les résultats proviennent de 3 expériences indépendantes (n=3).

2.2.2. Migration trans-stromale des cellules CD34$^+$

2.2.2.1. Migration des cellules totales

Les migrations des cellules CD34$^+$ ont été réalisées dans les conditions optimales définies avec les MO7e. Les migrations ont été effectuées sur une cinétique de j0 à j14 dans les voies A, O et V. À ces différents stade les migrations ont été réalisées sous 2 conditions : (i) cellules sans SDF-1 dans la chambre inférieure ; (ii) cellules en présence de SDF-1 dans la chambre inférieure lors de la migration.

Ce test de migration a été effectué en double avec les CSM de trois donneurs différents, car les réponses des cellules peuvent énormément varier selon le donneur, cependant nous avons utilisé le même donneur de cellules CD34$^+$ dans les différentes expériences.

Lors de l'analyse de ces différentes migrations une condition semble se détacher des autres, la migration des cellules CD34+ au travers des CSM à trois jours de différenciation V est très élevée (10,61±0,31 %) comparé aux autres conditions. La migration au travers des CSM non différenciées est de (1,12±0,48 %) pour la condition sans SDF-1, ce pourcentage de migration est augmenté dans les conditions j3/A, j3/O et fortement dans la condition j3/V

comme précisé précédemment. Cependant, les pourcentages de migration se sont effondrés que ce soit dans la voie A (1,12±0,4 %), O (1,09±0,26 %) ou V (3,32±1,54 %) après sept jours de différenciation et a continué à chuter après 14 jours de différenciation *(Figure 34)*.

Des résultats similaires ont été retrouvés avec la condition en présence de SDF-1, cependant les migrations sont en moyenne de 47,28±7,5 % plus élevées par rapport à la condition sans SDF-1.

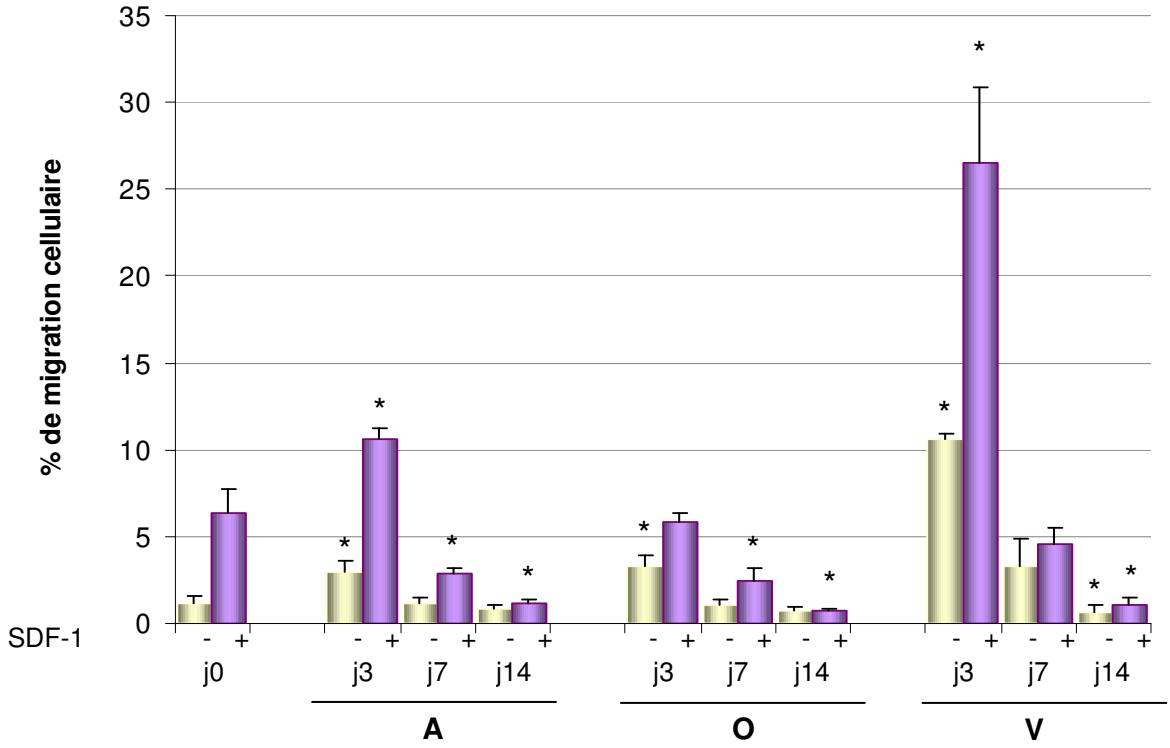


Figure 34 : Migration trans-stromale des CD34+ au travers de CSM induites en différenciation.

Les résultats proviennent de 3 expériences indépendantes (n=3). * Résultats similaires dans les 3 expériences.

Parallèlement, ces tests de migration ont été réalisés avec des lignées cellulaires : Cal72, ThHBMEC et MRC-5 afin de déterminer la capacité de migration des cellules $CD34^+$ au travers de ces lignées plus spécifiquement d'origine ostéoblastique, endothéliale et à différenciation vasculaire musculaire lisse. Les cellules $CD34^+$ avaient une plus grande capacité de migration au travers de cellules endothéliales (37,73±0,2 % sans SDF-1) ou vasculaires musculaires lisses (34,09±0,23 % sans SDF-1) qu'au travers de cellules ostéogéniques (9,55±0,2 % sans SDF-1) *(Figure 35)*. Ces expériences sont en accord avec les

résultats retrouvés avec des CSM engagées dans une voie vasculaire musculaire lisse. Elles sont cohérentes avec le fait que les cellules endothéliales et vasculaires musculaires lisses sont retrouvées dans différents sites de l'hématopoïèse, et composent les vaisseaux de la MO.

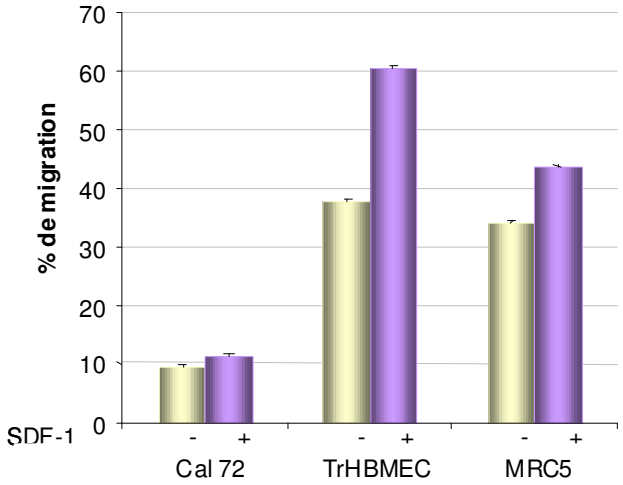


Figure 35 : Migration trans-stromale de cellules CD34+ au travers de 3 lignées cellulaires Cal72 (cellules ostéoblastiques), TrHBMEC (cellules endothéliales) et MRC5 (cellules à différenciation vasculaire musculaire lisse).

Les résultats proviennent de 3 expériences indépendantes (n=3).

2.2.2.2. Migration des progéniteurs clonogéniques

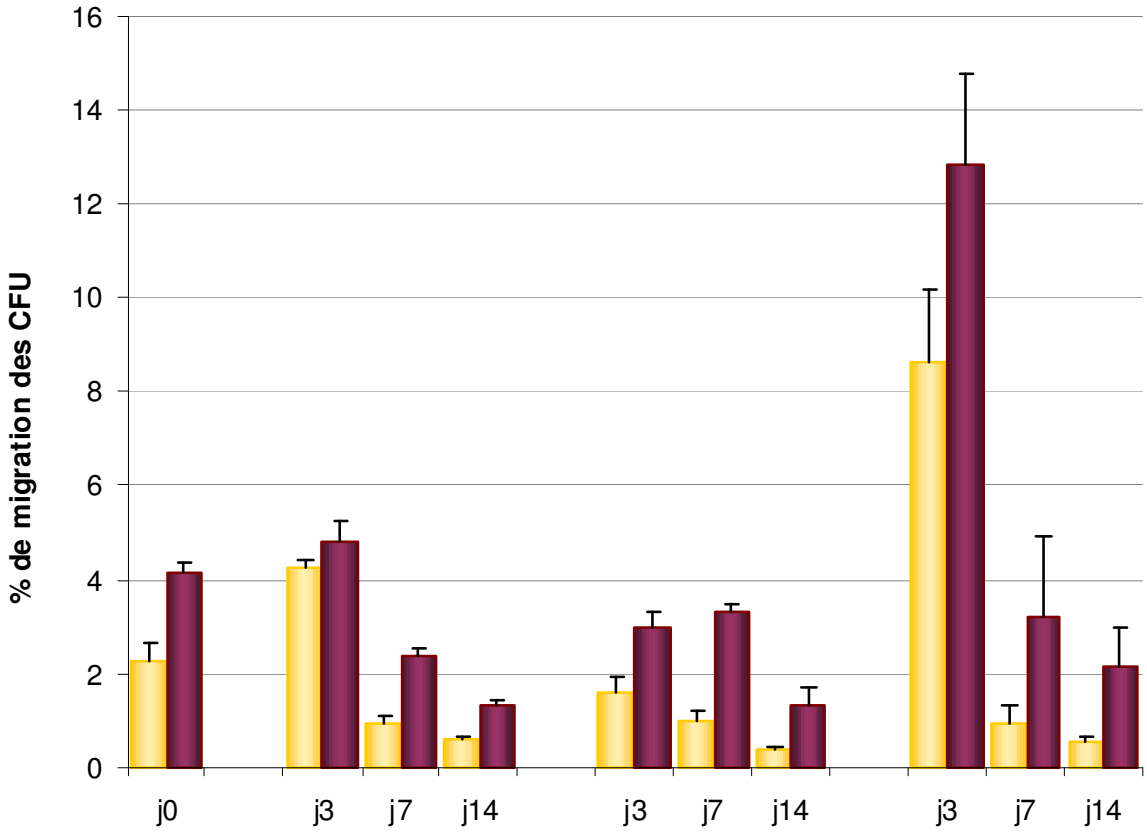
Afin d'étudier la migration des progéniteurs clonogéniques, les cellules ayant migré dans les conditions définies précédemment ont été mises en culture dans un milieu leur permettant de se différencier en progéniteurs. Par ces expériences, nous souhaitions savoir si certaines couches stromales (CSM engagées ou non en voie de différenciation) permettraient une migration plus spécifique de certains progéniteurs.

Au cours de cette étude, nous n'avons pas retrouvé de différence significative dans la proportion des différents progéniteurs ayant migré (BFU-E, CFU-M ou CFU-GM). Nous parlerons donc par la suite de CFU de façon globale, comprenant toutes les BFU-E, CFU-M et CFU-GM dénombrées.

Le pourcentage de CFU pouvant migrer au travers de CSM non différenciées a été de 2,23±0,36 % en absence de chimio-attractant (SDF-1). Cette migration est multipliée par 2 lorsque les CSM sont induites pendant 3 jours en différenciation adipogénique. Ce phénomène n'est pas retrouvé avec la différenciation ostéogénique pour laquelle après 3 jours

d'induction le pourcentage de migration est diminué de 30 % *(Figure 36)*. Parallèlement, la condition j3/V obtient le meilleur pourcentage de migration avec 8,63±1,53 %, cette forte migration n'est pas maintenue au cours de la différenciation V, puisque à 7 jours la migration s'effondre à 0,9±0,4 %, pour finir à 0,53±0,15 % à 14 jours. En ce qui concerne les 2 autres voies de différenciation celles-ci se comportent comme la voie V pour les jours tardifs de différenciation j7 et j14, avec une forte chute de la migration *(Figure 36)*.

En présence de SDF-1 dans la chambre inférieure, nous retrouvons des résultats similaires mais avec une augmentation des migrations de 54,18±6,41 % en moyenne, seule la condition j3/A ne se comporte pas de la même manière. Cette condition permet déjà une forte migration des CFU en absence de chimio-attractant en comparaison de la condition j0, qui n'est pas franchement augmentée par le SDF-1 (11,72 %) *(Figure 36)*.



<u>Figure 36 :</u> Migration trans-stromale des CFU au travers des CSM plus ou moins différenciées.

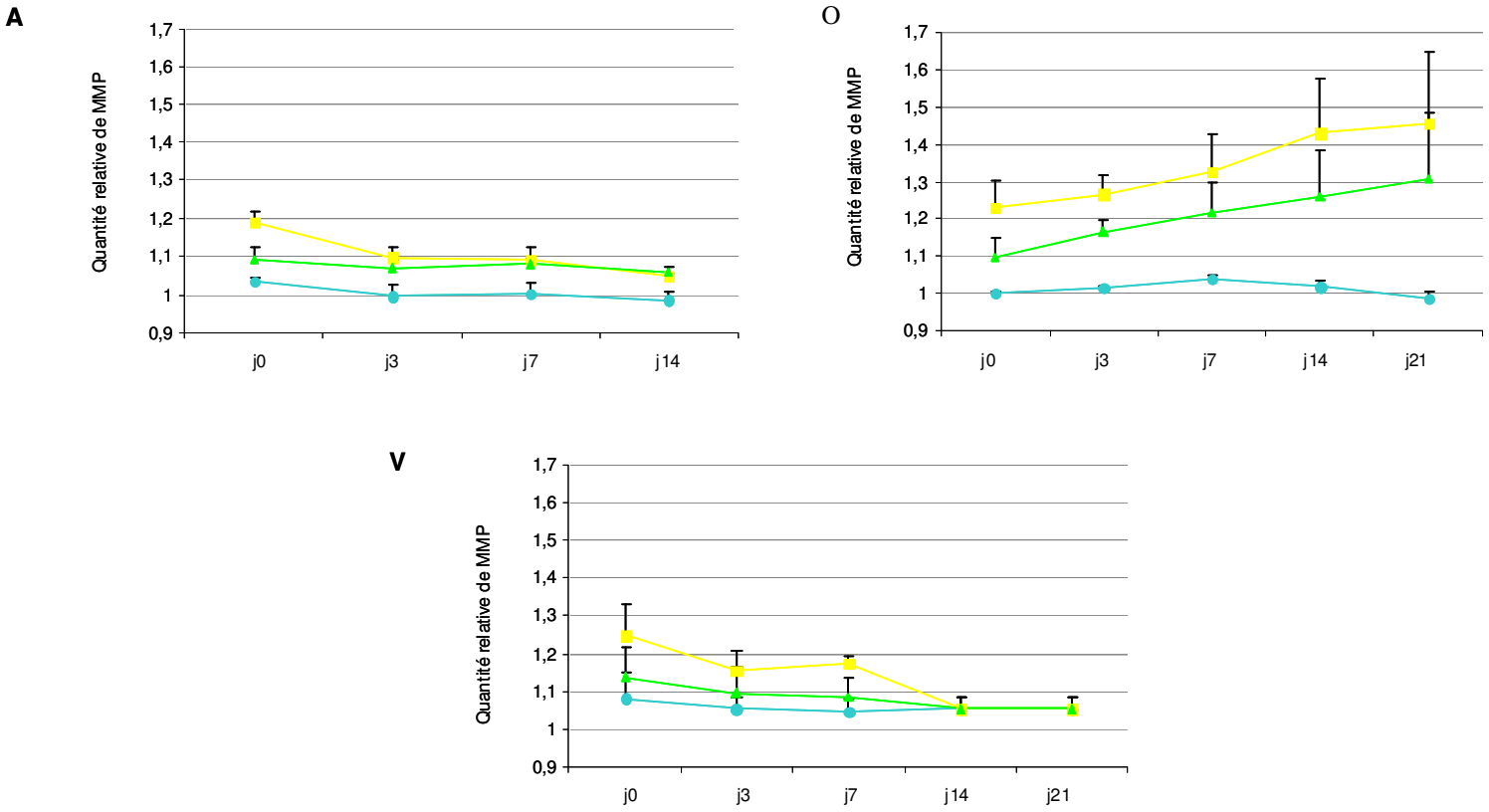
Les résultats proviennent de 3 expériences indépendantes (n=3). * Résultats similaires dans les 3 expériences.

2.2.3. Etude zymographique de MMP2 et MMP9

Des études préliminaires ont été réalisées afin de quantifier la présence de pro-MMP2, MMP2 et de la pro-MMP9 dans le surnageant des CSM différenciées en zymographie.

Lors de l'analyse des surnageants, une des premières observations est la faible quantité de pro-MMP-9 dans toutes les différenciations et sa stabilité au cours des différenciations. En ce qui concerne la MMP-2, la forme pro-MMP2 diminue très légèrement au cours des différenciations A et V et cela dès 3 jours de différenciation. Ce qui est remarquable est l'observation d'une augmentation de la MMP-2 active et de la pro-MMP2 au cours de la différenciation ostéogénique. *(Figure 37)*.

Ces résultats sont une première approche, permettant de déterminer la quantité de MMP-2 active dans le surnageant de culture. Afin de confirmer le rôle de la MMP2 au cours de la migration des expériences d'inhibition de la MMP2 ont été réalisées.



<u>Figure 37</u> : Quantification relative des métalloprotéases par intégrations des signaux obtenus par zymographie.

Les résultats proviennent de 3 expériences indépendantes (n=3). Pro-MMP-2 , MMP-2 , pro-MMP-9

2.2.4. Inhibition de la MMP-2

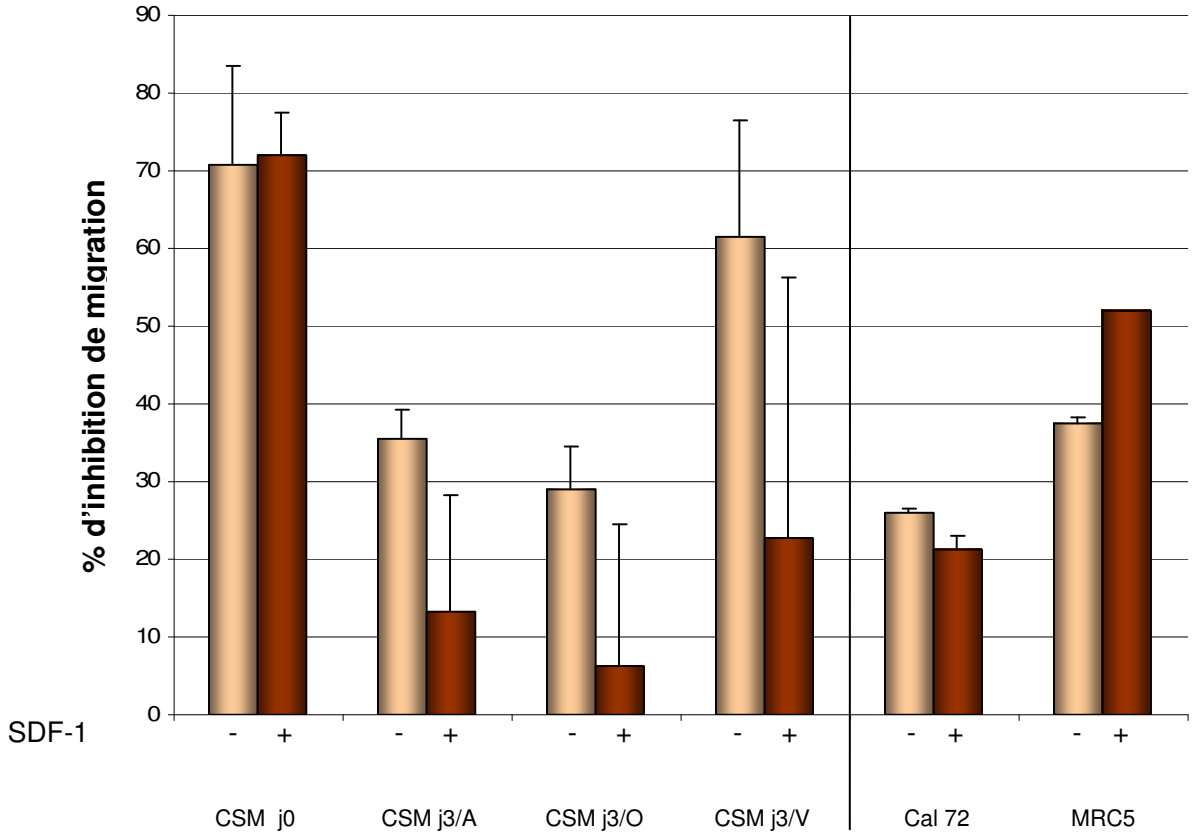
Afin de déterminer le rôle exact de la MMP-2 au cours de la migration trans-stromale, des tests de migration en présence d'anticorps bloquants spécifiques anti-MMP-2 ont été réalisées. Les CSM plus ou moins différenciées ont donc été mises en contact avec un anticorps anti-MMP-2 ou une Ig contrôle préalablement à la migration. La migration des $CD34^+$ a été réalisée de façon identique aux expériences précédentes mais les résultats s'en retrouvent modifiés.

Dans un premier temps, nous avons vérifié que l'ajout d'un anticorps aux CSM ne modifiait pas les conditions de migration des $CD34^+$. Cela a été vérifié par l'ajout d'un anticorps de même isotype que l'anticorps anti-MMP-2, une IgG1 contrôle.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié s'il y avait une diminution de la migration des $CD34^+$ au travers des CSM en présence d'un anticorps bloquant anti-MMP-2 en comparaison à des $CD34^+$ migrant au travers de CSM non inhibées (présence de l'IgG1 contôle). Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport à la migration en condition contrôle (IgG1 contrôle).

Une forte inhibition de la migration des $CD34^+$ au travers des CSM indifférenciées inhibées par un anticorps bloquant anti-MMP-2 a été observée d'une valeur de 70,86±12,75 % et cela également en présence de SDF-1 avec un pourcentage d'inhibition de 72,11±5,46 % *(Figure 38)*. Un résultat similaire a été observé pour la condition j3/A et j3/O mais avec des pourcentages d'inhibition plus faibles, j3/A obtient une inhibition de 13,29±14,92 % et 35,59±3,66 % en présence ou non de SDF-1 et j3/O permet une inhibition encore plus faible respectivement de 6,18±18,23 % et 29,08±5,49 % pour les conditions avec ou sans SDF-1. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la condition j3/V pour laquelle nous obtenions le plus grand pourcentage de migration. Lors de l'inhibition de la MMP-2 le pourcentage de migration obtenu sans SDF-1 était diminué de 61,46±15,09 % et de 22,64±33,73 % en présence de SDF-1 *(Figure 38)*.

En ce qui concerne les lignées cellulaires étudiées, la lignée ostéogénique Cal 72 s'est comportée à peu près comme la condition j3/O avec une inhibition assez faible de 21,14±1,82 % et 26,00±0,50 % en présence ou non de SDF-1. La lignée à différenciation vasculaire musculaire lisse MRC-5 quant à elle a été très fortement inhibée en présence ou en absence de SDF-1, respectivement de 52,03±0,01 % et 37,58±0,61 % *(Figure 38)*.



<u>Figure 38 :</u> Inhibition de la migration trans-stromale de cellules CD34+ au travers de CSM induites dans différentes voies de différenciation par inhibition de la MMP2 à l'aide d'anticorps bloquant anti-MMP2.

Les résultats proviennent de 3 expériences indépendantes (n=3). * Résultats similaires dans les 3 expériences.

Ces résultats ne semblaient pas concordants avec les résultats préliminaires que nous avons obtenus en zymographie, puisqu'une augmentation de la MMP-2 a été observée avec la différenciation O en zymographie alors que la présence d'un anticorps bloquant anti-MMP-2 n'a pas montré une forte diminution de la migration, sachant que la MMP-2 a un rôle très important dans la migration des cellules hématopoïétiques. De la même manière, la quantité de MMP-2 observée en zymographie n'a pas semblé beaucoup évoluer entre le temps j0 et j3 dans les 3 différenciations, alors que les résultats de l'inhibition de la MMP-2 membranaire via un anticorps montraient des inhibitions de migration trans-stromale très différentes. Ces résultats suggèrent que la MMP-2 impliquée dans la régulation de la migration des

progéniteurs hématopoïétiques serait en majorité la forme membranaire qui n'a pas été évaluée ici en zymographie.

2.3. EVALUATION DES MOLECULES IMPLIQUEES DANS LE SOUTIEN DE L'HEMATOPOÏESE

Les CSM ayant une capacité de soutien de l'hématopoïèse maximale sont à l'état non différencié. La recherche de molécules dont l'expression serait diminuée au cours des différenciations A, O ou V pourrait permettre d'identifier certains des facteurs ayant un rôle déterminant dans la régulation de l'hématopoïèse et la migration des CSH.

La première étape était de quantifier l'évolution de facteurs solubles associés à la niche et sécrétés par les cellules stromales, puis de regarder par immunofluorescence l'évolution de l'organisation interne des cellules au cours de la différenciation.

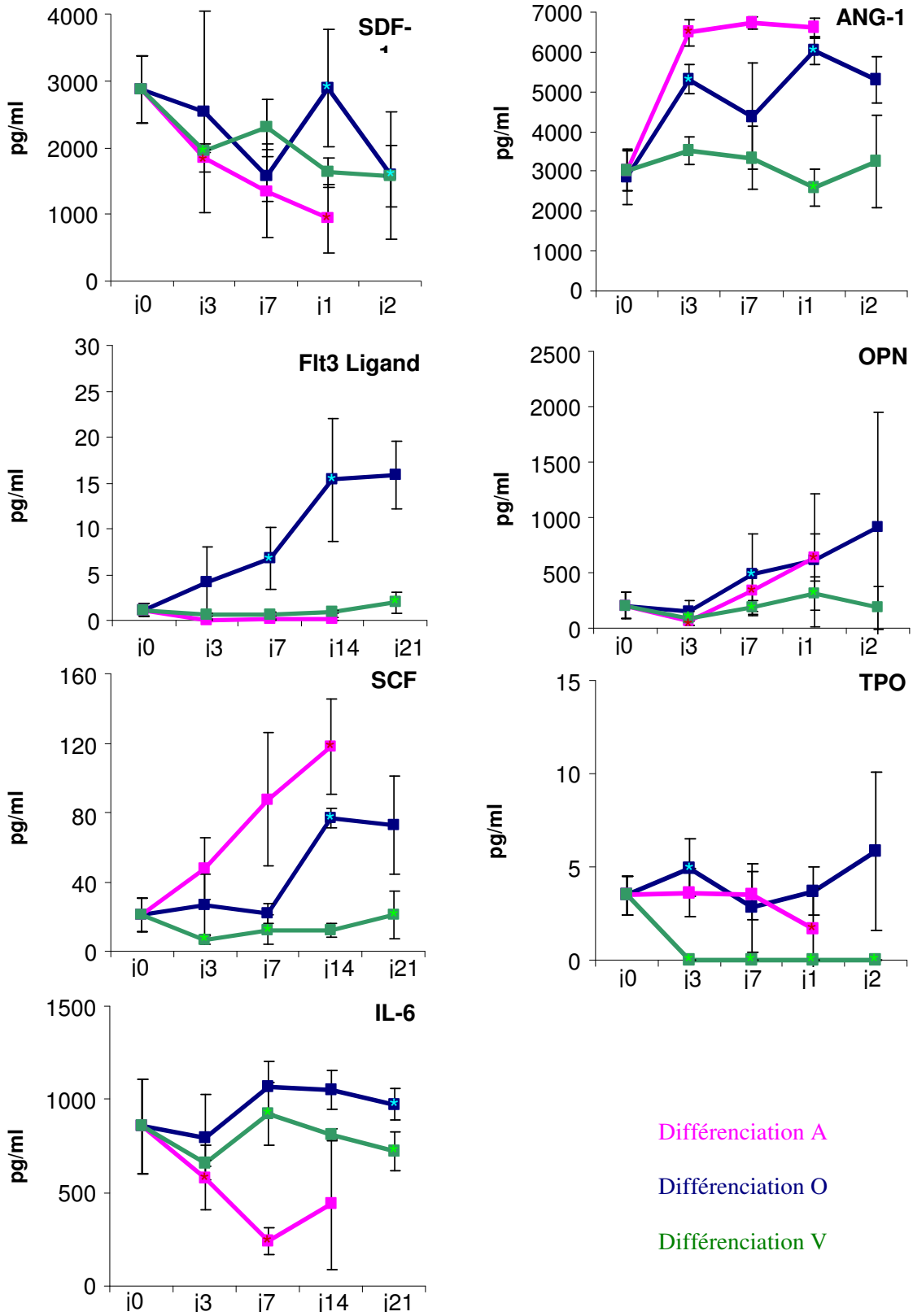
La deuxième étape a consisté à regarder par cytométrie en flux l'évolution au cours des différenciations des marqueurs d'immaturité, des marqueurs mésenchymateux, des marqueurs hématopoïétiques et des marqueurs endothéliaux et enfin d'évaluer par QRT-PCR l'évolution de la transcription de gènes importants dans l'hématopoïèse.

2.3.1. Etude de la concentration de cytokines des surnageants des CSM différenciées dans les différentes voies A, O et V

Un dosage par ELISA des facteurs solubles associés à la niche hématopoïétique et sécrétés dans les surnageants de culture des CSM induites en différenciation A, O ou V a été réalisé. Les cytokines étudiées sont SDF-1, Angiopoiétine 1 (Ang-1), Flt3-ligand, Stem Cell factor (SCF), l'ostéopontine (OPN), la thrombopoiétine (TPO) et Interleukine-6 (IL-6).

2.3.1.1. SDF-1

L'analyse de la concentration de SDF-1 au cours des différenciations montre que SDF-1 est présent en grande quantité avant toute différenciation et diminue fortement dans les trois voies de différenciation. En effet, la concentration baisse de moitié entre les temps j0 et j21, pour les voies O et V, et entre les temps j0 à j14, pour la voie A *(Figure 39)*.



<u>Figure 39 :</u> Concentration des cytokines dans le surnageant des CSM induites en différenciation. Analysé par ELISA.

Les résultats proviennent de 3 expériences indépendantes (n=3).

2.3.1.2. Ang-1

L'analyse de la concentration d'Ang-1 montre une forte augmentation de la quantitté d'Ang-1 dans les voies de différenciation ostéogénique et adipogénique. Une nette augmentation des taux d'Ang-1 est observée de j0 à j3, suivi d'un plateau jusqu'à la fin de la différenciation pour la voie adipogénique et ostéogénique. En revanche, pour la voie V, le taux d'Ang-1 demeure constant à chacun des temps de différenciation aux alentours de 2500 ng/mL *(Figure 39)*.

2.3.1.3. SCF

L'analyse de la concentration de SCF dans le surnageant des CSM montre une augmentation significative dans les voies de différenciation ostéogénique et adipogénique : de j0 à j14, les concentrations ont été multipliées respectivement par un facteur 4 et 5 alors que dans la différenciation V, à des temps similaires, sa concentration est diminuée de moitié *(Figure 39)*.

2.3.1.4. Flt3-L

Dans les voies A et V, la concentration de la molécule est très faiblement retrouvé dans le surnageant, à la limite du seuil de détection (environ 1 pg/mL) tandis que, dans la voie ostéogénique, la concentration augmente très fortement, de j3 à j21 d'un facteur 10 *(Figure 39)*.

2.3.1.5. TPO

La concentration de TPO n'est plus détectée dès j3, pour la voie V, et dès j14, pour la voie A. Dans la voie O, TPO est exprimée tout au long de la cinétique de différentiation avec une discrète augmentation de sa concentration à j14 *(Figure 39)*.

2.3.1.6. OPN

Les profils d'évaluation de la concentration d'OPN sont identiques dans les trois voies. Les concentrations augmentent modérément aux cours des différentes différenciations *(Figure 39)*.

2.3.1.7. IL-6

En ce qui concerne les différenciations O et V, on constate une augmentation modérée de j7 à j21. Au contraire, la différenciation A s'accompagne d'une forte diminution est obtenue jusqu'à j7 avec une légère augmentation à j14 *(Figure 39)*.

2.3.1.8. Conclusion de l'analyse des cytokines pas ELISA

L'étude des cytokines ne montre pas de chute drastique d'un ou de plusieurs facteurs secrétées dans les surnageants des CSM au cours de l'ensemble des différenciations pour essayer d'expliquer la perte du soutien de l'hématopoïèse. Ceci suggère que ce phénomène fait intervenir d'autres facteurs ou d'autres mécanismes.

2.3.2. Évolution de l'organisation interne des CSM

Les études en immunofluorescence *in situ* pour la détection des protéines structurales ont été réalisées sur les CSM après 0, 3, 7, 14, et 21 jours de différenciation A, O ou V *(Figure 40)*.

2.3.2.1. Évolution de l'ASMA au cours des différenciations

L'observation de l'évolution du marquage ASMA en immunofluorescence *in situ* montre à l'état basal une forte expression de l'ASMA par les CSM. Un réseau intracellulaire très fin est observé surtout au niveau des extensions cytoplasmiques, les fibres d'ASMA se visualisent facilement et apparaissent bien individualisées. Ce réseau devient moins intense et plus diffus en particulier au cours de la différenciation O dès le 7j et dans une moindre mesure au cours de la différenciation A *(Figure 40A)*. Cette désorganisation du réseau de l'actine pourrait participer à la perte du soutien de l'hématopoïèse.

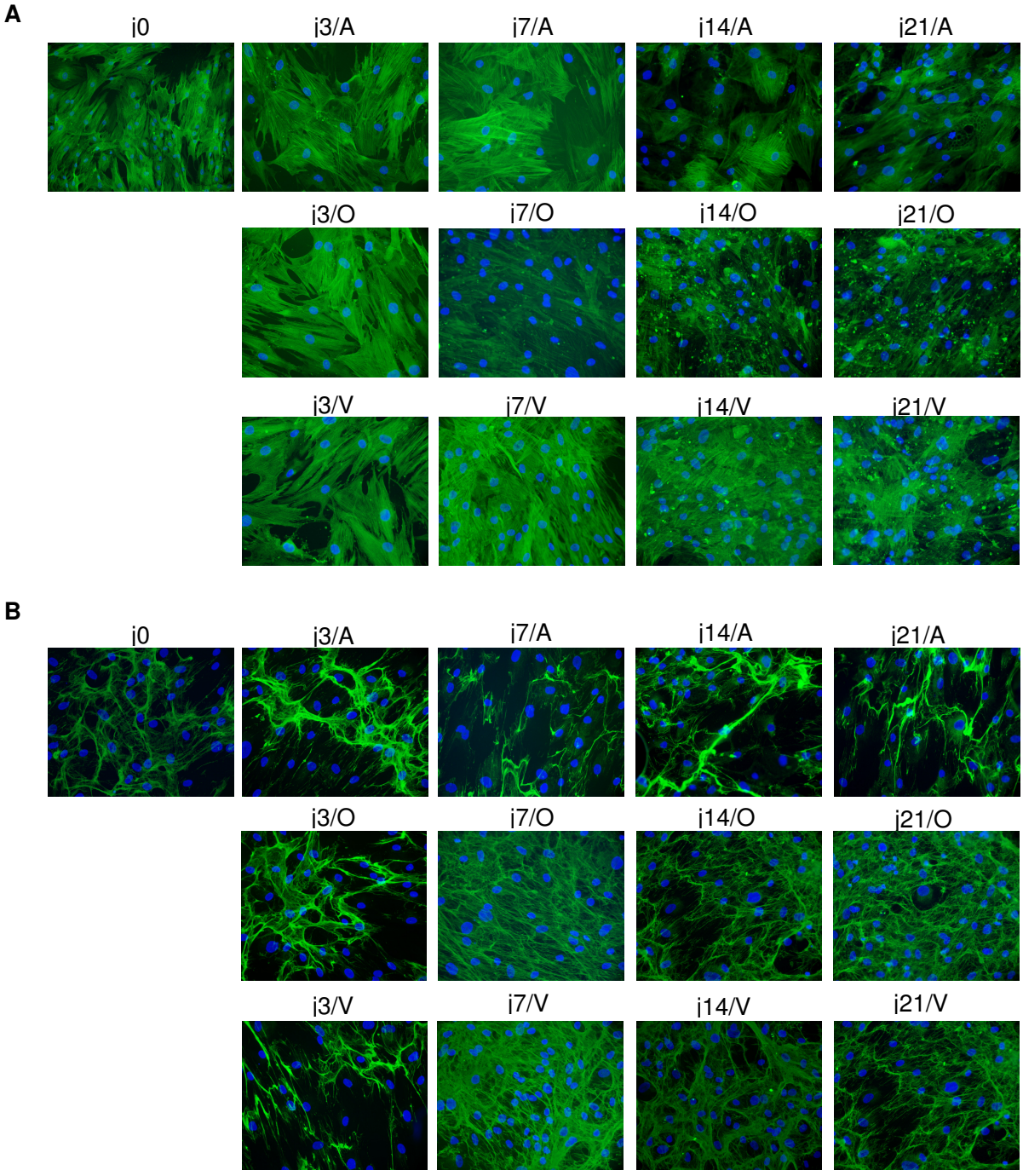


Figure 40 : Immunofluorescence des CSM engagées dans une voie de différenciation

(A) Marquage de l'ASMA, (B) Marquage de la Fibronectine

2.3.2.2. Évolution de la fibronectine au cours des différenciations

L'évolution de la production de fibronectine par les cellules en différenciation a été suivi par un marquage en immunofluorescence. Les CSM non différenciées expriment de façon importante la fibronectine : un réseau apparaît reliant les cellules entre elles et cela uniformément dans tous les champs étudiés. Lorsque les cellules sont induites en différenciation le réseau de fibronectine évolue différemment selon la voie de différenciation engagée par les CSM. Aux temps précoces de différenciation A, O et V, le réseau de fibronectine semble déjà avoir légèrement évolué en comparaison à l'état non différencié, les fibres du réseau sont plus épaisses et moins bien réparties à la surface des cellules. Au cours de la différenciation adipogénique, le réseau de fibronectine devient plus épars et surtout les fibres semblent être encore plus épaisses qu'au stade j3. Parallèlement, au cours de la différenciation ostéogénique et vasculaire musculaire lisse, le réseau évolue de façon complètement différente. Celui-ci devient à partir de j7 beaucoup plus serré formé de fibres fines et ceci jusqu'à la fin de la différenciation O ou V à j21 montrant un réseau fin et uniforme tendant à devenir diffus *(Figure 40B)*.

La différenciation des CSM entraîne une modification de la structure de la fibronectine, aboutissant à une désorganisation du réseau pouvant altérer la liaison des cellules hématopoïétiques au microenvironnement.

B- CONTROLE DE LA MIGRATION DES CELLULES HEMATOPOÏETIQUES PAR LES CELLULES STROMALES MEDULLAIRES

Le microenvironnement médullaire est indispensable à la survie, la prolifération et au contrôle de la balance entre différenciation et autorenouvellement des CSH grâce aux intéractions très étroites de ces cellules avec les niches hématopoïétiques. La composante cellulaire de la niche hématopoïétique est représentée par des cellules dérivant de cellules souches mésenchymateuses comprenant les cellules stromales à différenciation vasculaire musculaire lisse, les ostéoblastes, les cellules musculaires lisses et les adipocytes. Des travaux récents ont montré que les ostéoblastes seraient des éléments constitutifs essentiels de la niche responsables du maintien du caractère souche des CSH (Calvi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). En fait, les cellules périvasculaires pourraient finalement représenter les cellules constitutives de la niche dont les caractéristiques sont proches (voir identiques) à celles des CSM (Sacchetti , 2007; Mendez-Ferrer 2010).

La migration des CSH est un phénomène physiologique puisqu'au cours de l'ontogénèse, les CSH colonisent successivement l'AGM (aorte-gonade-mesonephros), le foie puis la moelle osseuse. La moelle osseuse est ainsi repeuplée par un ensemble de cellules sanguines immatures capables de se différencier vers l'ensemble des lignées hématopoïétiques. Une partie des CSH va ensuite être remise en circulation alors qu'un pool de cellules souches indifférenciées sera conservé au sein de la moelle osseuse. En outre, la mise en circulation des CSH à partir de la moelle osseuse peut également être induite artificiellement par l'injection *in vivo* de facteurs de croissance hématopoïétique comme le G-CSF pour collecter des greffons de CSH utilisables lors de traitements antitumoraux intensifs. Les mécanismes de cette mobilisation des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques (PH) commencent à être élucidés. Il est maintenant établi que l'administration *in vivo* de G-CSF induit la production médullaire de protéases tels que l'élastase du neutrophile (NE), la cathepsine G (CG) et des métalloprotéases. Ces protéases, outre leur capacité à dégrader la matrice extracellulaire (MEC), vont interrompre les interactions entre molécules d'adhérence et leur récepteur (comme la liaison VLA-4/VCAM-1) ou entre cytokines et leur récepteur (comme le facteur de croissance Stem Cell Factor et son récepteur c-kit ou la chimiokine SDF-1 et son récepteur CXCR4). Il a été rapporté que l'expression de VCAM-1 diminue fortement dans la MO de souris traitées avec du G-CSF, du SCF, du cyclophosphamide. La mobilisation des CSH ainsi induites coïncide avec une élévation dans le sang périphérique de la concentration de VCAM-

1 soluble et des protéases NE et CG (Levesque *et al.*, 2001; Levesque *et al.*, 2002) qui sont capables *in vitro* de cliver VCAM-1 et SDF-1 (Delgado *et al.*, 2001; Levesque *et al.*, 2001; Valenzuela-Fernandez *et al.*, 2002). Lors de la mobilisation induite par le G-CSF ou la chimiothérapie, il a aussi été montré que l'expression de MMP-9 est augmentée dans la moelle et que cette mobilisation est altérée chez les souris MMP-9-/-(Heissig *et al.*, 2002). Cette protéase a la capacité de dégrader *in vitro* SDF-1 (McQuibban *et al.*, 2001). D'autre part les protéases NE, CG, protéinase-3 et MMP-9 sont capables de cliver c-Kit comme l'atteste la diminution de l'expression de c-Kit à la surface des cellules $CD34^+$ du sang mobilisé (Simmons *et al.*, 1994; To *et al.*, 1997; Roberts *et al.*, 1999; Levesque *et al.*, 2003b).

Cependant, la contribution des NE, CG et MMP-9 dans la sortie des CSH/PH hors de la niche hématopoïétique est discutable puisque ces protéases sont produites par des cellules (les neutrophiles et les monocytes/macrophages) qui ne font pas vraiment partie de la niche. Un travail préalable réalisé au laboratoire a montré un effet direct du G-CSF sur les cellules stromales humaines en favoriserant la mobilisation des cellules hématopoïétiques (CH) hors de la niche par un mécanisme impliquant spécifiquement la MMP-2 et pas la MMP-9.. Nous avons complété et enrichi ce travail à partir du même modèle *in vitro* de migration trans-stromale comprenant des CSM médullaires pour représenter les cellules formant la niche hématopoïétique. Nous avons montré que l'effet stimulant du G-CSF était strictement dépendant de la présence du G-CSFR exprimé par les CSM par une approche d'interférence ARN. Ce travail est actuellement soumis à publication (voir Annexe 2).

1. LA STIMULATION DES CSM PAR LE G-CSF PERMET LA MIGRATION DES CELLULES CD34+

Ce travail montre que le G-CSF peut exercer un rôle direct sur les CSM dans le processus de mobilisation des CSH/PH hors de la niche hématopoïétique par une activation membranaire de MMP-2 alors que des protéases comme MMP-1 ou MMP-9 n'apparaissent pas impliquées.

Pour étudier l'implication des CSM dans la mobilisation de CSH/PH, un modèle *in vitro* de migration trans-stromale de CH à été développé. Des CSM médullaires humaines stimulées ou non par du G-CSF ont été préalablement ensemencées sur des transwells à travers lesquels nous avons fait migrer des cellules de la lignée MO7e ou $CD34^+$ humaines en présence d'un gradient de SDF-1. Les résultats montrent que la pré-stimulation par le G-CSF des CSM augmente la migration des cellules MO7e ($p<0,001$) et $CD34^+$ ($p=0,01$) *(Figure 41)*.

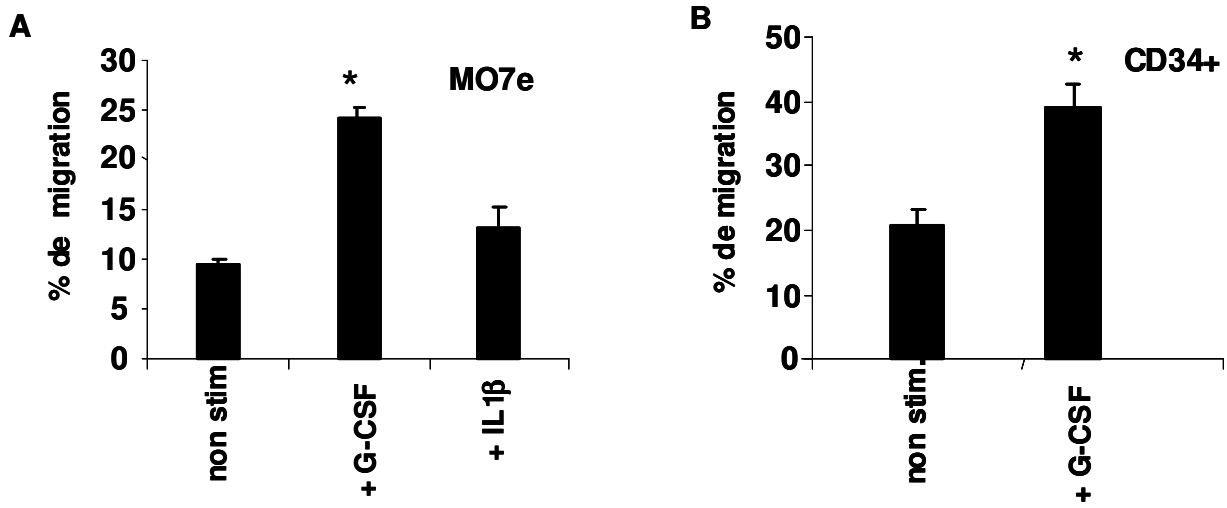


Figure 41 : Effet du G-CSF sur la migration trans-stromale des cellules hématopoïétiques

(**A**) Migration des Mo7e au travers de CSM stimulées par le G-CSF ou l'IL1β

(**B**) Migration des CD34+ après stimulation des CSM par le G-CSF

* Différence significative en comparaison au CSM non stimulées

2. LA STIMULATION DES CSM PAR LE G-CSF EST ABOLIE PAR ARN INTERFERENCE (SHRNA) DIRIGÉ CONTRE LE G-CSFR

Pour renforcer les arguments en faveur d'un effet direct du G-CSF sur les CSM, il était essentiel de savoir si le récepteur du G-CSF (G-CSFR) était véritablement exprimé à la surface des membranes de ces cellules (western blot) et fonctionnel (migration trans-stromale). Une approche de shRNA a été mise en place afin de vérifier la fonctionnalité du récepteur.

2.1. LES DIFFERENTES TECHNIQUES D'ARN INTERFERENCE

Plusieurs études révélent que de courtes séquences d'ARN (21-22 nucléotides) double brins (*small interference RNA* ou siRNA) étaient générées par un système endogène à partir de longs fragments d'ARN double brins et provoquaient l'inhibition d'un gène en entraînant la dégradation de son ARNm (Hamilton and Baulcombe, 1999; Tuschl *et al.*, 1999; Zamore *et al.*, 2000). Trois techniques d'ARN interférence ont été mises au point pour être utilisées en laboratoire afin d'inactiver efficacement des transcrits spécifiques dans des cellules de

mammifère : les *small interference* RNA (siRNA), les *short haiprin* RNA (shRNA) et les microRNA (miRNA). La première technique fut mise au point en 2001 en induisant la répression d'un gène par siRNA sans provoquer une réponse interféron non spécifique. Cependant, le principal inconvénient des siRNA synthétiques est l'effet transitoire de l'inhibition transcriptionnelle induite dans les cellules de mammifère. Cet obstacle fut franchi par la mise au point les shRNA. Ces structures clonées dans un plasmide ou un vecteur viral, sous contrôle du promoteur pol III, s'intègrent dans le génome de la cellule hôte permettant une expression constitutive du shRNA et ainsi une inhibition durable du gène cible (Hemann *et al.*, 2003; Rubinson *et al.*, 2003; Scherr *et al.*, 2003; Tiscornia *et al.*, 2003). Des systèmes permettent l'expression de miRNA artificiels, qui comme les miRNA physiologiques, sont formés d'une structure centrale de 19 à 29 nucléotides composée de deux brins d'ARN de tailles différentes et imparfaitement complémentaires, donnant naissance à des structures en boucle.

2.2. MODES D'ACTION DES SHRNA

Les shRNA sont composés d'une structure centrale en double brin parfaitement appariée de 19 à 29 pb, un des brins étant identique à la séquence cible. Ces deux brins sont reliés par une structure en boucle de 9 pb, et le shRNA est pris en charge dans la cellule par l'enzyme Dicer libérant de la structure le siRNA actif permettant la dégradation de l'ARNm cible.

2.3. RESULTATS

Afin de valider et de comprendre le rôle du G-CSF dans les mécanismes de migration cellulaire des cellules hématopoïétiques au travers des cellules souches mésenchymateuses, nous avons mis au point un nouveau modèle de migration cellulaire et pour cela nous avons développé une stratégie d'ARN interférence, par shRNA.

Dans un premier temps nous avons vérifié par cytométrie en flux la présence du G-CSFR à la surface des membranes des CSM *(Figure 42A)*. Nous avons ensuite détecté par Western blot l'expression du récepteur au G-CSF sur la membrane des CSM à l'état basal. Ce récepteur apparaît identique à celui exprimé par les polynucléaires neutrophiles (97 kDa) *(Figure 42B)*.

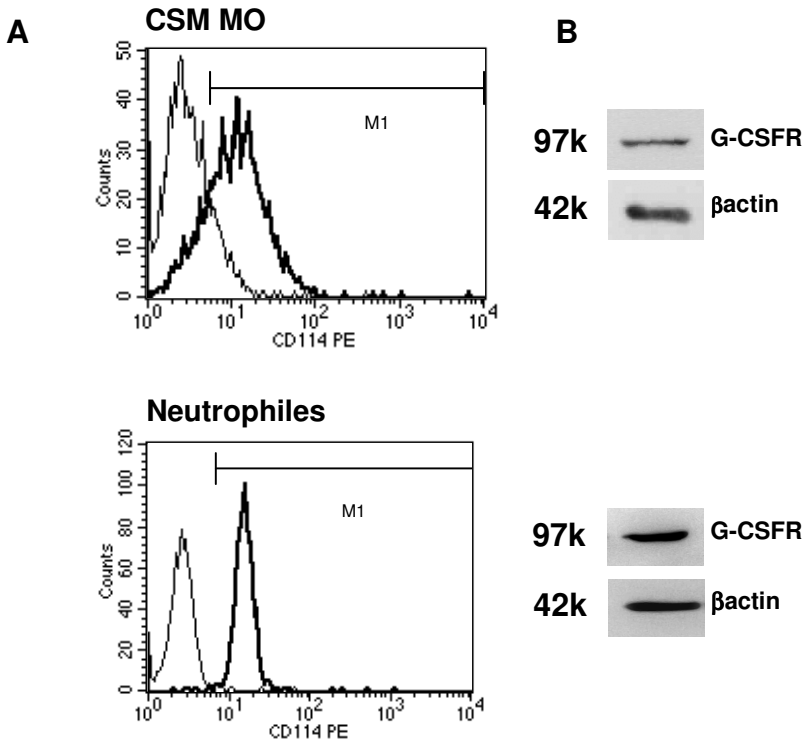


Figure 42 : Détection du G-CSFR par (**A**) cytométrie en flux et (**B**) Western-blot

Dans un second temps, afin de vérifier l'efficacité des shRNA sélectionnés, des CSM ont été transféctées par des shRNA non spécifiques contrôles (shRNA 1 et 2) et par des shRNA cibles (shRNA 3, 4, 5, 6) spécifiques du G-CSFR. Un signal indiquant la présence du G-CSFR a été détecté par Western-blot avec les shRNA contrôles validant que la transfection et l'utilisation de shRNA n'altère pas en soi la production de G-CSFR. À l'inverse, aucun signal n'est détecté avec les shRNA cibles démontrant l'extinction du G-CSFR au niveau de la membrane des CSM. Ces shRNA fonctionnels ont donc été utilisés par la suite pour les techniques de migration trans-stromale *(Figure 43A)*.

Nous avons émis l'hypothèse que la non expression du G-CSFR à la surface des membranes des CSM entrainerait la diminution de la migration trans-stromale des CSH. Ainsi, nous avons réalisé des tests de migration trans-stromale avec des CSM transfectées avec les shRNA ciblant ou non le G-CSFR.

Il a tout d'abord été vérifié que la transfection et l'utilisation de shRNA n'altèrait pas en soi la migration des cellules $CD34^+$. Aucune différence significative n'a été retrouvée lors de

l'utilisation du shRNA 1 (plasmide vide) et du shRNA (non spécifique du G-CSFR) *(Figure 43B)*.

Nous avons montré que dans les cas où les CSM avaient été transfectées par les shRNA ciblant le G-CSFR et pré-stimulées par le G-CSF il y avait une forte diminution de la migration des $CD34^+$ par rapport à la condition contrôle (transfection avec le shRNA2) d'une moyenne de 78,53±1,13 % *(Figure 43C)*.

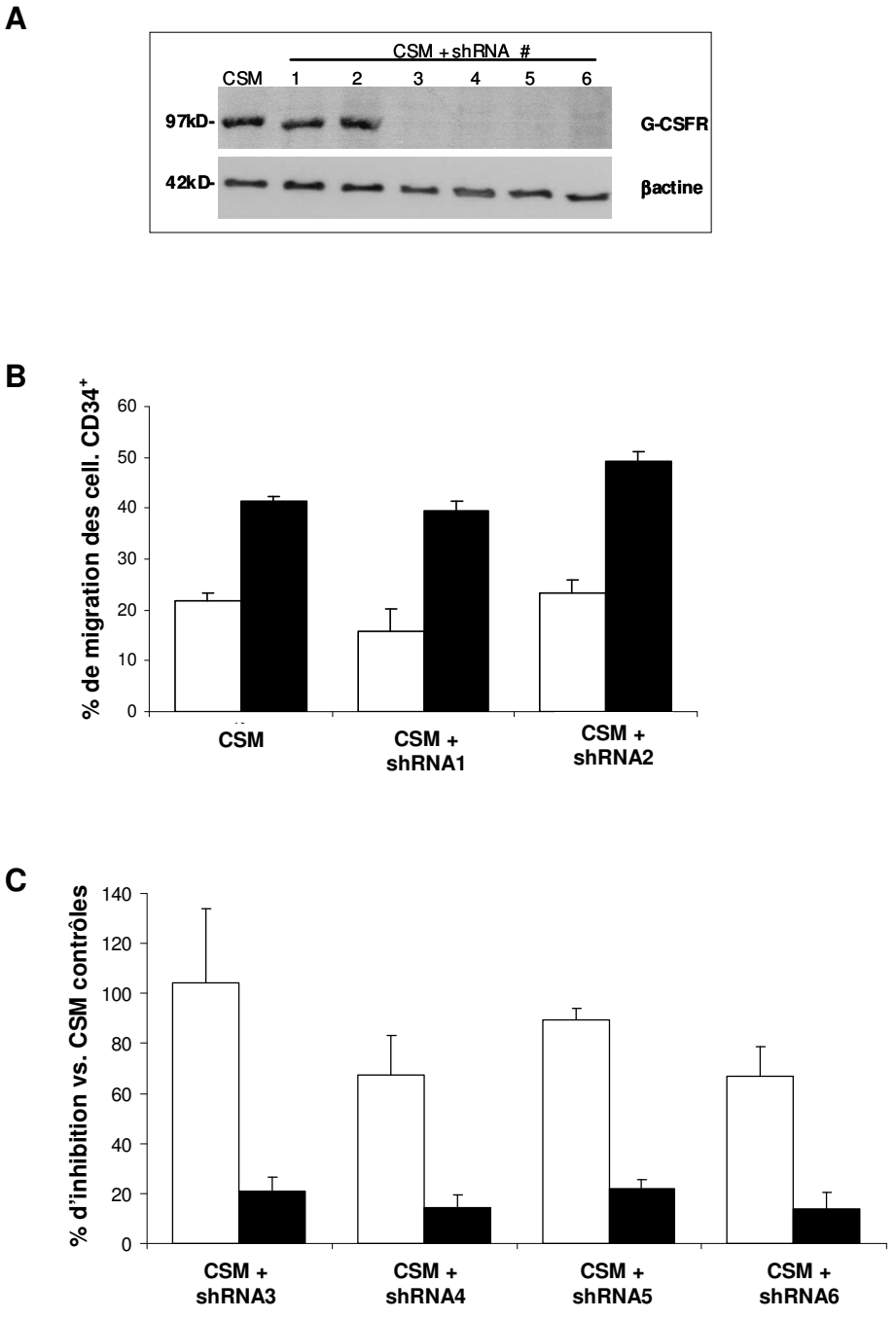


Figure 43 : Inhibition de G-CSFR par shRNA

(**A**) Analyse par Western-blot. (**B**) Contrôle de la transfection. (**C**) Test de migration des cellules $CD34^+$, résultats exprimés en valeur d'inhibition de la migration par rapport a la migration contrôle.

3. LA STIMULATION DES CSM PAR LE G-CSF PERMET LA MIGRATION DES CD34+ VIA UN MECANISME MMP2-DEPENDANT

L'hypothèse que l'augmentation de la migration trans-stromale des progéniteurs hématopoïétiques induite par le G-CSF était liée à la production locale de MMP a été émise. Pour vérifier cette hypothèse, l'expression des MMP par les CSM a été évaluée.

Les MMP étant probablement impliquées dans la migration trans-stromale des progéniteurs hématopoïétiques, l'expression des MMP par les CSM (stimulées ou non par le G-CSF) par RT-PCR, ELISA, cytométrie en flux et immunofluorescence a été évalué et les résultats indiquent que les CSM exprimaient MMP-2 mais pas MMP-9 *(Figure 44)*. Plus précisement l'analyse par Taqman RT-PCR indiquent que les CSM expriment en plus de la MMP-2, de la MMP14, TIMP1 et TIMP2 qui sont nécessaire à l'activation de la MMP-2, mais en quantité inférieure à la MMP-2.

L'analyse zymographique a permis d'observer une augmentation de l'activité gélatinolytique de la proMMP-2 dans les fractions membranaires et cytolytiques des CSM. Une activation de la pro-MMP-2 était constatée uniquement dans les fractions membranaires de CSM après stimulation par le G-CSF *(Figure 45)*.

Afin de finaliser ce travail des tests de migration trans-stromale en présence ou en absence d'inhibiteurs des MMP ont été réalisés. Dans un premier temps, l'inhibiteur des MMP à large spectre a été utilisé, le GM 6001, connu pour exercer une activité inhibitrice contre MMP-1,-2, -3, -8 et -9. Les résultats montrent que le GM 6001 diminue signativement le pourcentage de migration des cellules MO7e ayant migrées à travers les CSM seulement lorsque ces CSM ont été pré-stimulées par le G-CSF (diminution de 26,2±1,8 % à 16,6±0,9 % correspondant à une inhibition de 36±6 %) ($p<0,01$) *(Figure 46A)*. Pour préciser quel type de MMP était impliqué dans le processus de migration induit par le G-CSF des tests de migration en présence d'Ac bloquants spécifiques anti-MMP-1, -2 et -9 ont été réalisés par la suite. La migration des cellules MO7e et des cellules de $CD34^+$ a été significativement inhibée par l'Ac anti-MMP-2 ($p<0,01$) tandis qu'aucune inhibition n'était observée avec les Ac anti-MMP-9 et anti-MMP-1. Le pourcentage de cellules ayant migré est passé de 23,0±1,4 % à 9,7±0,9 % ($p<0,001$) pour les cellules MO7e (représentant une inhibition de 58,0±36,2 %) et pour les cellules $CD34^+$ de 35,4±2,2 % à 21,3±3,0 % ($p<0,01$) (représentant une inhibition de 40,0±32,3 %). Ces résultats indiquent que MMP-2 est principalement impliquée (mais pas

exclusivement) dans le processus de migration des CH à travers des CSM pré-stimulées par le G-CSF. En revanche, comme trouvé pour MMP-1, MMP-9 ne semble pas participer à ce processus *(Figure 46B, 46C)*. Le mécanisme d'activation de la MMP-2 membranaire induite par le G-CSF reste encore à élucider.

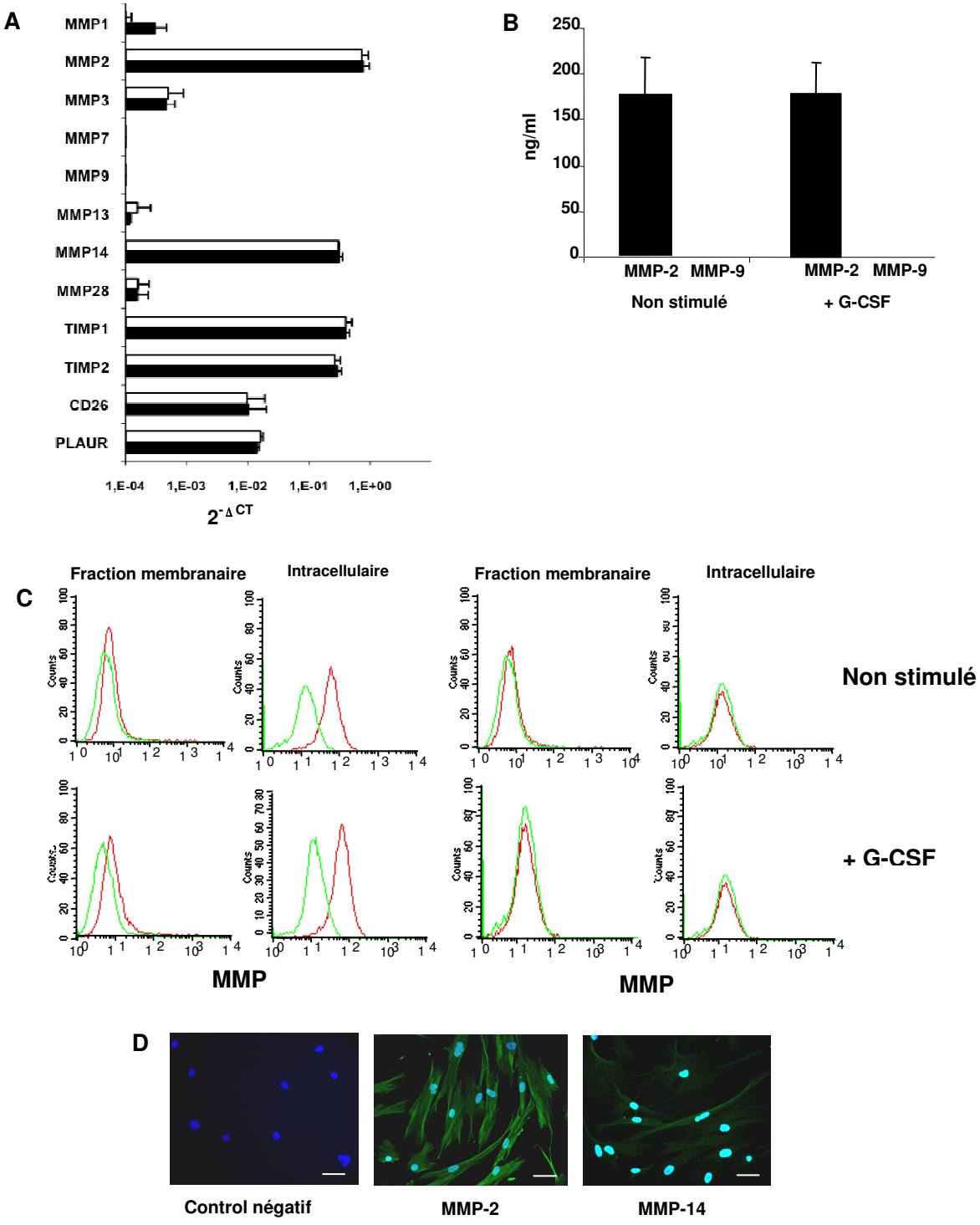


Figure 44 : Analyse des protéases

(**A**) Analyse par cartes micro fluidiques. (**B**) Quantification par ELISA dans le surnageants des CSM. (**C**) Analyse par cytométrie en flux. (**D**) Immunofluorescence, la barre d'échelle représente 50µm

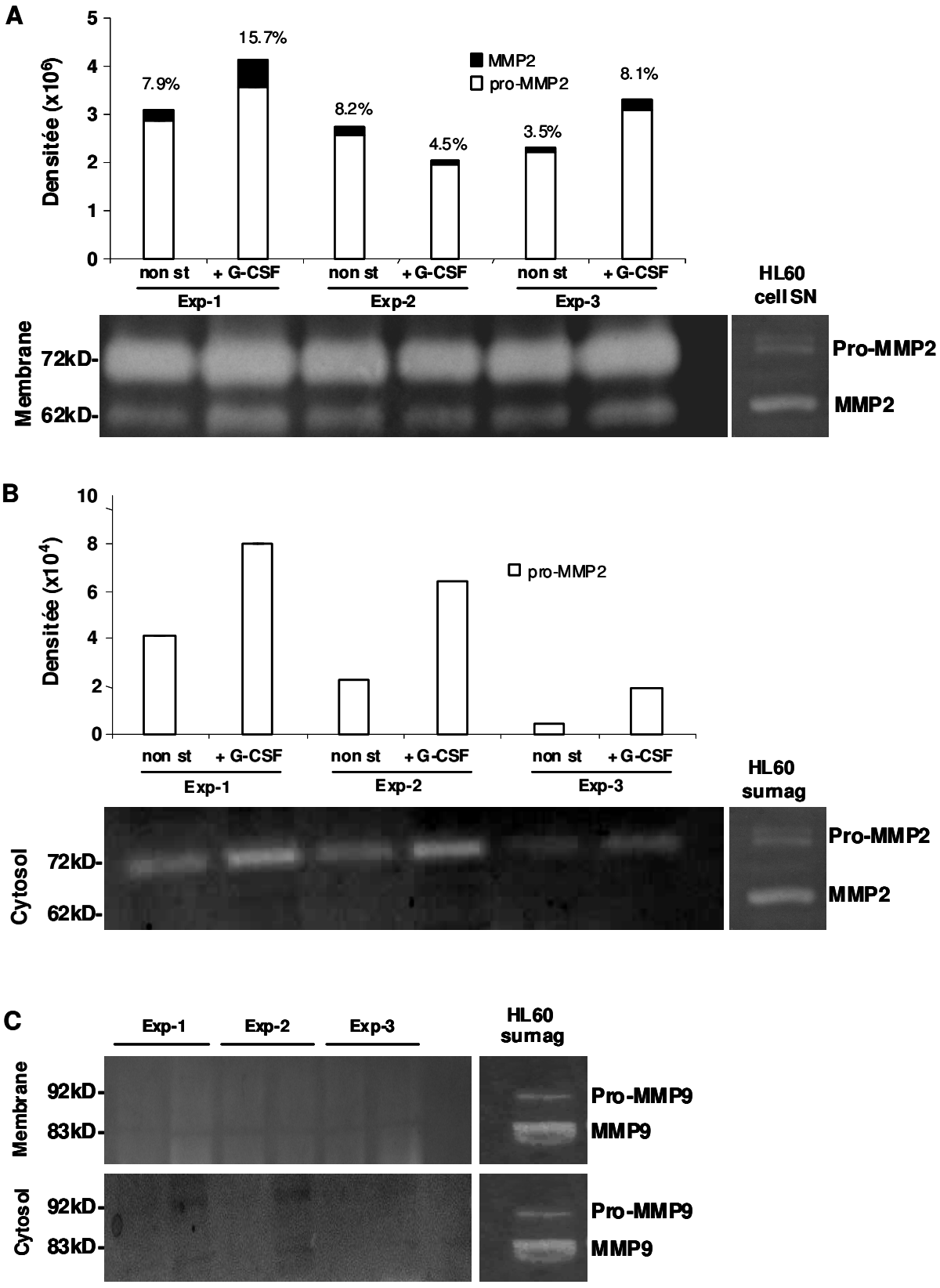


Figure 45 : Effet du G-CSF sur l'activation membranaire de la MMP-2 analysé par zymographie

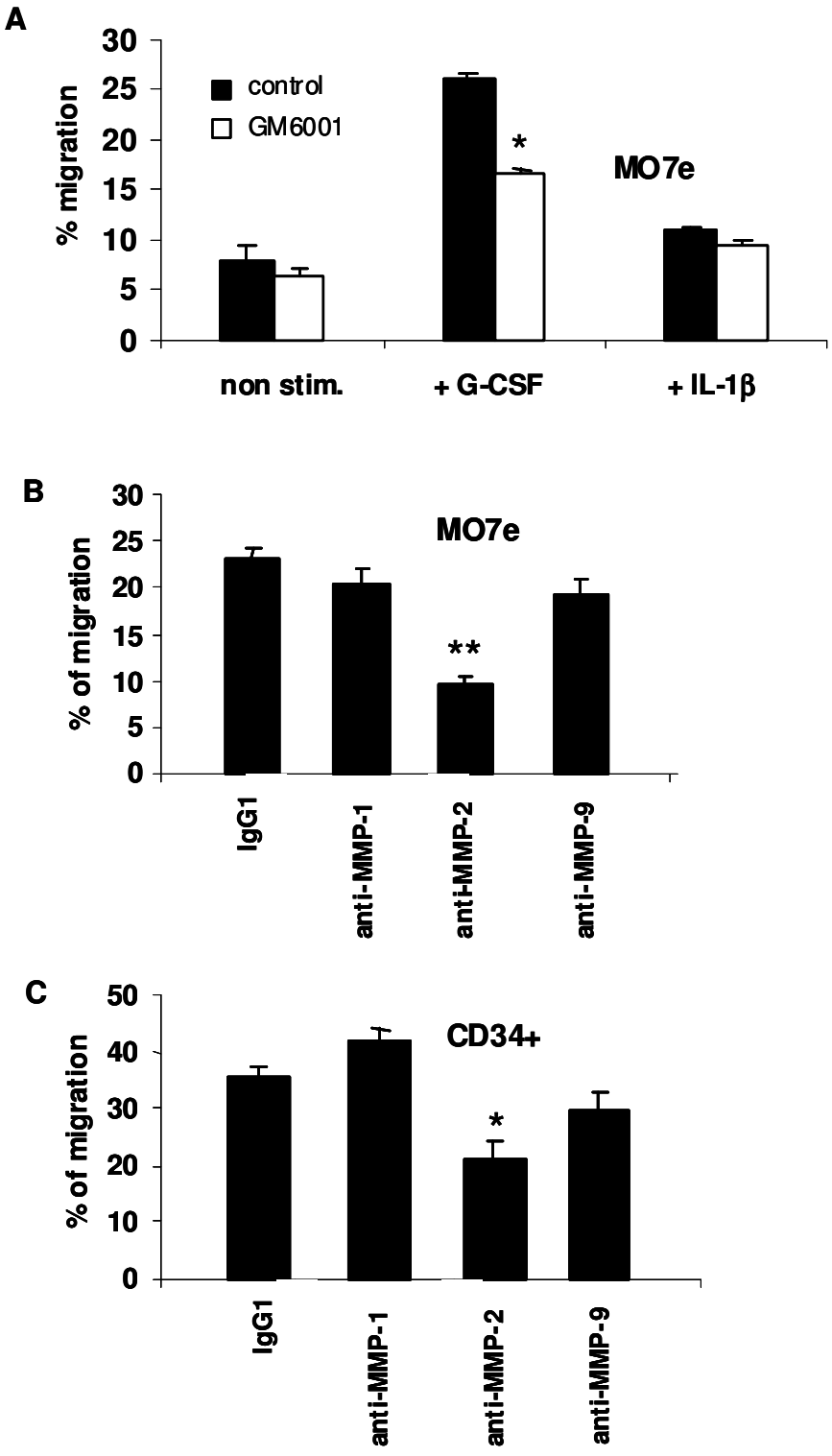


Figure 46 : Rôle de la MMP-2 dans la migration trans-stromale des cellules hématopoïétiques.

(A) Migration avec un inhibiteur des MMP à larges spectres. (B) Migration des cellules MO7e avec des anti-MMP spécifiques. (C) Migration des CD34+ avec des anti-MMP spécifiques.

4. CONCLUSION

Ce travail a permis de mettre en évidence le rôle spécifique des CSM au sein du microenvironnement hématopoïétique dans le contrôle de la mobilisation des CSH induites par le G-CSF. Ce rôle serait fondamental dans l'initiation de la sortie des CSH hors de la niche hématopoïétique en faisant intervenir une activation de la MMP-2 membranaire et non de la MMP-9. Le rôle de la MMP-2 serait, non seulement d'induire la protéolyse de la matrice extracellulaire, mais aussi de dégrader SDF-1 (McQuibban *et al.*, 2001) libérant ainsi les CSH de leur ancrage à la matrice extracellulaire qui pourraient alors migrer vers la circulation sanguine.

Ce travail a également mis en avant le role fondamental du G-CSF dans la stimulation des CSM afin d'entrainer une mobilisation des CSH et nous avons pu montrer que cette fonction était principalement due au G-CSFR présent sur les membranes des CSM.

Discussion Perspectives

L'hématopoïèse chez l'homme adulte a lieu dans la moelle osseuse à partir de cellules primitives appelées cellules souches hématopoïétiques. Ces cellules présentent 3 propriétés majeures: une capacité d'autorenouvellement qui leur permet de se maintenir tout au long de la vie de l'individu, une capacité de différenciation vers les 2 lignages myéloïde et lymphoïde et une capacité à régénérer l'hématopoïèse *in vivo* dans un animal irradié. Le système hématopoïétique est organisé selon toute une hiérarchie de cellules de la CSH immature pour aboutir aux cellules matures fonctionnelles dans le sang en passant par des progéniteurs (cellules souches différenciées) et des précurseurs identifiables morphologiquement.

Dans la moelle osseuse, les cellules hématopoïétiques sont en contact avec un microenvironnement particulier qui regroupe une composante cellulaire et une composante moléculaire. Il est constitué de cellules dites stromales parmi lesquelles des cellules souches mésenchymateuses qui peuvent se différencier pour donner naissance aux chondrocytes, aux ostéoblastes, aux adipocytes et aux cellules vasculaires musculaires lisses. D'autres cellules d'origine hématopoïétique comme des cellules endothéliales, des macrophages et des ostéoclastes sont également présentes. Le microenvironnement comprend aussi une matrice extracellulaire constituée de protéines insolubles produites par les cellules stromales et des facteurs solubles, chimiokines et facteurs de croissance, également secrétés par les cellules stromales.

La niche hématopoïétique peut être définie schématiquement comme l'association entre une cellule stromale et une cellule souche hématopoïétique. Il s'établit un dialogue entre ces 2 types cellulaires par des interactions directes par des molécules d'adhérence ou des interactions indirectes par la sécrétion de facteurs solubles dont les récepteurs sont exprimés par les cellules hématopoïétiques.

Dans cette association, la cellule stromale est à la fois un support physique mais aussi un élément de régulation de l'hématopoïèse et permet le maintien de l'équilibre entre autorenouvellement et engagement des CSH vers les voies de différenciation. Cette cellule stromale est donc définie par sa fonction hématopoïétique au sein de la niche, mais sa nature n'est pas encore bien connue.

Les progrès récents ont permis de commencer à caractériser ces niches et les facteurs qui régulent les CSH comme l'angiopoïétine, les ions calcium, le SDF-1, SHH, l'ostéopontine, le SCF ou la thrombopoïétine. La perte combinée de Tie2 (le récepteur de l'angiopoïétine) ainsi que Tie1, conduit à des défauts dans les CSH postnatales (Puri and Bernstein, 2003) et l'angiopoïétine semble favoriser le maintien des CSH quiescentes (Arai *et al.*, 2004). La

suppression du récepteur sensible au calcium conduit à la réduction du nombre de cellules dans la moelle osseuse et à une mobilisation des CSH dans la circulation (Adams *et al.*, 2006). Les souris déficientes en SDF-1 ou en son récepteur CXCR4 montrent une colonisation de la MO modifiée, alors que la suppression conditionnelle de CXCR4 chez la souris adulte conduit à la réduction du nombre de CSH dans la moelle osseuse (Nagasawa *et al.*, 1996a; Zou *et al.*, 1998; Ara *et al.*, 2003; Sugiyama *et al.*, 2006). Les CSH hétérozygotes pour le récepteur à SHH ont une activité de reconstitution à long terme de l'hématopoïèse qui est réduite lorsqu'il est surexprimé, ce qui suggère qu'un membre de la famille des ligands SHH peut réguler négativement l'autorenouvellement des CSH (Trowbridge *et al.*, 2006). L'ostéopontine est exprimée au niveau de l'endostéum par des ostéoblastes immatures formant la bordure de l'os et régule de façon négative le nombre de CSH, les souris déficientes pour l'ostéopontine ont une très faible augmentation du nombre de CSH dans la moelle (Nilsson *et al.*, 2005; Stier *et al.*, 2005). Les souris déficientes pour le SCF ou son récepteur KIT ont quant elles moins de CSH et une activité hématopoïétique moindre (Barker, 1994; Kiel and Morrison, 2006). La thrombopoïétine est synthétisée dans le foie, le rein, le stroma de la moelle osseuse ainsi que par les ostéoblastes; celle-ci peut-être transportée jusqu'à la moelle osseuse par le sang périphérique. Les souris déficientes en thrombopoïétine ou déficientes pour son récepteur (c-Mpl) ont une forte réduction du nombre de CSH (Kimura *et al.*, 1998; Solar *et al.*, 1998; Kaushansky, 2003; Qian *et al.*, 2007; Yoshihara *et al.*, 2007)

Dans la moelle osseuse, de nombreuses CSH résident au niveau, ou proche, de l'endostéum, les cellules endostéales sécrétant des facteurs favorisant l'entretien des CSH (Li and Xie, 2005; Suda *et al.*, 2005; Adams and Scadden, 2006). Sur ces arguments, on a attribué à l'endostéum un rôle important dans la quiescence et l'autorenouvellement des CSH. D'autres cellules de la moelle osseuse ont probablement aussi un rôle important dans la création de niches hématopoïétiques. Beaucoup de CSH se localisent aussi près des vaisseaux sanguins dans la moelle osseuse (Kiel *et al.*, 2005; Kiel *et al.*, 2007) et des cellules périvasculaires sécrétant des facteurs régulant le mantien des CSH (Sugiyama *et al.*, 2006; Sacchetti *et al.*, 2007).

Ces observations soulèvent des questions importantes concernant la localisation et la nature des niches hématopoïétiques. S'agit-il d'un microenvironnement complexe de la moelle osseuse qui fourni les facteurs nécessaires aux CSH ou existe-t-il un type unique de cellule qui représente sur le plan physiologique une source importante des facteurs clés à l'autorenouvellement et à la différenciation des CSH ?

Dans ce travail nous avons cherché à améliorer nos connaissances autour de ces questions en testant *in vitro* dans un premier temps la fonction hématopoïétique de CSM non différenciées et de CSM induites à se différencier dans les voies A, O ou V et dans un second temps en évaluant l'effet du G-CSF sur les CSM et l'implication de ces cellules dans la migration des CSH hors de la niche.

Concernant l'étude de la fonction hématopoïétique des CSM, l'analyse de nos résultats de co-culture à long terme révèle de grandes différences entre les CSM non différenciées et différenciées tant au niveau moléculaire qu'au niveau fonctionnel avec une capacité de soutien de l'hématopoïèse très variable selon l'état de différenciation des CSM. Les cellules ayant la meilleure capacité de soutien de l'hématopoïèse sont les cellules souches mésenchymateuses non différenciées, cette capacité diminuant fortement dès 3 jours de différenciation A, O ou V. Ces données ne corroborent pas certaines descriptions de la niche "ostéoblastique" retrouvées dans la littérature. En effet, il faut remarquer que l'engagement dans la voie ostéogénique des CSM ne s'accompagne pas, dans nos travaux, d'une augmentation mais au contraire d'une diminution du soutien de l'hématopoïèse et ce dès les stades les plus précoces de différenciation. En 2003, une niche été décrite dans la zone endostéale où se trouvent des cellules très particulières appelées SNO (Spindle-shaped Ncadherin+ Osteoblasts) présentant un aspect fusiforme avec un phénotype N-Cadhérine$^+$ et CD45$^+$ et associées au mantien et à l'autorenouvellement des CSH dans la niche (Calvi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). Alors que e concept de niche vasculaire a été proposé par la suite (Sugiyama *et al.*, 2006), des données récentes on montré que les cellules périvasculaires CD146$^+$ étaient capables de former des niches *in vivo* après leur transplantation ectopique (Sacchetti *et al.*, 2007). Plus récemment il vient d'être rapporté que les cellules périvasculaires exprimant la nestine permettent le maintien et la domiciliation des CSH dans la moelle osseuse *in vivo* et sont physiquement associées aux CSH les plus primitives de phénotype SLAM (Mendez-Ferrer *et al.*, 2010). Ainsi les cellules identifiées dans la littérature comme permettant le maintien des CSH dans la moelle osseuse, que ce soit les SNO ou les cellules périvasculaires, ont un phénotype très proche des CSM utilisées au cours de notre étude et donc pourraient en constituer une sous-population.

Afin de mieux comprendre la diminution du soutien de l'hématopoïèse constatée lors de la différenciation des CSM, nous avons réalisé différentes analyses moléculaires au cours de cette différenciation. L'étude des facteurs solubles associés à la niche hématopoïétique et

régulant les CSH n'a pas permis de mettre en évidence de modifications de concentration d'un ou plusieurs de ces facteurs qui pourraient expliquer une diminution du soutien de l'hématopoïèse. L'expression par les CSM au niveau cellulaire de molécules d'adhérence (VCAM-1, VLA4, VLA5), de protéines de la matrice extra cellulaire (Fibronectine), de facteurs exprimés dans la niche hématopoïétique (Jagged, Kit-ligand) nous a donné des pistes pour tenter d'expliquer la diminution du soutien de l'hématopoïèse au cours de la différenciation des CSM.

D'abord nous avons constaté que l'expression de la molécule d'adhérence VCAM-1, son étatit fortement diminuée dès 3 jours de différenciation A, O ou V. Il est connu que VCAM-1 est exprimé sur les cellules stromales médullaires à l'état basal (Simmons *et al.*, 1992) et qu'il permet une meilleure adhérence des CSH au niveau du microenvironnement médullaire (Miyake *et al.*, 1991a; Miyake *et al.*, 1991b; Williams *et al.*, 1991; Simmons *et al.*, 1992; Teixido *et al.*, 1992; Oostendorp *et al.*, 1995). Comme rapporté précédemment dans la littérature, l'inhibition de VCAM-1 par un anticorps anti-VCAM-1 (Papayannopoulou and Nakamoto, 1993; Vermeulen *et al.*, 1998; Kikuta *et al.*, 2000) ou via la délétion du gène α4 intégrine (Rubinson *et al.*, 2003) ou du gène VCAM-1 (Ulyanova *et al.*, 2005) induit la mobilisation des CSH dans la circulation. La diminution de VCAM-1 avec la différenciation des CSM pourrait expliquer une perte de l'autorenouvellement des CSH au contact de la niche ce qui expliquerait la diminution de la capacité de soutien de l'hématopoïèse que nous avons retrouvée.

Un autre résultat intéressant a été obtenu par l'analyse d'une protéine de la matrice extra cellulaire, la fibronectine. Lors de la différenciation des CSM nous avons observé une modification structurale de la fibronectine qui varie selon les temps de la différenciation. Lors de cette étude nous avons détecté la fibronectine via un anticorps monoclonal P1H11 reconnaissant le domaine de liaison aux cellules se trouvant au centre de la molécule de fibronectine. Ce domaine contient la séquence RGDS qui est le ligand de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (VLA-5). Nous avons observé une modification du réseau de fibronectine au cours des différenciations ainsi qu'une évolution différente du réseau selon la voie de différenciation engagée par les CSM. Il nous parait essentiel de continuer ce travail en recherchant la co-localisation en immunofluorescence de la fibronectine et de VLA-4 au cours des différenciations A,O et V comme cela a déjà été réalisé initialement avec des fibroblastes (Duband *et al.*, 1988), afin de déterminer si cette modification du réseau entraînerait ou non une modification de l'attachement de l'intégrine. Une diminution de l'attachement des CSH

via l'intégrine VLA5 pourrait contribuer à expliquer la diminution du soutien de l'hématopoïèse.

Il a également été démontré dans la littérature que la fibronectine pouvait changer de conformation selon son support, permettant par exemple sur une matrice de collagène ou sur une boite de culture d'accroitre sa capacité de liaison aux cellules en augmentant l'accessibilité de la séquence RGDS, motif de fixation de l'intégrine VLA-5 des cellules (Leahy *et al.*, 1996). D'après nos résultats, la différenciation des CSM pourrait au contraire être associée à une modification conformationnelle de la fibronectine, entraînant le domaine de liaison aux cellules et le motif RGDS dans une zone cryptique non accessible aux intégrines aboutissant ainsi à la diminution du soutien de l'hématopoïèse par diminution de l'attachement des CSH via l'intégrine VLA-5. Il serait intéressant de confirmer cette hypothèse, pour cela nous pourrions vérifier si la modification du réseau est due à la non accessibilité de la région RGDS à l'anticorps monoclonal P1H11 par modification conformationnelle de la fibronectine ou si il s'agit plus simplement d'une diminution de la quantité de fibronectine au cours de la différenciation. Une stratégie pourrait être l'utilisation, dans un premier temps, d'anticorps polyclonaux ciblant plusieurs zones de la fibronectine puis d'utiliser une batterie d'anticorps monoclonaux dirigés contre différentes régions de la fibronectine afin de préciser les zones de la fibronectine qui deviendraient cryptiques par modification conformationnelle selon le niveau de différenciation des CSM.

Au total, une diminution de l'adhérence au microenvironnement par l'intermédiaire de VCAM-1 et/ou de la fibronectine pourrait largement contribuer à la perte du soutien de l'hématopoïèse. Cette hypothèse est corroborée par nos résultats de culture à long terme montrant une moindre adhérence des cellules hématopoïétiques aux CSM différenciées à la 1ère semaine de culture qui est associée à une diminution drastique de la production des CFU en particulier à la 5ème semaine de culture.

Nous avons pu mettre en évidence au cours des études d'immunofluorescence *in situ* et de qRT-PCR la présence de la protéine Bmi1 et de la protéine Sox2 ainsi que l'expression des gènes d'immaturité POU5F1 (Oct4), SOX2 et NANOG dans les CSM à l'état indifférencié. Ainsi les CSM cultivées dans nos conditions de culture expriment toujours des gènes embryonnaires. Les cellules que nous définissions par un état non différencié sont en fait des cellules immatures qui jouent un rôle important dans l'hématopoïèse en régulant la balance entre auto-renouvellement et différenciation des CSH. L'évolution de l'expression des gènes POU5F1, SOX2 et NANOG suivie par qRT-PCR au cours des différenciations A, O et V,

montre une diminution de l'expression de ces 3 gènes au cours des différenciations A et V. La différenciation O se traduit par une augmentation de l'expression des gènes d'immaturité, cette augmentation est inattendue et nous n'avons toujours pas de réponse nous permettant de l'expliquer. En perspective de ce travail, une approche de surexpression génique ou de perte de fonction de ces marqueurs d'immaturité pourrait être développée pour évaluer les conséquences de cette modification tant sur la capacité de différenciation des CSM que sur leur capacité à réguler l'hématopoïèse.. Une telle stratégie a déjà été utilisée avec des cellules embryonnaires de souris et des fibroblastes humains (Takahashi and Yamanaka, 2006; Yu *et al.*, 2007) leur redonnant toute leur pluripotence, et permettant alors d'obtenir des iPS. Une autre stratégie pourrait être d'utiliser des éléments génétiques temporaires qui ne s'insèrent pas dans le génome de la cellule (transposons et épisomes) codant des marqueurs d'immaturité, comme déjà rapporté par d'autres chercheurs permettant d'induire une reprogrammation de ces cellules adultes en cellules souches (Woltjen *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009).

Avant de commencer des expériences de modification génétique des CSM, une question restera à régler, l'hétérogénéité des CSM utilisées au cours de ce travail. La notion de CSM recouvre en général une population de cellules obtenues après culture, provenant de plusieurs clones, constituées d'un mélange de cellules plus ou moins différenciées, et de plus lors de nos études, les MO proviennent de prélèvement de différents patients, tout cela augmentant l'hétérogénéité des CSM étudiées. Il est généralement admis que les CSM n'expriment pas les antigènes CD45 et CD34 et qu'elles expriment les antigènes CD90, CD105, CD73, Stro-1, CD29, CD49a, CD44, CD71, CD106, CD120a et CD124. L'expression de ces marqueurs est retrouvée sur l'ensemble de la population cellulaire que nous avons étudiée, mais afin de s'affranchir d'une partie de l'hétérogénéité de ces cellules il serait intéressant de réaliser une sélection au préalable des CSM de MO. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au CD271 qui a été décrit comme un des marqueurs les plus spécifiques des CSM issus de la MO, puisque la fraction $CD271^+$ comprend la majorité des CFU (Buhring *et al.*, 2007). Nous avons pu l'observer au laboratoire au cours d'expériences préliminaires montrant que la sélection $CD271^+$ permet d'isoler une population de CSM ayant une capacité clonogénique dix à 1000 fois supérieures aux CSM non sélectionnées. La sélection par le CD271 permettrait d'avoir une contamination hématopoïétique plus faible lors de la culture des CSM et une expression moléculaire plus forte pour des gènes tels que runx2, l'ostéocalcine, le PTHR, la leptine ou le PPARγ, ainsi qu'un meilleure différenciation (Jarocha *et al.*, 2008) et surtout une population de cellules beaucoup plus homogène. Toutefois, l'utilisation de la sélection par le CD271 se heurte au problème du nombre de cellules disponibles, car les

cellules $CD271^+$ ne représentent que 2 % de la population des CMN que nous avons utilisée. Cette approche pourrait alors limiter la réalisation de certaines expériences.

À la différence des CSM, les CSH de la moelle osseuse sont mieux caractérisées phénotypiquement, ce qui permet de les isoler afin de tester leur potentiel de reconstitution hématopoïétique. Chez l'homme le marqueur de surface le plus utilisé pour la purification des CSH est l'antigène CD34 qui est exprimé par 0,5 à 5 % des cellules de la moelle osseuse humaine. Au cours de la différenciation, les cellules répriment l'expression de cette molécule (Civin *et al.,* 1984). Ainsi, la population de CSH peut-être caractérisée par l'absence d'expression de l'antigène CD38 (Terstappen *et al.,* 1991), population qui comporte un nombre plus important de cellules aptes à la reconstitution de l'hématopoïèse à long terme (Bhatia *et al.*, 1997; Glimm *et al.*, 2001) que la population $CD34^+$ $CD38^{low}$. L'absence d'expression des antigènes de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (HLA-DR) (Srour *et al.,* 1991) et des marqueurs de différenciation tels que le CD33 (marqueur myéloïde) ou le CD19 (marqueur lympoïde B) peut aussi servir à identifier la population de CSH, tout comme l'expression du CD90 (Thy-1) (Baum *et al.,* 1992), du CD109 (Murray *et al.,* 1999), du KDR (Ziegler *et al.,* 1999) ou du CD133 (Yin *et al.,* 1997). La difficulté d'utiliser ces sous-populations cellulaires purifiées est leur faible nombre rendant problématique la réalisation de techniques comme les tests de migration *in vitro* nécessitant un comptage cellulaire. C'est pourquoi nous avons utilisé dans notre travail des cellules CD34+ totales malgré le caractère relativement hétérogène de cette population.

Enfin il faut souligner que la capacité de soutien de l'hématopoïèse analysée *in vitro* au cours de cette thèse n'est qu'une approche de la fonctionnalité hématopoïétique que peuvent avoir les CSM *in vivo*. La sélection des CSM réalisée via leur attachement au plastique ne correspond pas à des conditions réellement physiologiques. Le modèle de la niche supporté par les CSM établies sous la forme d'une couche monocellulaire de cellules adhérentes n'a qu'un rapport lointain avec la niche *in vivo* qui doit se concevoir en 3 dimensions. Moyennant ces restrictions, cette étude *in vitro* nous a permis d'avoir une première approche sur la capacité de soutien de l'hématopoïèse des CSM non différenciées ou différenciées dans les voies A, O ou V. Son intérêt est de permettre d'évaluer de façon spécifique le compartiment des CSM en évitant l'interférence avec d'autres types cellulaires. Afin de confirmer nos résultats, il serait important de travailler sur un modèle animal, pour confirmer les modifications du soutien de l'hématopoïèse au cours de la différenciation des CSM.

La migration des CSH est un phénomène physiologique puisque au cours de l'ontogénèse, les CSH colonisent successivement l'AGM, le foie puis la moelle osseuse, ce phénomène persistant pendant toute la vie adulte. Le processus de mobilisation des CSH impliquent une modification des interactions nécessaires à leur ancrage dans la niche (décrits plus haut). Le clivage ou inactivation de ces molécules permet la sortie des CSH hors de la niche vers le sang périphérique. Ces phénomènes sont aussi probablement sous la dépendance de l'état fonctionnel des CSM qui composent la niche.

Au cours de ce travail nous avons mis au point des tests de migration *in vitro*, afin de comparer la capacité de migration de cellules $CD34^+$ au travers de CSM indifférenciées ou différenciées dans les voies A, O ou V. Nous constatons que, comme pour le soutien de l'hématopoïèse, la différenciation des CSM s'accompagne d'une diminution de la migration trans-stromale des cellules CD34+. Cependant un des résultats les plus intéressants est l'augmentation transitoire de la capacité de migration des $CD34^+$ au travers de CSM après 3 jours de différenciation vasculaire musculaire lisse. Ces données viennent corroborer les dernières études montrant que les cellules périvasculaires auraient un rôle important dans la niche hématopoïétique et dans la migration des CSH (Sugiyama *et al.*, 2006; Mendez-Ferrer *et al.*, 2010). Afin d'essayer de comprendre une telle différence une étude des MMP de type gelatinase (MMP-2 et MMP-9) présentes dans le surnageant des CSM plus ou moins différenciées a été réalisée. Comme mentionné plus haut, des travaux préliminaires du laboratoire ont démontré le rôle de la MMP-2 produite par les CSM au cours de la migration des PH. Sur cette base, nous avons regardé l'implication que la MMP-2 pourrait avoir au cours de la migration trans-stromale des CSH au travers de CSM différenciées dans les voies A, O et V. L'analyse en zymographie a montré une augmentation de la MMP-2 au cours de la différenciation ostéoblastique mais non au cours des différenciations A et V. L'inhibition de la MMP-2 a néanmoins révélé une forte diminution de la migration en particulier avec des CSM différenciées dans la voie V, montrant le rôle important de la MMP-2 dans cette migration Ce rôle pourrait être direct mais aussi indirect. Ainsi, si la MMP-2 est capable de dégrader le collagène de type I après activation à la surface cellulaire de la proMMP-2 (Nagase *et al.*, 2006), elle est également capable d'activer un grand nombre d'autres MMP dont la MMP-9 qui pourraient agir de façon propre (Fridman *et al.*, 1995).

Dans une deuxième partie du travail nous nous sommes intéréssés plus particulièrement à la migration des CD34+ et la modulation de celle–ci. L'administration *in vivo* de G-CSF est habituellement utilisée pour induire artificiellement la mobilisation des CSH du microenvironnement médullaire vers le sang périphérique dans l'optique de collecter un greffon hématopoïétique. On sait maintenant que le rôle du G-CSF dans cette mobilisation est essentiellement indirect en transformant la moelle osseuse en un microenvironnement à très forte activité protéolytique ayant pour conséquence le clivage ou l'inactivation de VLA4/VCAM-1, de SCF/c-Kit ou le SDF-1/CXCR4. La responsabilité de protéases comme l'élastase, la cathepsine G ou certaines métalloprotéases est actuellement établie (Levesque *et al.*, 2001; Heissig *et al.*, 2002; Levesque *et al.*, 2002). Cependant ces médiateurs sont essentiellement produits par des cellules qui n'appartiennent pas vraiment à la niche hématopoïétique comme les polynucléaires neutrophiles et les macrophages. Pour expliquer la mobilisation spécifique des CSH hors de la niche, il est raisonnable de penser que ce sont les cellules formant cette niche qui pourraient être impliquées dans cette mobilisation notamment par la production de protéases. Cet aspect n'étant pas bien connu, nous nous sommes intéressés au rôle des CSM dans la mobilisation des CSH hors de la niche hématopoïétique, en particulier à l'effet du G-CSF sur les CSM.

Nous avons développé un modèle *in vitro* de migration trans-stromale des PH. A la différence des modèles de mobilisation *in vivo* où l'administration de G-CSF va agir sur un grand nombre de cellules non identifiées, l'utilisation de ce modèle *in vitro* nous a permis d'étudier spécifiquement l'effet du G-CSF sur le composant principal de la niche hématopoïétique, les CSM. Ainsi, nous avons montré que le pré-traitement des CSM par le G-CSF augmente la migration trans-stromale des cellules CD34+ contrairement à l'IL-1β.

Pour la première fois à notre connaissance, nous rapportons que le récepteur au G-CSF (G-CSFR) est exprimé au niveau des membranes des CSM. Son expression a pu être éteinte par une technique d'ARN interférence ce qui a entrainé une diminution nette de la migration trans-stromale des cellules CD34+ stimulée par le G-CSF. Ceci montre le rôle essentiel de la liaison du G-CSF à son récepteur au cours de la migration des progéniteurs hématopoïétiques. Ces résultats fonctionnels confirment la présence et la fonctionnalité du G-CSFR sur les membranes des CSM lors d'une stimulation par le G-CSF, Des précédentes études ont montré que les cellules exprimant le G-CSFR étaient indispensables à la mobilisation *in vivo* des progéniteurs hématopoïétiques induite par le G-CSF. Lors de ces études les auteurs

supposaient que ces cellules pourraient être des cellules accessoires comme les polynucléaires neutrophiles qui agiraient « en trans » puisqu'il ne semblait pas nécessaire que le G-CSFR soit exprimé sur les progéniteurs hématopoïétiques ou les cellules stromales (Liu *et al.*, 2000a). Cependant, avec les résultats que nous avons obtenus, nous montrons que les cellules stromales (CSM) expriment le G-CSFR et qu'elles sont indispensables à la mobilisation des CSH/PH hors de la niche a priori dépourvue de polynucléaires neutrophiles.

L'ensemble de nos résultats montre que le G-CSF exerce un effet direct sur les CSM dans le processus de mobilisation *in vitro* des CSH. Celui-ci agit sur les CSM en augmentant l'expression de la pro-MMP-2 et en induisant l'activation membranaire de MMP-2 alors que la MMP-9 n'apparaît pas impliquée. Il est probable que d'autres molécules interviennent dans cette migration puisque son inhibition avec l'anticorps anti-MMP-2 n'était que partielle. Ce mécanisme impliquant MMP-2 serait essentiel à la libération des CSH hors de la niche en induisant la protéolyse de la matrice extracellulaire (collagènes, fibronectine) mais aussi en dégradant le SDF-1 (comme les MMP-1, -3, -9, -13 et -14). La SDF-1 ainsi dégradé ne pourrait plus se lier à son récepteur CXCR-4 au sein de la niche hématopoïétique, les CSH libérées de leur ancrage à la matrice extracellulaire pourront alors migrer vers le sang périphérique. Le mécanisme d'activation de la MMP-2 par le G-CSF reste encore à élucider. Il est possible que cette activation qui a lieu à la surface de la cellule passe par l'intermédiaire de la MT1-MMP, dont le G-CSF pourrait favoriser, par exemple, la dimérisation. Une telle activation a déjà été décrite à la surface de myofibroblastes cardiaques (Riches et al., J Mol Cell Cardiol 2009). De façon intéressante, des travaux récemment publiés indiquent que le G-CSF induit l'activation de MMP-2 via MT1-MMP mais seulement en présence de cellules stromales (Shirvaikar et al., 2010) ce qui entraîne une augmentation de la migration trans-matricielle des cellules CD34+. Nos résultats pourraient expliquer ce phénomène en montrant le rôle important des CSM comme source principale de MMP-2 activable par la MT1-MMP membranaire. La MT1-MMP pourrait provenir des cellules CD34+ ou des CSM elles-mêmes comme nous venons de le montrer. Il serait certainement utile de compléter ce travail par des études moléculaires explorant l'activation des voies de signalisations impliquées dans l'engagement du G-CSFR (voies Stat3 ou Stat5 par exemple) ainsi que la redistribution membranaire de la MT1-MMP (par microscopie confocale).

Le travail réalisé au cours de cette thèse a été réalisé dans des conditions physiologiques d'hématopoïèse normale. Sur la base de nos résultats, il serait maintenant particulièrement intéressant de transposer ce travail à l'étude de l'hématopoïèse leucémique. On pourrait étudier

l'impact du microenvironnement sur les leucoblastes de leucémies aiguës myéloïdes (LAM) et inversement la modification induite par les cellules leucémiques sur les CSM et plus précisément sur leurs fonctionalité, leur différenciation ainsi que leur prolifération. Pour cela, des co-cultures de cellules leucémiques en lignée ou de leucoblastes issus de patients de LAM pourraient être réalisées avec des CSM plus ou moins différenciées.

En conclusion, les CSM seraient à l'origine d'une niche hématopoïétique unique permettant de réguler la balance entre l'autorenouvellement et la différenciation des CSH. D'après nos résulats, au sein de cette niche, la capacité de soutien de l'hématopoïèse des CSM est optimale lorsque les CSM sont dans un état indifférencié. Les CSM différenciées en ostéoblastes, en adipocytes ou en cellules vasculaires musculaires lisses n'ont pas cette capacité de régulation de l'hématopoïèse comme cela est également démontré dans la littérature (Kiel and Morrison, 2008; Lymperi *et al.*, 2008). La nature des cellules stromales de la niche seraient donc des CSM non différenciées dont l'origine péri-vasculaire vient d'être prouvée (Sacchetti *et al.*, 2007; Mendez-Ferrer *et al.*, 2010). Leur fonction hématopoïétique inclut la régulation de la migration des CSH. Nous avons montré que les CSM avaient un rôle clé dans la mobilisation des CSH hors de la niche par un mécanisme dépendant de MMP-2 notamment sous l'effet du G-CSF.

Références Bibliographiques

Abedin, M., Y. Tintut, et al. (2004). "Mesenchymal stem cells and the artery wall." Circ Res **95**(7): 671-6.

Abkowitz, J. L., A. E. Robinson, et al. (2003). "Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure." Blood **102**(4): 1249-53.

Adams, G. B., K. T. Chabner, et al. (2006). "Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor." Nature **439**(7076): 599-603.

Adams, G. B. and D. T. Scadden (2006). "The hematopoietic stem cell in its place." Nat Immunol **7**(4): 333-7.

Aiuti, A., I. J. Webb, et al. (1997). "The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood." J Exp Med **185**(1): 111-20.

Allan, J. A., A. J. Docherty, et al. (1995). "Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components." Biochem J **309 (Pt 1)**: 299-306.

Almeida-Porada, G. and J. L. Ascensao (1996). "Isolation, characterization, and biologic features of bone marrow endothelial cells." J Lab Clin Med **128**(4): 399-407.

Alsalameh, S., R. Amin, et al. (2004). "Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage." Arthritis Rheum **50**(5): 1522-32.

Amit, M., M. K. Carpenter, et al. (2000). "Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture." Dev Biol **227**(2): 271-8.

Andrews, R. G., J. W. Singer, et al. (1986). "Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors." Blood **67**(3): 842-5.

Andrews, R. G., J. W. Singer, et al. (1989). "Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties." J Exp Med **169**(5): 1721-31.

Ara, T., K. Tokoyoda, et al. (2003). "Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny." Immunity **19**(2): 257-67.

Arai, F., A. Hirao, et al. (2004). "Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche." Cell **118**(2): 149-61.

Arroyo, A. G., D. Taverna, et al. (2000). "In vivo roles of integrins during leukocyte development and traffic: insights from the analysis of mice chimeric for alpha 5, alpha v, and alpha 4 integrins." J Immunol **165**(8): 4667-75.

Asosingh, K., W. Renmans, et al. (1998). "Circulating CD34+ cells in cord blood and mobilized blood have a different profile of adhesion molecules than bone marrow CD34+ cells." Eur J Haematol **60**(3): 153-60.

Avanzi, G. C., P. Lista, et al. (1988). "Selective growth response to IL-3 of a human leukaemic cell line with megakaryoblastic features." Br J Haematol **69**(3): 359-66.

Avecilla, S. T., K. Hattori, et al. (2004). "Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis." Nat Med **10**(1): 64-71.

Avigdor, A., P. Goichberg, et al. (2004). "CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow." Blood **103**(8): 2981-9.

Baggiolini, M., B. Dewald, et al. (1997). "Human chemokines: an update." Annu Rev Immunol **15**: 675-705.

Bajetto, A., R. Bonavia, et al. (2002). "Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications." J Neurochem **82**(6): 1311-29.

Balabanian, K., B. Lagane, et al. (2005). "The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes." J Biol Chem **280**(42): 35760-6.

Barker, J. E. (1994). "Sl/Sld hematopoietic progenitors are deficient in situ." Exp Hematol **22**(2): 174-7.

Baum, C. M., I. L. Weissman, et al. (1992). "Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(7): 2804-8.

Bellucci, R., M. S. De Propris, et al. (1999). "Modulation of VLA-4 and L-selectin expression on normal CD34+ cells during mobilization with G-CSF." Bone Marrow Transplant **23**(1): 1-8.

Benboubker, L., C. Binet, et al. (2002). "Frequency and differentiation capacity of circulating LTC-IC mobilized by G-CSF or GM-CSF following chemotherapy: a comparison with steady-state bone marrow and peripheral blood." Exp Hematol **30**(1): 74-81.

Bennett, J. H., C. J. Joyner, et al. (1991). "Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential." J Cell Sci **99 (Pt 1)**: 131-9.

Bensinger, W., F. Appelbaum, et al. (1995). "Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells." J Clin Oncol **13**(10): 2547-55.

Berenson, R. J., R. G. Andrews, et al. (1988). "Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons." J Clin Invest **81**(3): 951-5.

Bernstein, A., L. Forrester, et al. (1991). "The murine W/c-kit and Steel loci and the control of hematopoiesis." Semin Hematol **28**(2): 138-42.

Bhardwaj, G., B. Murdoch, et al. (2001). "Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation." Nat Immunol **2**(2): 172-80.

Bhatia, M., J. C. Wang, et al. (1997). "Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5320-5.

Bianchi, G., A. Banfi, et al. (2003). "Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2." Exp Cell Res **287**(1): 98-105.

Bianco, P., M. Riminucci, et al. (1999). "Multipotential cells in the bone marrow stroma: regulation in the context of organ physiology." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **9**(2): 159-73.

Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.

Bjorklund, M. and E. Koivunen (2005). "Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells." Biochim Biophys Acta **1755**(1): 37-69.

Bleul, C. C., M. Farzan, et al. (1996). "The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry." Nature **382**(6594): 829-33.

Bodine, D. M., N. E. Seidel, et al. (1996). "Bone marrow collected 14 days after in vivo administration of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor to mice has 10-fold more repopulating ability than untreated bone marrow." Blood **88**(1): 89-97.

Bodine, D. M., N. E. Seidel, et al. (1993). "In vivo administration of stem cell factor to mice increases the absolute number of pluripotent hematopoietic stem cells." Blood **82**(2): 445-55.

Bonig, H., A. Wundes, et al. (2008). "Increased numbers of circulating hematopoietic stem/progenitor cells are chronically maintained in patients treated with the CD49d blocking antibody natalizumab." Blood **111**(7): 3439-41.

Borzillo, G. V., R. A. Ashmun, et al. (1990). "Macrophage lineage switching of murine early pre-B lymphoid cells expressing transduced fms genes." Mol Cell Biol **10**(6): 2703-14.

Boyer, L. A., T. I. Lee, et al. (2005). "Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells." Cell **122**(6): 947-56.

Bradley, T. R., G. S. Hodgson, et al. (1980). Characteristic of primitive macrophage progenitor cells with high proliferative potential : their relationship to cells with marrow repopulating ability in 5-fluorouracil treated mouse bone marrow. Experimental Hematology Today. G. D. L. S.G. Baum, D.W. Van Bekkum. New York, Karger**:** 284.

Brandt, J., N. Baird, et al. (1988). "Characterization of a human hematopoietic progenitor cell capable of forming blast cell containing colonies in vitro." J Clin Invest **82**(3): 1017-27.

Brasel, K., H. J. McKenna, et al. (1997). "Flt3 ligand synergizes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or granulocyte colony-stimulating factor to mobilize hematopoietic progenitor cells into the peripheral blood of mice." Blood **90**(9): 3781-8.

Breems, D. A., E. A. Blokland, et al. (1994). "Frequency analysis of human primitive haematopoietic stem cell subsets using a cobblestone area forming cell assay." Leukemia **8**(7): 1095-104.

Broxmeyer, H. E., C. M. Orschell, et al. (2005). "Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist." J Exp Med **201**(8): 1307-18.

Bryon, P. A. (1998). Anatomie et histologie de la moelle osseuse. Encycl Méd Chir. Elsevier. Paris. **Hématologie, 13-000-M-80:** 10 p.

Buhring, H. J., V. L. Battula, et al. (2007). "Novel markers for the prospective isolation of human MSC." Ann N Y Acad Sci **1106**: 262-71.

Burckardt, R. (1971). Atlas d'histopathologie de la moelle osseuse et de l'os. Masson. Paris.

Burns, J. M., B. C. Summers, et al. (2006). "A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development." J Exp Med **203**(9): 2201-13.

Calvi, L. M., G. B. Adams, et al. (2003). "Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche." Nature **425**(6960): 841-6.

Campbell, C., R. M. Risueno, et al. (2008). "Signal control of hematopoietic stem cell fate: Wnt, Notch, and Hedgehog as the usual suspects." Curr Opin Hematol **15**(4): 319-25.

Caplan, A. I. (1991). "Mesenchymal stem cells." J Orthop Res **9**(5): 641-50.

Cardier, J. E. and E. Barbera-Guillem (1997). "Extramedullary hematopoiesis in the adult mouse liver is associated with specific hepatic sinusoidal endothelial cells." Hepatology **26**(1): 165-75.

Carion, A., L. Benboubker, et al. (2003). "Stromal-derived factor 1 and matrix metalloproteinase 9 levels in bone marrow and peripheral blood of patients mobilized by granulocyte colony-stimulating factor and chemotherapy. Relationship with mobilizing capacity of haematopoietic progenitor cells." Br J Haematol **122**(6): 918-26.

Carion, A., J. Domenech, et al. (2002). "Decreased stroma adhesion capacity of CD34+ progenitor cells from mobilized peripheral blood is not lineage- or stage-specific and is associated with low beta 1 and beta 2 integrin expression." J Hematother Stem Cell Res **11**(3): 491-500.

Carstanjen, D., N. Ulbricht, et al. (2002). "Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is elevated during mobilization of peripheral blood progenitor cells by G-CSF." Transfusion **42**(5): 588-96.

Chambers, I., D. Colby, et al. (2003). "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." Cell **113**(5): 643-55.

Charbord, P. (1998). "Le micro-environnement médullaire chez l'homme normal et pathologique." Hématologie **4**: 29-40.

Charbord, P., E. Tamayo, et al. (1999). "The Hematopoietic Microenvironment: Phenotypic and Functional Characterization of Human Marrow Vascular Stromal Cells." Hematol **4**(3): 257-282.

Chitteti, B. R., Y. H. Cheng, et al. (2010). "Impact of interactions of cellular components of the bone marrow microenvironment on hematopoietic stem and progenitor cell function." Blood **115**(16): 3239-48.

Choi, K. (1998). "Hemangioblast development and regulation." Biochem Cell Biol **76**(6): 947-56.

Christopherson, K. W., 2nd, S. Cooper, et al. (2003a). "Cell surface peptidase CD26/DPPIV mediates G-CSF mobilization of mouse progenitor cells." Blood **101**(12): 4680-6.

Christopherson, K. W., 2nd, G. Hangoc, et al. (2002). "Cell surface peptidase CD26/dipeptidylpeptidase IV regulates CXCL12/stromal cell-derived factor-1 alpha-mediated chemotaxis of human cord blood CD34+ progenitor cells." J Immunol **169**(12): 7000-8.

Christopherson, K. W., 2nd, S. E. Uralil, et al. (2006). "G-CSF- and GM-CSF-induced upregulation of CD26 peptidase downregulates the functional chemotactic response of CD34+CD38- human cord blood hematopoietic cells." Exp Hematol **34**(8): 1060-8.

Christopherson, K. W., S. Cooper, et al. (2003b). "CD26 is essential for normal G-CSF-induced progenitor cell mobilization as determined by CD26-/- mice." Exp Hematol **31**(11): 1126-34.

Cicuttini, F. M., M. Martin, et al. (1992). "Support of human cord blood progenitor cells on human stromal cell lines transformed by SV40 large T antigen under the influence of an inducible (metallothionein) promoter." Blood **80**(1): 102-12.

Civin, C. I., L. C. Strauss, et al. (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**(1): 157-65.

Civin, C. I., L. C. Strauss, et al. (1990). "Positive stem cell selection--basic science." Prog Clin Biol Res **333**: 387-401; discussion 402.

Codony-Servat, J., J. Albanell, et al. (1999). "Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells." Cancer Res **59**(6): 1196-201.

Colter, D. C., R. Class, et al. (2000). "Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3213-8.

Colter, D. C., I. Sekiya, et al. (2001). "Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(14): 7841-5.

Cornelius, L. A., L. C. Nehring, et al. (1998). "Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization." J Immunol **161**(12): 6845-52.

Corre, J., V. Planat-Benard, et al. (2004). "Human bone marrow adipocytes support complete myeloid and lymphoid differentiation from human CD34 cells." Br J Haematol **127**(3): 344-7.

Coulombel, L., A. C. Eaves, et al. (1983). "Enzymatic treatment of long-term human marrow cultures reveals the preferential location of primitive hemopoietic progenitors in the adherent layer." Blood **62**(2): 291-7.

Crisan, M., S. Yap, et al. (2008). "A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs." Cell Stem Cell **3**(3): 301-13.

Cuevas, P., F. Carceller, et al. (2004). "Bone marrow stromal cell implantation for peripheral nerve repair." Neurol Res **26**(2): 230-2.

Cui, L., V. Ramsfjell, et al. (1997). "Thrombopoietin promotes adhesion of primitive human hemopoietic cells to fibronectin and vascular cell adhesion molecule-1: role of activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5." J Immunol **159**(4): 1961-9.

Cynshi, O., K. Satoh, et al. (1991). "Reduced response to granulocyte colony-stimulating factor in W/Wv and Sl/Sld mice." Leukemia **5**(1): 75-7.

D'Arena, G., P. Musto, et al. (1998). "Predictive parameters for mobilized peripheral blood CD34+ progenitor cell collection in patients with hematological malignancies." Am J Hematol **58**(4): 255-62.

Dave, B., T. Watanabe, et al. (2000). "Growth factor mobilization and modulation of progenitor cell adhesion to stromal cells: role of VLA-4." J Hematother Stem Cell Res **9**(4): 507-15.

De Bari, C., F. Dell'Accio, et al. (2001). "Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane." Arthritis Rheum **44**(8): 1928-42.

de Haan, G., E. Weersing, et al. (2003). "In vitro generation of long-term repopulating hematopoietic stem cells by fibroblast growth factor-1." Dev Cell **4**(2): 241-51.

Delgado, M. B., I. Clark-Lewis, et al. (2001). "Rapid inactivation of stromal cell-derived factor-1 by cathepsin G associated with lymphocytes." Eur J Immunol **31**(3): 699-707.

Delorme, B., E. Nivet, et al. (2009). "The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties." Stem Cells Dev **19**(6): 853-66.

Dennis, J. E. and P. Charbord (2002). "Origin and differentiation of human and murine stroma." Stem Cells **20**(3): 205-14.

Deryugina, E. I., B. Ratnikov, et al. (2001). "MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin alphavbeta3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells." Exp Cell Res **263**(2): 209-23.

Dexter, T. M., T. D. Allen, et al. (1977). "Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro." J Cell Physiol **91**(3): 335-44.

Dexter, T. M. and M. A. Moore (1977). "In vitro duplication and "cure" of haemopoietic defects in genetically anaemic mice." Nature **269**(5627): 412-4.

Dicker, A., K. Le Blanc, et al. (2005). "Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue." Exp Cell Res **308**(2): 283-90.

Donnelly, D. S., D. Zelterman, et al. (1999). "Functional activity of murine CD34+ and CD34- hematopoietic stem cell populations." Exp Hematol **27**(5): 788-96.

Driessen, R. L., H. M. Johnston, et al. (2003). "Membrane-bound stem cell factor is a key regulator in the initial lodgment of stem cells within the endosteal marrow region." Exp Hematol **31**(12): 1284-91.

Duband, J. L., G. H. Nuckolls, et al. (1988). "Fibronectin receptor exhibits high lateral mobility in embryonic locomoting cells but is immobile in focal contacts and fibrillar streaks in stationary cells." J Cell Biol **107**(4): 1385-96.

Dyer, M. A., S. M. Farrington, et al. (2001). "Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo." Development **128**(10): 1717-30.

Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." Nat Rev Cancer **2**(3): 161-74.

English, W. R., X. S. Puente, et al. (2000). "Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2." J Biol Chem **275**(19): 14046-55.

Enver, T., C. M. Heyworth, et al. (1998). "Do stem cells play dice?" Blood **92**(2): 348-51; discussion 352.

Fibbe, W. E., J. F. Pruijt, et al. (1999). "Biology of IL-8-induced stem cell mobilization." Ann N Y Acad Sci **872**: 71-82.

Fillmore, H. L., T. E. VanMeter, et al. (2001). "Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion." J Neurooncol **53**(2): 187-202.

Fleming, W. H., E. J. Alpern, et al. (1993). "Functional heterogeneity is associated with the cell cycle status of murine hematopoietic stem cells." J Cell Biol **122**(4): 897-902.

Flomenberg, N., S. M. Devine, et al. (2005). "The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone." Blood **106**(5): 1867-74.

Foudi, A., P. Jarrier, et al. (2006). "Reduced retention of radioprotective hematopoietic cells within the bone marrow microenvironment in CXCR4-/- chimeric mice." Blood **107**(6): 2243-51.

Fraser, J. R., T. C. Laurent, et al. (1997). "Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover." J Intern Med **242**(1): 27-33.

Freedman, A. S., J. M. Munro, et al. (1990). "Adhesion of human B cells to germinal centers in vitro involves VLA-4 and INCAM-110." Science **249**(4972): 1030-3.

Frenette, P. S., T. N. Mayadas, et al. (1996). "Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins." Cell **84**(4): 563-74.

Frenette, P. S., S. Subbarao, et al. (1998). "Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14423-8.

Fridman, R., M. Toth, et al. (1995). "Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2)." Cancer Res **55**(12): 2548-55.

Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhjan, et al. (1970). "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells." Cell Tissue Kinet **3**(4): 393-403.

Friedenstein, A. J., J. F. Gorskaja, et al. (1976). "Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs." Exp Hematol **4**(5): 267-74.

Fruehauf, S., M. R. Veldwijk, et al. (1998). "Delineation of cell cycle state and correlation to adhesion molecule expression of human CD34+ cells from steady-state bone marrow and peripheral blood mobilized following G-CSF-supported chemotherapy." Stem Cells **16**(4): 271-9.

Fu, S. and J. Liesveld (2000). "Mobilization of hematopoietic stem cells." Blood Rev **14**(4): 205-18.

Fu, X., W. C. Parks, et al. (2008). "Activation and silencing of matrix metalloproteinases." Semin Cell Dev Biol **19**(1): 2-13.

Funk, P. E., P. W. Kincade, et al. (1994). "Native associations of early hematopoietic stem cells and stromal cells isolated in bone marrow cell aggregates." Blood **83**(2): 361-9.

Galmiche, M. C., V. E. Koteliansky, et al. (1993). "Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway." Blood **82**(1): 66-76.

Gartner, S. and H. S. Kaplan (1980). "Long-term culture of human bone marrow cells." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(8): 4756-9.

Gazitt, Y. (2001). "Recent developments in the regulation of peripheral blood stem cell mobilization and engraftment by cytokines, chemokines, and adhesion molecules." J Hematother Stem Cell Res **10**(2): 229-36.

Gazitt, Y., C. O. Freytes, et al. (1999). "Successful PBSC mobilization with high-dose G-CSF for patients failing a first round of mobilization." J Hematother **8**(2): 173-83.

Gazitt, Y. and Q. Liu (2000). "High steady-state plasma levels of flt3-ligand in the peripheral blood is a good predictor for poor mobilization of CD34+ PBSC in patients undergoing high-dose chemotherapy and stem cell rescue." J Hematother Stem Cell Res **9**(2): 285-93.

Gazitt, Y. and Q. Liu (2001). "Plasma levels of SDF-1 and expression of SDF-1 receptor on CD34+ cells in mobilized peripheral blood of non-Hodgkin's lymphoma patients." Stem Cells **19**(1): 37-45.

Ghaffari, S., G. J. Dougherty, et al. (1995). "Differentiation-associated changes in CD44 isoform expression during normal hematopoiesis and their alteration in chronic myeloid leukemia." Blood **86**(8): 2976-85.

Glimm, H., W. Eisterer, et al. (2001). "Previously undetected human hematopoietic cell populations with short-term repopulating activity selectively engraft NOD/SCID-beta2 microglobulin-null mice." J Clin Invest **107**(2): 199-206.

Gong, J. K. (1978). "Endosteal marrow: a rich source of hematopoietic stem cells." Science **199**(4336): 1443-5.

Goodell, M. A., K. Brose, et al. (1996). "Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo." J Exp Med **183**(4): 1797-806.

Gratwohl, A., J. Passweg, et al. (2002). "Economics, health care systems and utilization of haematopoietic stem cell transplants in Europe." Br J Haematol **117**(2): 451-68.

Greenberger, J. S. (1978). "Sensitivity of corticosteroid-dependent insulin-resistant lipogenesis in marrow preadipocytes of obese-diabetic (db/db) mice." Nature **275**(5682): 752-4.

Greenlee, K. J., Z. Werb, et al. (2007). "Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted." Physiol Rev **87**(1): 69-98.

Gu, Y., M. D. Filippi, et al. (2002). "The Highly Related Rho GTPases, Rac1 and Rac2, Separately Control Hematopoietic Cell Survival and Cycle Progression, but Together Regulate the Engraftment Phenotype." Blood **100**(11): 134a.

Gunji, Y., M. Nakamura, et al. (1992). "Expression and function of adhesion molecules on human hematopoietic stem cells: CD34+ LFA-1- cells are more primitive than CD34+ LFA-1+ cells." Blood **80**(2): 429-36.

Gupta, P., J. B. McCarthy, et al. (1996). "Stromal fibroblast heparan sulfate is required for cytokine-mediated ex vivo maintenance of human long-term culture-initiating cells." Blood **87**(8): 3229-36.

Hamilton, A. J. and D. C. Baulcombe (1999). "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants." Science **286**(5441): 950-2.

Hao, Q. L., A. J. Shah, et al. (1995). "A functional comparison of CD34 + CD38- cells in cord blood and bone marrow." Blood **86**(10): 3745-53.

Harrison, D. E., C. M. Astle, et al. (1978). "Loss of proliferative capacity in immunohemopoietic stem cells caused by serial transplantation rather than aging." J Exp Med **147**(5): 1526-31.

Hartsock, R. J., E. B. Smith, et al. (1965). "Normal variations with aging of the amount of hematopoietic tissue in bone marrow from the anterior iliac crest." Am J Clin Pathol **43**: 326-31.

Hattori, K., B. Heissig, et al. (2001). "Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells." Blood **97**(11): 3354-60.

Healy, L., G. May, et al. (1995). "The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(26): 12240-4.

Heissig, B., K. Hattori, et al. (2002). "Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand." Cell **109**(5): 625-37.

Hemann, M. T., J. S. Fridman, et al. (2003). "An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes in vivo." Nat Genet **33**(3): 396-400.

Hernandez-Barrantes, S., Y. Shimura, et al. (2001). "Differential roles of TIMP-4 and TIMP-2 in pro-MMP-2 activation by MT1-MMP." Biochem Biophys Res Commun **281**(1): 126-30.

Hess, D. A., T. E. Meyerrose, et al. (2004). "Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity." Blood **104**(6): 1648-55.

Hess, D. A., L. Wirthlin, et al. (2006). "Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells." Blood **107**(5): 2162-9.

Hidalgo, A., F. Sanz-Rodriguez, et al. (2001). "Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin- dependent adhesion to fibronectin and VCAM-1 on bone marrow hematopoietic progenitor cells." Exp Hematol **29**(3): 345-55.

Hiraoka, N., B. Petryniak, et al. (1999). "A novel, high endothelial venule-specific sulfotransferase expresses 6-sulfo sialyl Lewis(x), an L-selectin ligand displayed by CD34." Immunity **11**(1): 79-89.

Houshmand, P. and A. Zlotnik (2003). "Therapeutic applications in the chemokine superfamily." Curr Opin Chem Biol **7**(4): 457-60.

Hu, Y., L. Liao, et al. (2003). "Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas." J Lab Clin Med **141**(5): 342-9.

Huntly, B. J. and D. G. Gilliland (2005). "Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research." Nat Rev Cancer **5**(4): 311-21.

Hynes, R. O. (1992). "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion." Cell **69**(1): 11-25.

Imai, K., M. Kobayashi, et al. (1999). "Selective transendothelial migration of hematopoietic progenitor cells: a role in homing of progenitor cells." Blood **93**(1): 149-56.

Issaad, C., L. Croisille, et al. (1993). "A murine stromal cell line allows the proliferation of very primitive human CD34++/CD38- progenitor cells in long-term cultures and semisolid assays." Blood **81**(11): 2916-24.

Itoh, K., H. Tezuka, et al. (1989). "Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow." Exp Hematol **17**(2): 145-53.

Jackson, J. D., Y. Yan, et al. (1995). "Interleukin-12 enhances peripheral hematopoiesis in vivo." Blood **85**(9): 2371-6.

Jacobs, J. J., K. Kieboom, et al. (1999). "The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus." Nature **397**(6715): 164-8.

Jacobs, J. P., C. M. Jones, et al. (1970). "Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5." Nature **227**(5254): 168-70.

Jarocha, D., E. Lukasiewicz, et al. (2008). "Adventage of mesenchymal stem cells (MSC) expansion directly from purified bone marrow CD105+ and CD271+ cells." Folia Histochem Cytobiol **46**(3): 307-14.

Jazwiec, B., A. Solanilla, et al. (1998). "Endothelial cell support of hematopoiesis is differentially altered by IL-1 and glucocorticoids." Leukemia **12**(8): 1210-20.

Johansson, N., M. Ahonen, et al. (2000). "Matrix metalloproteinases in tumor invasion." Cell Mol Life Sci **57**(1): 5-15.

Johnson, G. R. and D. Metcalf (1977). "Pure and mixed erythroid colony formation in vitro stimulated by spleen conditioned medium with no detectable erythropoietin." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(9): 3879-82.

Jones, E. A., A. English, et al. (2004). "Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis." Arthritis Rheum **50**(3): 817-27.

Kajita, M., Y. Itoh, et al. (2001). "Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration." J Cell Biol **153**(5): 893-904.

Kalderon, D. (2000). "Transducing the hedgehog signal." Cell **103**(3): 371-4.

Kansas, G. S. (1996). "Selectins and their ligands: current concepts and controversies." Blood **88**(9): 3259-87.

Karanu, F. N., B. Murdoch, et al. (2000). "The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells." J Exp Med **192**(9): 1365-72.

Kastan, M. B., E. Schlaffer, et al. (1990). "Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells." Blood **75**(10): 1947-50.

Kaushansky, K. (2003). "Thrombopoietin: accumulating evidence for an important biological effect on the hematopoietic stem cell." Ann N Y Acad Sci **996**: 39-43.

Kawashima, I., E. D. Zanjani, et al. (1996). "CD34+ human marrow cells that express low levels of Kit protein are enriched for long-term marrow-engrafting cells." Blood **87**(10): 4136-42.

Kenney, A. M. and D. H. Rowitch (2000). "Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors." Mol Cell Biol **20**(23): 9055-67.

Kerst, J. M., J. B. Sanders, et al. (1993). "Alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 are differentially expressed during myelopoiesis and mediate the adherence of human CD34+ cells to fibronectin in an activation-dependent way." Blood **81**(2): 344-51.

Kiel, M. J. and S. J. Morrison (2006). "Maintaining hematopoietic stem cells in the vascular niche." Immunity **25**(6): 862-4.

Kiel, M. J. and S. J. Morrison (2008). "Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells." Nat Rev Immunol **8**(4): 290-301.

Kiel, M. J., G. L. Radice, et al. (2007). "Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance." Cell Stem Cell **1**(2): 204-17.

Kiel, M. J., O. H. Yilmaz, et al. (2005). "SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells." Cell **121**(7): 1109-21.

Kikuta, T., C. Shimazaki, et al. (2000). "Mobilization of hematopoietic primitive and committed progenitor cells into blood in mice by anti-vascular adhesion molecule-1 antibody alone or in combination with granulocyte colony-stimulating factor." Exp Hematol **28**(3): 311-7.

Kim, C. H. and H. E. Broxmeyer (1998). "In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment." Blood **91**(1): 100-10.

Kimura, S., A. W. Roberts, et al. (1998). "Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(3): 1195-200.

Kinashi, T. and T. A. Springer (1994). "Steel factor and c-kit regulate cell-matrix adhesion." Blood **83**(4): 1033-8.

Kinoshita, T., H. Sato, et al. (1998). "TIMP-2 promotes activation of progelatinase A by membrane-type 1 matrix metalloproteinase immobilized on agarose beads." J Biol Chem **273**(26): 16098-103.

Kobune, M., Y. Ito, et al. (2004). "Indian hedgehog gene transfer augments hematopoietic support of human stromal cells including NOD/SCID-beta2m-/- repopulating cells." Blood **104**(4): 1002-9.

Koenigsmann, M., J. D. Griffin, et al. (1992). "Myeloid and erythroid progenitor cells from normal bone marrow adhere to collagen type I." Blood **79**(3): 657-65.

Kollet, O., A. Dar, et al. (2006). "Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells." Nat Med **12**(6): 657-64.

Kopp, H. G., S. T. Avecilla, et al. (2005). "The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization." Physiology (Bethesda) **20**: 349-56.

Kovach, N. L., N. Lin, et al. (1995). "Stem cell factor modulates avidity of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrins expressed on hematopoietic cell lines." Blood **85**(1): 159-67.

Kroger, N., W. Zeller, et al. (1998). "Difference between expression of adhesion molecules on CD34+ cells from bone marrow and G-CSF-stimulated peripheral blood." Stem Cells **16**(1): 49-53.

Kronenwett, R., S. Martin, et al. (2000). "The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells." Stem Cells **18**(5): 320-30.

Kunkel, S. L. and N. Godessart (2002). "Chemokines in autoimmunity: from pathology to therapeutics." Autoimmun Rev **1**(6): 313-20.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.

Laharrague, P., B. Cousin, et al. (1999). "L'adipocyte médullaire : une cellule pleine d'avenir." m/s **15**(4): 504-9.

Lambeir, A. M., P. Proost, et al. (2001). "Kinetic investigation of chemokine truncation by CD26/dipeptidyl peptidase IV reveals a striking selectivity within the chemokine family." J Biol Chem **276**(32): 29839-45.

Lane, T. A., P. Law, et al. (1995). "Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation." Blood **85**(1): 275-82.

Laterveer, L., I. J. Lindley, et al. (1995). "Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability." Blood **85**(8): 2269-75.

Leahy, D. J., I. Aukhil, et al. (1996). "2.0 A crystal structure of a four-domain segment of human fibronectin encompassing the RGD loop and synergy region." Cell **84**(1): 155-64.

Leary, A. G., M. Ogawa, et al. (1984). "Single cell origin of multilineage colonies in culture. Evidence that differentiation of multipotent progenitors and restriction of proliferative potential of monopotent progenitors are stochastic processes." J Clin Invest **74**(6): 2193-7.

Leavesley, D. I., J. M. Oliver, et al. (1994). "Signals from platelet/endothelial cell adhesion molecule enhance the adhesive activity of the very late antigen-4 integrin of human CD34+ hemopoietic progenitor cells." J Immunol **153**(10): 4673-83.

Lemieux, M. E., V. I. Rebel, et al. (1995). "Characterization and purification of a primitive hematopoietic cell type in adult mouse marrow capable of lymphomyeloid differentiation in long-term marrow "switch" cultures." Blood **86**(4): 1339-47.

Lemischka, I. R., D. H. Raulet, et al. (1986). "Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells." Cell **45**(6): 917-27.

Lerat, H., J. C. Lissitzky, et al. (1993). "Role of stromal cells and macrophages in fibronectin biosynthesis and matrix assembly in human long-term marrow cultures." Blood **82**(5): 1480-92.

Lessard, J., S. Baban, et al. (1998). "Stage-specific expression of polycomb group genes in human bone marrow cells." Blood **91**(4): 1216-24.

Lessard, J. and G. Sauvageau (2003). "Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells." Nature **423**(6937): 255-60.

Lessard, J., A. Schumacher, et al. (1999). "Functional antagonism of the Polycomb-Group genes eed and Bmi1 in hemopoietic cell proliferation." Genes Dev **13**(20): 2691-703.

Levesque, J. P., D. N. Haylock, et al. (1996). "Cytokine regulation of proliferation and cell adhesion are correlated events in human CD34+ hemopoietic progenitors." Blood **88**(4): 1168-76.

Levesque, J. P., J. Hendy, et al. (2003a). "Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide." J Clin Invest **111**(2): 187-96.

Levesque, J. P., J. Hendy, et al. (2002). "Mobilization by either cyclophosphamide or granulocyte colony-stimulating factor transforms the bone marrow into a highly proteolytic environment." Exp Hematol **30**(5): 440-9.

Levesque, J. P., J. Hendy, et al. (2003b). "Granulocyte colony-stimulating factor induces the release in the bone marrow of proteases that cleave c-KIT receptor (CD117) from the surface of hematopoietic progenitor cells." Exp Hematol **31**(2): 109-17.

Levesque, J. P., D. I. Leavesley, et al. (1995). "Cytokines increase human hemopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins." J Exp Med **181**(5): 1805-15.

Levesque, J. P., F. Liu, et al. (2004). "Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice." Blood **104**(1): 65-72.

Levesque, J. P. and P. J. Simmons (1999). "Cytoskeleton and integrin-mediated adhesion signaling in human CD34+ hemopoietic progenitor cells." Exp Hematol **27**(4): 579-86.

Levesque, J. P., Y. Takamatsu, et al. (2001). "Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor." Blood **98**(5): 1289-97.

Lévesque, J. P., Y. Takamatsu, et al. (2001). "Rôle des intégrines et sélectines dans le développement et les régulations du système hématopoïétique." Hématologie **7**(2): 99-109.

Levesque, J. P., A. C. Zannettino, et al. (1999). "PSGL-1-mediated adhesion of human hematopoietic progenitors to P-selectin results in suppression of hematopoiesis." Immunity **11**(3): 369-78.

Levi, E., R. Fridman, et al. (1996). "Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(14): 7069-74.

Li, J., L. Sensebe, et al. (1995). "Nontransformed colony-derived stromal cell lines from normal human marrows. II. Phenotypic characterization and differentiation pathway." Exp Hematol **23**(2): 133-41.

Li, L., L. A. Milner, et al. (1998). "The human homolog of rat Jagged1 expressed by marrow stroma inhibits differentiation of 32D cells through interaction with Notch1." Immunity **8**(1): 43-55.

Li, L. and T. Xie (2005). "Stem cell niche: structure and function." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 605-31.

Li, W. M., W. Q. Huang, et al. (2000). "Positive and negative hematopoietic cytokines produced by bone marrow endothelial cells." Cytokine **12**(7): 1017-23.

Lichterfeld, M., S. Martin, et al. (2000). "Mobilization of CD34+ haematopoietic stem cells is associated with a functional inactivation of the integrin very late antigen 4." Br J Haematol **110**(1): 71-81.

Lichtman, M. A. (1981). "The ultrastructure of the hemopoietic environment of the marrow: a review." Exp Hematol **9**(4): 391-410.

Liechty, K. W., T. C. MacKenzie, et al. (2000). "Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep." Nat Med **6**(11): 1282-6.

Liesveld, J. L., J. M. Winslow, et al. (1991). "Adhesive interactions of normal and leukemic human CD34+ myeloid progenitors: role of marrow stromal, fibroblast, and cytomatrix components." Exp Hematol **19**(1): 63-70.

Liles, W. C., H. E. Broxmeyer, et al. (2003). "Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist." Blood **102**(8): 2728-30.

Lin, C. S., S. K. Lim, et al. (1996). "Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis." Genes Dev **10**(2): 154-64.

Liu, F., J. Poursine-Laurent, et al. (2000a). "Expression of the G-CSF receptor on hematopoietic progenitor cells is not required for their mobilization by G-CSF." Blood **95**(10): 3025-31.

Liu, Z., X. Zhou, et al. (2000b). "The serpin alpha1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo." Cell **102**(5): 647-55.

Lloyd, A. R., A. Biragyn, et al. (1995). "Granulocyte-colony stimulating factor and lipopolysaccharide regulate the expression of interleukin 8 receptors on polymorphonuclear leukocytes." J Biol Chem **270**(47): 28188-92.

Loeuillet, C., G. Bernard, et al. (2001). "Distinct hematopoietic support by two human stromal cell lines." Exp Hematol **29**(6): 736-45.

Long, M. W., R. Briddell, et al. (1992). "Human hematopoietic stem cell adherence to cytokines and matrix molecules." J Clin Invest **90**(1): 251-5.

Long, M. W. and V. M. Dixit (1990). "Thrombospondin functions as a cytoadhesion molecule for human hematopoietic progenitor cells." Blood **75**(12): 2311-8.

Lymperi, S., N. Horwood, et al. (2008). "Strontium can increase some osteoblasts without increasing hematopoietic stem cells." Blood **111**(3): 1173-81.

Ma, Q., D. Jones, et al. (1999). "The Chemokine Receptor CXCR4 Is Required for the Retention of B Lineage and Granulocytic Precursors within the Bone Marrow Microenvironment." Immunity **10**(4): 463-471.

Mackay, C. R. (2001). "Chemokines: immunology's high impact factors." Nat Immunol **2**(2): 95-101.

Maghazachi, A. A. and A. Al-Aoukaty (1998). "Chemokines activate natural killer cells through heterotrimeric G-proteins: implications for the treatment of AIDS and cancer." Faseb J **12**(11): 913-24.

Marchenko, N. D., G. N. Marchenko, et al. (2004). "Beta-catenin regulates the gene of MMP-26, a novel metalloproteinase expressed both in carcinomas and normal epithelial cells." Int J Biochem Cell Biol **36**(5): 942-56.

Martinez-Agosto, J. A., H. K. Mikkola, et al. (2007). "The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view." Genes Dev **21**(23): 3044-60.

Matsushima, K. and J. J. Oppenheim (1989). "Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF." Cytokine **1**(1): 2-13.

McArthur, G. A., L. R. Rohrschneider, et al. (1994). "Induced expression of c-fms in normal hematopoietic cells shows evidence for both conservation and lineage restriction of signal transduction in response to macrophage colony-stimulating factor." Blood **83**(4): 972-81.

McQuibban, G. A., G. S. Butler, et al. (2001). "Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1." J Biol Chem **276**(47): 43503-8.

Mendez-Ferrer, S., T. V. Michurina, et al. (2010). "Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche." Nature **466**(7308): 829-34.

Metcalf, D. (1991). "Lineage commitment of hemopoietic progenitor cells in developing blast cell colonies: influence of colony-stimulating factors." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(24): 11310-4.

Metcalf, D. (1998). "Lineage commitment and maturation in hematopoietic cells: the case for extrinsic regulation." Blood **92**(2): 345-7; discussion 352.

Minguell, J. J., A. Erices, et al. (2001). "Mesenchymal stem cells." Exp Biol Med (Maywood) **226**(6): 507-20.

Mitsui, K., Y. Tokuzawa, et al. (2003). "The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells." Cell **113**(5): 631-42.

Miyake, K., K. Medina, et al. (1991a). "A VCAM-like adhesion molecule on murine bone marrow stromal cells mediates binding of lymphocyte precursors in culture." J Cell Biol **114**(3): 557-65.

Miyake, K., I. L. Weissman, et al. (1991b). "Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis." J Exp Med **173**(3): 599-607.

Mohle, R., F. Bautz, et al. (1998). "The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1." Blood **91**(12): 4523-30.

Mohle, R., D. Green, et al. (1997a). "Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(2): 663-8.

Mohle, R., M. A. Moore, et al. (1997b). "Transendothelial migration of CD34+ and mature hematopoietic cells: an in vitro study using a human bone marrow endothelial cell line." Blood **89**(1): 72-80.

Mohle, R., S. Murea, et al. (1995). "Differential expression of L-selectin, VLA-4, and LFA-1 on CD34+ progenitor cells from bone marrow and peripheral blood during G-CSF-enhanced recovery." Exp Hematol **23**(14): 1535-42.

Molineux, G., C. McCrea, et al. (1997). "Flt-3 ligand synergizes with granulocyte colony-stimulating factor to increase neutrophil numbers and to mobilize peripheral blood stem cells with long-term repopulating potential." Blood **89**(11): 3998-4004.

Molineux, G., Z. Pojda, et al. (1990). "Transplantation potential of peripheral blood stem cells induced by granulocyte colony-stimulating factor." Blood **76**(10): 2153-8.

Moore, M. A. and D. Metcalf (1970). "Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo." Br J Haematol **18**(3): 279-96.

Morad, V., M. Pevsner-Fischer, et al. (2008). "The myelopoietic supportive capacity of mesenchymal stromal cells is uncoupled from multipotency and is influenced by lineage determination and interference with glycosylation." Stem Cells **26**(9): 2275-86.

Morikawa, S., Y. Mabuchi, et al. (2009). "Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow." J Exp Med **206**(11): 2483-96.

Morrison, S. J., N. Uchida, et al. (1995). "The biology of hematopoietic stem cells." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 35-71.

Morrison, S. J., D. E. Wright, et al. (1997). "Cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor induces hematopoietic stem cells to proliferate prior to mobilization." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 1908-13.

Muraglia, A., R. Cancedda, et al. (2000). "Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model." J Cell Sci **113 (Pt 7)**: 1161-6.

Murphy, P. M., M. Baggiolini, et al. (2000). "International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors." Pharmacol Rev **52**(1): 145-76.

Murray, L. J., E. Bruno, et al. (1999). "CD109 is expressed on a subpopulation of CD34+ cells enriched in hematopoietic stem and progenitor cells." Exp Hematol **27**(8): 1282-94.

Nagasawa, T., S. Hirota, et al. (1996a). "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1." Nature **382**(6592): 635-8.

Nagasawa, T., S. Hirota, et al. (1996b). "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1." Nature **382**(6592): 635-8.

Nagase, H., R. Visse, et al. (2006). "Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs." Cardiovasc Res **69**(3): 562-73.

Naiyer, A. J., D. Y. Jo, et al. (1999). "Stromal derived factor-1-induced chemokinesis of cord blood CD34(+) cells (long-term culture-initiating cells) through endothelial cells is mediated by E-selectin." Blood **94**(12): 4011-9.

Nakahata, T., A. J. Gross, et al. (1982). "A stochastic model of self-renewal and commitment to differentiation of the primitive hemopoietic stem cells in culture." J Cell Physiol **113**(3): 455-8.

Nakahata, T. and M. Ogawa (1982). "Identification in culture of a class of hemopoietic colony-forming units with extensive capability to self-renew and generate multipotential hemopoietic colonies." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(12): 3843-7.

Nakamura, Y., F. Arai, et al. (2010). "Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells." Blood **116**(9): 1422-32.

Nilsson, S. K., M. S. Dooner, et al. (1997). "Potential and distribution of transplanted hematopoietic stem cells in a nonablated mouse model." Blood **89**(11): 4013-20.

Nilsson, S. K., D. N. Haylock, et al. (2003). "Hyaluronan is synthesized by primitive hemopoietic cells, participates in their lodgment at the endosteum following transplantation, and is involved in the regulation of their proliferation and differentiation in vitro." Blood **101**(3): 856-62.

Nilsson, S. K., H. M. Johnston, et al. (2001). "Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches." Blood **97**(8): 2293-9.

Nilsson, S. K., H. M. Johnston, et al. (2005). "Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells." Blood **106**(4): 1232-9.

Noe, V., B. Fingleton, et al. (2001). "Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1." J Cell Sci **114**(Pt 1): 111-118.

Oberlin, E., A. Amara, et al. (1996). "The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1." Nature **382**(6594): 833-5.

Ogata, Y., J. J. Enghild, et al. (1992). "Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9." J Biol Chem **267**(6): 3581-4.

Oostendorp, R. A. and P. Dormer (1997). "VLA-4-mediated interactions between normal human hematopoietic progenitors and stromal cells." Leuk Lymphoma **24**(5-6): 423-35.

Oostendorp, R. A., G. Reisbach, et al. (1995). "VLA-4 and VCAM-1 are the principal adhesion molecules involved in the interaction between blast colony-forming cells and bone marrow stromal cells." Br J Haematol **91**(2): 275-84.

Osawa, M., K. Hanada, et al. (1996). "Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell." Science **273**(5272): 242-5.

Osborn, L., C. Hession, et al. (1989). "Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes." Cell **59**(6): 1203-11.

Oswald, J., S. Boxberger, et al. (2004). "Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro." Stem Cells **22**(3): 377-84.

Papayannopoulou, T. (2003). "Bone marrow homing: the players, the playfield, and their evolving roles." Curr Opin Hematol **10**(3): 214-9.

Papayannopoulou, T., C. Craddock, et al. (1995). "The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9647-51.

Papayannopoulou, T. and B. Nakamoto (1993). "Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA4 integrin." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(20): 9374-8.

Papayannopoulou, T., G. V. Priestley, et al. (1998). "Anti-VLA4/VCAM-1-induced mobilization requires cooperative signaling through the kit/mkit ligand pathway." Blood **91**(7): 2231-9.

Papayannopoulou, T., G. V. Priestley, et al. (2001a). "Molecular pathways in bone marrow homing: dominant role of alpha(4)beta(1) over beta(2)-integrins and selectins." Blood **98**(8): 2403-11.

Papayannopoulou, T., G. V. Priestley, et al. (2001b). "Synergistic mobilization of hemopoietic progenitor cells using concurrent beta1 and beta2 integrin blockade or beta2-deficient mice." Blood **97**(5): 1282-8.

Pardal, R., M. F. Clarke, et al. (2003). "Applying the principles of stem-cell biology to cancer." Nat Rev Cancer **3**(12): 895-902.

Park, I. K., D. Qian, et al. (2003). "Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells." Nature **423**(6937): 302-5.

Peault, B. and M. Tavian (2003). "Hematopoietic stem cell emergence in the human embryo and fetus." Ann N Y Acad Sci **996**: 132-40.

Pei, D., G. Majmudar, et al. (1994). "Hydrolytic inactivation of a breast carcinoma cell-derived serpin by human stromelysin-3." J Biol Chem **269**(41): 25849-55.

Peled, A., V. Grabovsky, et al. (1999). "The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow." J Clin Invest **104**(9): 1199-211.

Peled, A., O. Kollet, et al. (2000). "The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice." Blood **95**(11): 3289-96.

Pelus, L. M., H. Bian, et al. (2004). "Neutrophil-derived MMP-9 mediates synergistic mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells by the combination of G-CSF and the chemokines GRObeta/CXCL2 and GRObetaT/CXCL2delta4." Blood **103**(1): 110-9.

Pereira, R. F., K. W. Halford, et al. (1995). "Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(11): 4857-61.

Peschle, C., R. Botta, et al. (2001). "Purification and functional assay of pluripotent hematopoietic stem cells." Rev Clin Exp Hematol **5**(1): 3-14.

Petit, I., M. Szyper-Kravitz, et al. (2002). "G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4." Nat Immunol **3**(7): 687-94.

Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-7.

Ploemacher, R. E., J. P. van der Sluijs, et al. (1991). "Use of limiting-dilution type long-term marrow cultures in frequency analysis of marrow-repopulating and spleen colony-forming hematopoietic stem cells in the mouse." Blood **78**(10): 2527-33.

Ploemacher, R. E., J. P. van der Sluijs, et al. (1989). "An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse." Blood **74**(8): 2755-63.

Polakis, P. (2000). "Wnt signaling and cancer." Genes Dev **14**(15): 1837-51.

Polette, M., B. Nawrocki-Raby, et al. (2004). "Tumour invasion and matrix metalloproteinases." Crit Rev Oncol Hematol **49**(3): 179-86.

Ponomaryov, T., A. Peled, et al. (2000). "Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function." J Clin Invest **106**(11): 1331-9.

Potten, C. S. and M. Loeffler (1990). "Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt." Development **110**(4): 1001-20.

Pountos, I. and P. V. Giannoudis (2005). "Biology of mesenchymal stem cells." Injury **36 Suppl 3**: S8-S12.

Powell, W. C., B. Fingleton, et al. (1999). "The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis." Curr Biol **9**(24): 1441-7.

Prockop, D. J. (1997). "Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues." Science **276**(5309): 71-4.

Prosper, F., D. Stroncek, et al. (1998). "Mobilization and homing of peripheral blood progenitors is related to reversible downregulation of alpha4 beta1 integrin expression and function." J Clin Invest **101**(11): 2456-67.

Pruijt, J. F., W. E. Fibbe, et al. (1999a). "Prevention of interleukin-8-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by inhibitory antibodies against the metalloproteinase gelatinase B (MMP-9)." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(19): 10863-8.

Pruijt, J. F., Y. van Kooyk, et al. (1998). "Anti-LFA-1 blocking antibodies prevent mobilization of hematopoietic progenitor cells induced by interleukin-8." Blood **91**(11): 4099-105.

Pruijt, J. F., Y. van Kooyk, et al. (1999b). "Murine hematopoietic progenitor cells with colony-forming or radioprotective capacity lack expression of the beta 2-integrin LFA-1." Blood **93**(1): 107-12.

Pruijt, J. F., R. Willemze, et al. (1999c). "Mechanisms underlying hematopoietic stem cell mobilization induced by the CXC chemokine interleukin-8." Curr Opin Hematol **6**(3): 152-8.

Puch, S., S. Armeanu, et al. (2001). "N-cadherin is developmentally regulated and functionally involved in early hematopoietic cell differentiation." J Cell Sci **114**(Pt 8): 1567-77.

Puri, M. C. and A. Bernstein (2003). "Requirement for the TIE family of receptor tyrosine kinases in adult but not fetal hematopoiesis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(22): 12753-8.

Qi, H., D. J. Aguiar, et al. (2003). "Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3305-10.

Qian, H., N. Buza-Vidas, et al. (2007). "Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells." Cell Stem Cell **1**(6): 671-84.

Rafii, S., F. Shapiro, et al. (1995). "Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors." Blood **86**(9): 3353-63.

Ramos-DeSimone, N., E. Hahn-Dantona, et al. (1999). "Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion." J Biol Chem **274**(19): 13066-76.

Ramsfjell, V., O. J. Borge, et al. (1996). "Thrombopoietin, but not erythropoietin, directly stimulates multilineage growth of primitive murine bone marrow progenitor cells in synergy with early acting cytokines: distinct interactions with the ligands for c-kit and FLT3." Blood **88**(12): 4481-92.

Remy-Martin, J. P., A. Marandin, et al. (1999). "Vascular smooth muscle differentiation of murine stroma: a sequential model." Exp Hematol **27**(12): 1782-95.

Renstrom, J., M. Kroger, et al. (2009). "How the niche regulates hematopoietic stem cells." Chem Biol Interact **184**(1-2): 7-15.

Reya, T., A. W. Duncan, et al. (2003). "A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells." Nature **423**(6938): 409-14.

Rice, G. E. and M. P. Bevilacqua (1989). "An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion." Science **246**(4935): 1303-6.

Rice, G. E., J. M. Munro, et al. (1991). "Vascular and nonvascular expression of INCAM-110. A target for mononuclear leukocyte adhesion in normal and inflamed human tissues." Am J Pathol **138**(2): 385-93.

Richards, M., S. P. Tan, et al. (2004). "The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE." Stem Cells **22**(1): 51-64.

Riches, K., M. E. Morley, et al. (2009). "Chronic hypoxia inhibits MMP-2 activation and cellular invasion in human cardiac myofibroblasts." J Mol Cell Cardiol **47**(3): 391-9.

Roberts, A. W., C. Kim, et al. (1999). "Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense." Immunity **10**(2): 183-96.

Roberts, A. W. and D. Metcalf (1995). "Noncycling state of peripheral blood progenitor cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor and other cytokines." Blood **86**(4): 1600-5.

Robinson, S. N., V. M. Pisarev, et al. (2003). "Use of matrix metalloproteinase (MMP)-9 knockout mice demonstrates that MMP-9 activity is not absolutely required for G-CSF or Flt-3 ligand-induced hematopoietic progenitor cell mobilization or engraftment." Stem Cells **21**(4): 417-27.

Robledo, M. M., F. Sanz-Rodriguez, et al. (1998). "Differential use of very late antigen-4 and -5 integrins by hematopoietic precursors and myeloma cells to adhere to transforming growth factor-beta1-treated bone marrow stroma." J Biol Chem **273**(20): 12056-60.

Rochet, N., J. Dubousset, et al. (1999). "Establishment, characterisation and partial cytokine expression profile of a new human osteosarcoma cell line (CAL 72)." Int J Cancer **82**(2): 282-5.

Rodriguez-Frade, J. M., A. J. Vila-Coro, et al. (1999). "The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3628-33.

Roecklein, B. A. and B. Torok-Storb (1995). "Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes." Blood **85**(4): 997-1005.

Romanov, Y. A., V. A. Svintsitskaya, et al. (2003). "Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord." Stem Cells **21**(1): 105-10.

Rood, P. M., W. R. Gerritsen, et al. (1999). "Adhesion of hematopoietic progenitor cells to human bone marrow or umbilical vein derived endothelial cell lines: a comparison." Exp Hematol **27**(8): 1306-14.

Rosenfeld, C. S., B. Bolwell, et al. (1996). "Comparison of four cytokine regimens for mobilization of peripheral blood stem cells: IL-3 alone and combined with GM-CSF or G-CSF." Bone Marrow Transplant **17**(2): 179-83.

Rossbach, H. C., L. Krizanac-Bengez, et al. (1996). "An antibody to CD44 enhances hematopoiesis in long-term marrow cultures." Exp Hematol **24**(2): 221-7.

Rothlein, R., M. Czajkowski, et al. (1988). "Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines. Regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies." J Immunol **141**(5): 1665-9.

Rubinson, D. A., C. P. Dillon, et al. (2003). "A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference." Nat Genet **33**(3): 401-6.

Sacchetti, B., A. Funari, et al. (2007). "Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment." Cell **131**(2): 324-36.

Salingcarnboriboon, R., H. Yoshitake, et al. (2003). "Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property." Exp Cell Res **287**(2): 289-300.

Sato, T., J. H. Laver, et al. (1999). "Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells." Blood **94**(8): 2548-54.

Scherr, M., K. Battmer, et al. (2003). "Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA." Cell Cycle **2**(3): 251-7.

Schofield, K. P., M. J. Humphries, et al. (1998). "The effect of alpha4 beta1-integrin binding sequences of fibronectin on growth of cells from human hematopoietic progenitors." Blood **91**(9): 3230-8.

Schofield, K. P., G. Rushton, et al. (1997). "Influence of interleukin-3 and other growth factors on alpha4beta1 integrin-mediated adhesion and migration of human hematopoietic progenitor cells." Blood **90**(5): 1858-66.

Schofield, R. (1978). "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell." Blood Cells **4**(1-2): 7-25.

Schols, D., P. Proost, et al. (1998). "CD26-processed RANTES(3-68), but not intact RANTES, has potent anti-HIV-1 activity." Antiviral Res **39**(3): 175-87.

Schwartz, M. A., M. D. Schaller, et al. (1995). "Integrins: emerging paradigms of signal transduction." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 549-99.

Schweitzer, C. M., C. E. van der Schoot, et al. (1995). "Isolation and culture of human bone marrow endothelial cells." Exp Hematol **23**(1): 41-8.

Schweitzer, K. M., A. M. Drager, et al. (1996). "Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues." Am J Pathol **148**(1): 165-75.

Schweitzer, K. M., P. Vicart, et al. (1997). "Characterization of a newly established human bone marrow endothelial cell line: distinct adhesive properties for hematopoietic progenitors compared with human umbilical vein endothelial cells." Lab Invest **76**(1): 25-36.

Semerad, C. L., M. J. Christopher, et al. (2005). "G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow." Blood **106**(9): 3020-7.

Shen, H., T. Cheng, et al. (2001). "CXCR-4 desensitization is associated with tissue localization of hemopoietic progenitor cells." J Immunol **166**(8): 5027-33.

Shirozu, M., T. Nakano, et al. (1995). "Structure and chromosomal localization of the human stromal cell- derived factor 1 (SDF1) gene." Genomics **28**(3): 495-500.

Sieff, C., D. Bicknell, et al. (1982). "Changes in cell surface antigen expression during hemopoietic differentiation." Blood **60**(3): 703-13.

Simmons, P. J., G. W. Aylett, et al. (1994). "c-kit is expressed by primitive human hematopoietic cells that give rise to colony-forming cells in stroma-dependent or cytokine-supplemented culture." Exp Hematol **22**(2): 157-65.

Simmons, P. J., J. P. Levesque, et al. (1997). "Adhesion molecules in haemopoiesis." Baillieres Clin Haematol **10**(3): 485-505.

Simmons, P. J., B. Masinovsky, et al. (1992). "Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells." Blood **80**(2): 388-95.

Sitnicka, E., Q. R. Wang, et al. (1995). "Support versus inhibition of hematopoiesis by two characterized stromal cell types." Stem Cells **13**(6): 655-65.

Skillington, J., L. Choy, et al. (2002). "Bone morphogenetic protein and retinoic acid signaling cooperate to induce osteoblast differentiation of preadipocytes." J Cell Biol **159**(1): 135-46.

Smadja-Joffe, F., R. S. Charrad, et al. (1998). "CD44 et Hématopoïèse." Hématologie **4**(5): 339-49.

Solar, G. P., W. G. Kerr, et al. (1998). "Role of c-mpl in early hematopoiesis." Blood **92**(1): 4-10.

Spangrude, G. J., S. Heimfeld, et al. (1988). "Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells." Science **241**(4861): 58-62.

Sparrow, R. L. and N. Williams (1986). "The pattern of HLA-DR and HLA-DQ antigen expression on clonable subpopulations of human myeloid progenitor cells." Blood **67**(2): 379-84.

Spradling, A., D. Drummond-Barbosa, et al. (2001). "Stem cells find their niche." Nature **414**(6859): 98-104.

Springael, J. Y., E. Urizar, et al. (2005). "Dimerization of chemokine receptors and its functional consequences." Cytokine Growth Factor Rev **16**(6): 611-23.

Springer, T. A. (1994). "Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm." Cell **76**(2): 301-14.

Srour, E. F., J. E. Brandt, et al. (1991). "Human CD34+ HLA-DR- bone marrow cells contain progenitor cells capable of self-renewal, multilineage differentiation, and long-term in vitro hematopoiesis." Blood Cells **17**(2): 287-95.

Stier, S., Y. Ko, et al. (2005). "Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size." J Exp Med **201**(11): 1781-91.

Strongin, A. Y., I. Collier, et al. (1995). "Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease." J Biol Chem **270**(10): 5331-8.

Suda, T., F. Arai, et al. (2005). "Hematopoietic stem cells and their niche." Trends Immunol **26**(8): 426-33.

Suda, T., J. Suda, et al. (1984). "Disparate differentiation in mouse hemopoietic colonies derived from paired progenitors." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(8): 2520-4.

Suda, T., J. Suda, et al. (1985). "Permissive role of interleukin 3 (IL-3) in proliferation and differentiation of multipotential hemopoietic progenitors in culture." J Cell Physiol **124**(2): 182-90.

Sugiyama, T., H. Kohara, et al. (2006). "Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches." Immunity **25**(6): 977-88.

Sutherland, H. J., C. J. Eaves, et al. (1989). "Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro." Blood **74**(5): 1563-70.

Sweeney, E. A., H. Lortat-Jacob, et al. (2002). "Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem/progenitor cells." Blood **99**(1): 44-51.

Szilvassy, S. J., T. E. Meyerrose, et al. (2001). "Homing and engraftment defects in ex vivo expanded murine hematopoietic cells are associated with downregulation of beta1 integrin." Exp Hematol **29**(12): 1494-502.

Taichman, R., M. Reilly, et al. (2001). "Hepatocyte growth factor is secreted by osteoblasts and cooperatively permits the survival of haematopoietic progenitors." Br J Haematol **112**(2): 438-48.

Taichman, R. S. and S. G. Emerson (1994). "Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor." J Exp Med **179**(5): 1677-82.

Taichman, R. S. and S. G. Emerson (1998). "The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment." Stem Cells **16**(1): 7-15.

Taichman, R. S., M. J. Reilly, et al. (1996). "Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures." Blood **87**(2): 518-24.

Taipale, J. and P. A. Beachy (2001). "The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer." Nature **411**(6835): 349-54.

Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell **126**(4): 663-76.

Takamatsu, Y., P. J. Simmons, et al. (1998). "Dual control by divalent cations and mitogenic cytokines of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrin avidity expressed by human hemopoietic cells." Cell Adhes Commun **5**(5): 349-66.

Taranger, C. K., A. Noer, et al. (2005). "Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells." Mol Biol Cell **16**(12): 5719-35.

Tavassoli, M. and A. Friedenstein (1983). "Hemopoietic stromal microenvironment." Am J Hematol **15**(2): 195-203.

Tavassoli, M. and C. L. Hardy (1990). "Molecular basis of homing of intravenously transplanted stem cells to the marrow." Blood **76**(6): 1059-70.

Tavor, S., I. Petit, et al. (2004). "CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice." Cancer Res **64**(8): 2817-24.

Teixido, J., M. E. Hemler, et al. (1992). "Role of beta 1 and beta 2 integrins in the adhesion of human CD34hi stem cells to bone marrow stroma." J Clin Invest **90**(2): 358-67.

Terstappen, L. W., S. Huang, et al. (1991). "Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells." Blood **77**(6): 1218-27.

Thelen, M. and M. Baggiolini (2001). "Is dimerization of chemokine receptors functionally relevant?" Sci STKE **2001**(104): pe34.

Till, J. E. and E. A. Mac Culloch (1961). "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." Radiation Res **14**: 213.

Till, J. E., E. A. McCulloch, et al. (1964). "A Stochastic Model of Stem Cell Proliferation, Based on the Growth of Spleen Colony-Forming Cells." Proc Natl Acad Sci U S A **51**: 29-36.

Tiscornia, G., O. Singer, et al. (2003). "A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 1844-8.

To, L. B., D. N. Haylock, et al. (1997). "The biology and clinical uses of blood stem cells." Blood **89**(7): 2233-58.

Torok-Storb, B. (1988). "Cellular interactions." Blood **72**(2): 373-85.

Touw, I. and B. Lowenberg (1983). "No stimulative effect of adipocytes on hematopoiesis in long-term human bone marrow cultures." Blood **61**(4): 770-4.

Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.

Trounson, A. (2006). "The production and directed differentiation of human embryonic stem cells." Endocr Rev **27**(2): 208-19.

Trowbridge, J. J., M. P. Scott, et al. (2006). "Hedgehog modulates cell cycle regulators in stem cells to control hematopoietic regeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(38): 14134-9.

Tuli, R., S. Tuli, et al. (2003). "Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone." Stem Cells **21**(6): 681-93.

Tuschl, T., P. D. Zamore, et al. (1999). "Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro." Genes Dev **13**(24): 3191-7.

Twining, S. S. (1994). "Regulation of proteolytic activity in tissues." Crit Rev Biochem Mol Biol **29**(5): 315-83.

Uchida, N., D. He, et al. (1997). "The unexpected G0/G1 cell cycle status of mobilized hematopoietic stem cells from peripheral blood." Blood **89**(2): 465-72.

Ulyanova, T., L. M. Scott, et al. (2005). "VCAM-1 expression in adult hematopoietic and nonhematopoietic cells is controlled by tissue-inductive signals and reflects their developmental origin." Blood **106**(1): 86-94.

Valenzuela-Fernandez, A., T. Planchenault, et al. (2002). "Leukocyte elastase negatively regulates Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 binding and functions by amino-terminal processing of SDF- 1 and CXCR4." J Biol Chem **277**(18): 15677-89.

Valtieri, M., D. J. Tweardy, et al. (1987). "Cytokine-dependent granulocytic differentiation. Regulation of proliferative and differentiative responses in a murine progenitor cell line." J Immunol **138**(11): 3829-35.

van der Loo, J. C., X. Xiao, et al. (1998). "VLA-5 is expressed by mouse and human long-term repopulating hematopoietic cells and mediates adhesion to extracellular matrix protein fibronectin." J Clin Invest **102**(5): 1051-61.

van der Lugt, N. M., J. Domen, et al. (1994). "Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene." Genes Dev **8**(7): 757-69.

van Pel, M., R. van Os, et al. (2006). "Serpina1 is a potent inhibitor of IL-8-induced hematopoietic stem cell mobilization." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(5): 1469-74.

Van Wart, H. E. and H. Birkedal-Hansen (1990). "The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(14): 5578-82.

Van Zant, G. and E. Goldwasser (1977). "Simultaneous effects of erythropoietin and colony-stimulating factor on bone marrow cells." Science **198**(4318): 733-5.

Van Zant, G. and E. Goldwasser (1979). "Competition between erythropoietin and colony-stimulating factor for target cells in mouse marrow." Blood **53**(5): 946-65.

Varnum-Finney, B., L. Xu, et al. (2000). "Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling." Nat Med **6**(11): 1278-81.

Vecchi, M., L. A. Rudolph-Owen, et al. (1998). "Tyrosine phosphorylation and proteolysis. Pervanadate-induced, metalloprotease-dependent cleavage of the ErbB-4 receptor and amphiregulin." J Biol Chem **273**(32): 20589-95.

Velders, G. A., J. F. Pruijt, et al. (2002). "Enhancement of G-CSF-induced stem cell mobilization by antibodies against the beta 2 integrins LFA-1 and Mac-1." Blood **100**(1): 327-33.

Verfaillie, C. M. (1992). "Direct contact between human primitive hematopoietic progenitors and bone marrow stroma is not required for long-term in vitro hematopoiesis." Blood **79**(11): 2821-6.

Verfaillie, C. M. (2002). "Hematopoietic stem cells for transplantation." Nat Immunol **3**(4): 314-7.

Vermeulen, M., F. Le Pesteur, et al. (1998). "Role of adhesion molecules in the homing and mobilization of murine hematopoietic stem and progenitor cells." Blood **92**(3): 894-900.

Vila-Coro, A. J., M. Mellado, et al. (1999). "Characterization of RANTES- and aminooxypentane-RANTES-triggered desensitization signals reveals differences in recruitment of the G protein-coupled receptor complex." J Immunol **163**(6): 3037-44.

Visnjic, D., Z. Kalajzic, et al. (2004). "Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency." Blood **103**(9): 3258-64.

Visse, R. and H. Nagase (2003). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." Circ Res **92**(8): 827-39.

Voermans, C., M. L. Kooi, et al. (2001). "In vitro migratory capacity of CD34+ cells is related to hematopoietic recovery after autologous stem cell transplantation." Blood **97**(3): 799-804.

Voermans, C., P. M. Rood, et al. (2000). "Adhesion molecules involved in transendothelial migration of human hematopoietic progenitor cells." Stem Cells **18**(6): 435-43.

Vuillet-Gaugler, M. H., J. Breton-Gorius, et al. (1990). "Loss of attachment to fibronectin with terminal human erythroid differentiation." Blood **75**(4): 865-73.

Wagner, W., C. Roderburg, et al. (2007). "Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors." Stem Cells **25**(10): 2638-47.

Watanabe, T., B. Dave, et al. (1997). "GM-CSF-mobilized peripheral blood CD34+ cells differ from steady-state bone marrow CD34+ cells in adhesion molecule expression." Bone Marrow Transplant **19**(12): 1175-81.

Watts, M. J., A. M. Sullivan, et al. (1997). "Progenitor-cell mobilization after low-dose cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor: an analysis of progenitor-cell quantity and quality and factors predicting for these parameters in 101 pretreated patients with malignant lymphoma." J Clin Oncol **15**(2): 535-46.

Weaver, C. H., B. Hazelton, et al. (1995). "An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after the administration of myeloablative chemotherapy." Blood **86**(10): 3961-9.

Wernig, M., A. Meissner, et al. (2007). "In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state." Nature **448**(7151): 318-24.

Whitelock, J. M., A. D. Murdoch, et al. (1996). "The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases." J Biol Chem **271**(17): 10079-86.

Wieczorek, G., C. Steinhoff, et al. (2003). "Gene expression profile of mouse bone marrow stromal cells determined by cDNA microarray analysis." Cell Tissue Res **311**(2): 227-37.

Willert, K., J. D. Brown, et al. (2003). "Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors." Nature **423**(6938): 448-52.

Williams, A. F. and A. N. Barclay (1988). "The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition." Annu Rev Immunol **6**: 381-405.

Williams, D. A., M. Rios, et al. (1991). "Fibronectin and VLA-4 in haematopoietic stem cell-microenvironment interactions." Nature **352**(6334): 438-41.

Wilson, A., M. J. Murphy, et al. (2004). "c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation." Genes Dev **18**(22): 2747-63.

Winkler, I. G., J. Hendy, et al. (2005). "Serine protease inhibitors serpina1 and serpina3 are down-regulated in bone marrow during hematopoietic progenitor mobilization." J Exp Med **201**(7): 1077-88.

Witte, P. L., L. M. Frantsve, et al. (1993). "Cytokine production and heterogeneity of primary stromal cells that support B lymphopoiesis." Eur J Immunol **23**(8): 1809-17.

Wolf, N. S. and J. J. Trentin (1968). "Hemopoietic colony studies. V. Effect of hemopoietic organ stroma on differentiation of pluripotent stem cells." J Exp Med **127**(1): 205-14.

Woltjen, K., I. P. Michael, et al. (2009). "piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells." Nature **458**(7239): 766-70.

Wright, D. E., E. P. Bowman, et al. (2002). "Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines." J Exp Med **195**(9): 1145-54.

Wright, D. E., A. J. Wagers, et al. (2001). "Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells." Science **294**(5548): 1933-6.

Wu, H., X. Liu, et al. (1995). "Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor." Cell **83**(1): 59-67.

Wysocki, L. J. and V. L. Sato (1978). ""Panning" for lymphocytes: a method for cell selection." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(6): 2844-8.

Xie, Y., T. Yin, et al. (2009). "Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging." Nature **457**(7225): 97-101.

Yamaguchi, M., K. Ikebuchi, et al. (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**(3): 842-8.

Yin, A. H., S. Miraglia, et al. (1997). "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells." Blood **90**(12): 5002-12.

Yokota, T., K. Oritani, et al. (1998). "Growth-supporting activities of fibronectin on hematopoietic stem/progenitor cells in vitro and in vivo: structural requirement for fibronectin activities of CS1 and cell-binding domains." Blood **91**(9): 3263-72.

Yong, K. L., M. Watts, et al. (1998). "Transmigration of CD34+ cells across specialized and nonspecialized endothelium requires prior activation by growth factors and is mediated by PECAM-1 (CD31)." Blood **91**(4): 1196-205.

Yoshida, M., K. Tsuji, et al. (1997). "Thrombopoietin alone stimulates the early proliferation and survival of human erythroid, myeloid and multipotential progenitors in serum-free culture." Br J Haematol **98**(2): 254-64.

Yoshihara, H., F. Arai, et al. (2007). "Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche." Cell Stem Cell **1**(6): 685-97.

Young, H. E., T. A. Steele, et al. (2001). "Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors." Anat Rec **264**(1): 51-62.

Yu, J., K. Hu, et al. (2009). "Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences." Science **324**(5928): 797-801.

Yu, J., M. A. Vodyanik, et al. (2007). "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells." Science **318**(5858): 1917-20.

Yu, Q. and I. Stamenkovic (2000). "Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis." Genes Dev **14**(2): 163-76.

Zamore, P. D., T. Tuschl, et al. (2000). "RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals." Cell **101**(1): 25-33.

Zanjani, E. D., G. Almeida-Porada, et al. (1998). "Human bone marrow CD34- cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells." Exp Hematol **26**(4): 353-60.

Zanjani, E. D., A. W. Flake, et al. (1999). "Homing of human cells in the fetal sheep model: modulation by antibodies activating or inhibiting very late activation antigen-4-dependent function." Blood **94**(7): 2515-22.

Zannettino, A. C., M. C. Berndt, et al. (1995). "Primitive human hematopoietic progenitors adhere to P-selectin (CD62P)." Blood **85**(12): 3466-77.

Zhang, J., C. Niu, et al. (2003). "Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size." Nature **425**(6960): 836-41.

Zhao, H., M. M. Bernardo, et al. (2004). "Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 rgulates pro-MMP-2 activation." J Biol Chem **279**(10): 8592-601.

Ziegler, B. L., M. Valtieri, et al. (1999). "KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells." Science **285**(5433): 1553-8.

Zohren, F., D. Toutzaris, et al. (2008). "The monoclonal anti-VLA-4 antibody natalizumab mobilizes CD34+ hematopoietic progenitor cells in humans." Blood **111**(7): 3893-5.

Zou, Y. R., A. H. Kottmann, et al. (1998). "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development." Nature **393**(6685): 595-9.

Zuckerman, K. S., R. K. Rhodes, et al. (1985). "Inhibition of collagen deposition in the extracellular matrix prevents the establishment of a stroma supportive of hematopoiesis in long-term murine bone marrow cultures." J Clin Invest **75**(3): 970-5.

ANNEXES

1. Liste des publications

2. Publication soumise

3. Publications accéptées

PUBLICATIONS INTERNATIONALES A COMITES DE LECTURE

Ribeiro-Fleury T, Vignon C, Picard A, Ducrocq E., Bernard M-C, Rosset P ,Hérault O, Domenech J. The hematopoietic supportive function of adult bone marrow mesenchymal stem cells is lost after differentiation induction towards adipocytic, osteoblastic and vascular smooth muscle lineages. Soumission à *Stem Cells pour le manuscrit final.*

Adriana López Ponte*, **Tatiana Ribeiro-Fleury***, Valérie Chabot, Gouilleux Fabrice, Alain Langonné, Olivier Hérault, Pierre Charbord, Jorge Domenech G-CSF stimulation of bone marrow mesenchymal stromal cells promotes CD34+ cell migration via a MMP-2-dependent mechanism. Soumis à *Blood.*

* contributed equally to this work

Ribeiro T, Fleury MJ, Granieri E, Castellazzi M, Martini F, Mazzoni E, Coursaget P, Tognon M Investigation of the prevalence of antibodies against neurotropic polyomaviruses BK, JC and SV40 in sera from patients affected by multiple sclerosis. Neurol Sci. 2010 Aug;31(4):517-21. Epub 2010 Jun 15.

Combelas N., Saussereau E., Fleury M.J.J., **Ribeiro T.**, Gaitan J., Duarte-Forero D.F., Coursaget P. and Touzé A. A broad-spectrum vaccine against HPV using papillomavirus pseudovirions packaged with the L2 gene. J. Transl. Med. 2010 Mar 24;8:28

Ribeiro T, Picard A, Ducrocq E, Rosset P ,Hérault O, Domenech J. (2008) The hematopoietic supportive function of adult bone marrow mesenchymal stem cells is lost after differentiation induction towards adipocytic, osteoblastic and vascular smooth muscle lineages. 2008 Annual Meeting Abstracts *Blood*, Volume 112, Issue 11

Newton R, **Ribeiro T**, Alvarez E, Ziegler J, Casabonne D, Carpenter L, Beral V, Mbidde E, Parkin DM, Wabinga H, Mbulaiteye S, Jaffe H, the Uganda Kaposi's Sarcoma Study Group, Touzé A, Coursaget P. (2006). BK virus and cancer in Uganda.
Eur J cancer Prev. Aug;15(4):285-9.

Newton R, **Ribeiro T**, Casabonne D, Alvarez E, Touzé A, Key T, Coursaget P. (2005). Antibody levels against BK virus and prostate, kidney and bladder cancers in the EPIC-Oxford cohort. Br J Cancer. Nov 28;93(11):1305-6.

COMMUNICATIONS ORALES

N. Combelas, E. Saussereau**, T. Ribeiro,** M.J.J. Fleury**,** J. Gaitan**,** D.F. Duarte-Forero**,** P. Coursaget et A. Touzé**.** Anticorps cross-neutralisants après vaccination et vaccins L2. *3èmes Journées Scientifiques de l'AFIPP (Association Francophone pour l'étude des Infections par les Papillomavirus et les Polyomavirus).* 29-30 septembre et 1er octobre 2010, Sedan.

Ribeiro T, Picard A, Ducrocq E, Rosset P, Hérault O, Domenech J*.(2010).CSM et Régulation de l'Hématopoïèse normale. *Cancéropôle Grand Ouest*. 14 Janvier 2010. Nantes

Ribeiro T, Picard A, Ducrocq E, Rosset P, Hérault O, Domenech J*.(2008) Rôle des Cellules Souches Mésenchymateuses dans la migration et le soutien des Cellules Souches Hématopoïétiques. *8ème colloque international sur "La Biologie des Cellules Souches".* 27 et 28 novembre 2008. Paris

Ribeiro T, Picard A, Bernard MC, Langonné A, Hérault O, Domenech J. (2008) Evaluation de la fonction hématopoïétique des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse adulte. *Forum de l'école doctorale, Ecole Polytechnique de l'université de Tours.* 12 Juin 2008. Tours

Ribeiro T, Langonné A, DelormeB, Charbord P, Domenech J. Différenciation ostéoblastique des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine et capacité de soutien de l'hematopoïèse. *Jounée de la recherche, Faculté de Médecine.* 7 décembre 2007. Tours.

Ribeiro T, Langonné A, Delorme B, Charbord P, Domenech J. (2007) Capacité de soutien de l''hematopoÏèse des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine différenciées dans la voie ostéoblastique*. Biotechnocentre.* 25-26 octobre 2007, Seillac.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

Ribeiro T., Vignon C., Ducrocq E., Bernard M-C., Rosset P., Hérault O., Domenech J.(2010) Les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse adulte perdent leur capacité de soutien de l'hématopoïèse au cours de leur différenciation. *5èmes journées du Cancéropôle Grand Ouest.* 18 et 19 Octobre 210. Tours.

N. Combelas, E. Saussereau**, T. Ribeiro,** M.J.J. Fleury**,** J. Gaitan**,** D.F. Duarte-Forero**,** A. Touzé and P. Coursaget**.** (2009) Induction of cross-neutralizing antibodies with pseudoirions packaged with L2 gene. *25th international papillomavirus conference*, 8-14 may 2009, Malmö, Suède.

Ribeiro T, Picard A, Ducrocq E, Rosset P, Hérault O, Domenech J.(2008) Differentiation of adult bone marrow mesenchymal stem cells leads to decreased hematopoietic supportive function. *Journée de la recherche, Faculté de Médecine.* 7 décembre 2008. Tours.

Ribeiro T, Picard A, Ducrocq E, Rosset P, Hérault O, Domenech J.(2008) Differentiation of adult bone marrow mesenchymal stem cells leads to decreased hematopoietic supportive function. *8ème colloque international sur "La Biologie des Cellules Souches".* 27 et 28 novembre 2008. Paris

Ribeiro T, Langonné A, Delorme B, Charbord P, Domenech J. (2007) Differenciation osteoblastique des cellules souches mesenchymateuses de la moelle osseuse humaine et capacité de soutien de l'hematopoïèse. *Biotechnocentre.* 25-26 octobre 2007. Seillac

Ribeiro T, Langonné A, Delorme B, Charbord P, Domenech J. (2007) Osteoblastic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells and hematopoietic supportive capacity. *CHO,* 7-10 Octobre 2007.Presqu'île de Giens

Touzé A, Alvarez E, Renard L, **Ribeiro T**, Casabonne D, Newton R, Beral V, Ziegler J, Mbidde E, Jaffe H, Vautherot J-F, Dorries K, Coursaget P. (2004). L'existence de réactivités croisées entre les polyomavirus SV40, JC et BK est responsable de la détection d'anticorps anti-SV40 dans la population humaine.*6ème journées francophones de virologie*. 22-23 avril 2004. Paris

G-CSF stimulation of bone marrow mesenchymal stromal cells promotes CD34+ cell migration via a MMP-2-dependent mechanism

Short title: G-CSF-stimulation of MSCs promotes HPC mobilization

Adriana López Ponte[1]*, Tatiana Ribeiro-Fleury[1]*, Valérie Chabot[1,2], Gouilleux Fabrice[3],
Alain Langonné[1,2], Olivier Hérault[1], Pierre Charbord[4], Jorge Domenech[1]

[1]UPRES-EA3855, IFR135, Faculté de Médecine, Université François Rabelais and CHRU de Tours; 37032 Tours, France ; [2]Etablissement Français du Sang Centre Atlantique, Hôpital Bretonneau, 37044 Tours, France, ; [3]CNRS UMR 6239, Faculté de Médecine, Université François Rabelais, 37032 Tours, France ; [4]INSERM U972, Hôpital Paul Brousse, 94807 Villejuif, France.

*ALP and TRF contributed equally to this work

Address correspondence to:
Jorge Domenech MD, PhD
Laboratoire d'Hématopoïèse
UPRES-EA3855
Faculté de Médecine
10 boulevard Tonnellé,
37032 Tours Cedex
France
Phone: (+33) 247 47 47 21
Fax: (+33) 247 47 69 34
E-mail: domenech@med.univ-tours.fr

Abstract: 195 words
Text: 4253 words
5 Figures
34 References

ABSTRACT

Human hematopoietic stem cells/progenitors (HSCs/HPCs) can be mobilized into the circulation using growth factors, such as granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF), for graft collection in view of hematopoietic transplantation. This process has been related to BM release of serine proteases and of the matrix metalloproteinase (MMP)-9. Yet, the role of these mediators in the egress of HSCs from their niches remains questionable, because they are produced by non stromal cells (mainly neutrophils and monocytes/macrophages) that are not part of the niches. We show here that G-CSF pre-stimulation of human BM mesenchymal stromal cells (MSCs) enhances the *in vitro* trans-stromal migration of hematopoietic cells through a mechanism involving MMP-2, but not MMP-9 or MMP-1. Furthermore, we show by zymography that pro-MMP-2 (and not pro-MMP-2) is expressed by MSCs and that G-CSF treatment increases this expression and induces MMP-2 activation at the cell membrane. Finally, we show that the G-CSF receptor is expressed at MSC membrane and that its down regulated expression leads to impaired CD34+cell trans-stromal migration after G-CSF treatment. These results indicate that G-CSF drives, by a direct action on MSCs, HSC/HPC egress from BM niches via the synthesis and the activation of MMP-2.

INTRODUCTION

Hematopoietic stem cells (HSCs) are immature cells that ensure the renewal of all mature blood cells throughout life. This property is strictly dependent on the close interactions that HSCs establish within specialized microenvironmental niches belonging to hematopoietic tissues(Schofield, 1978). The essential function of these niches is to control the quiescence and the balance between self-renewal of HSCs and their commitment to more differentiated hematopoietic progenitor cells (HPCs) that will give rise to all blood lineages. Another function of these niches is to regulate HSC trafficking into blood stream during both development and lifetime. The main cellular component of the hematopoietic microenvironment is represented by vascular smooth muscle (VSM)-like cells that are usually referred to as mesenchymal stromal cells (MSCs) or mesenchymal stem cells, which reside into bone marrow (BM) where they give rise to differentiated osteoblasts and adipocytes(Caplan, 1991; Prockop, 1997; Dennis and Charbord, 2002). Some recent works have suggested that a subset of osteoblasts is a key constitutive element of the niche for the control of HSC stemness(Zhang *et al.*, 2003), while vascular cells (mural smooth muscle and endothelial cells) might constitute the niche for the control of HSC/HPC proliferation and differentiation(Kopp *et al.*, 2005). HSC/HPC migration into blood occurs both during development and adult life. During development, HSCs are able to migrate through the circulation from one hematopoietic site to the next (i.e., from the embryonic aorta-gonad-mesonephros region to the fetal liver and finally to the adult bone marrow)(Peault and Tavian, 2003). In adult mammals, HSCs are mainly located within the BM, but a small proportion of them has been shown to continually egress into PB before returning to the BM(Wright *et al.*, 2001; Abkowitz *et al.*, 2003). In addition, HSCs can be mobilized into the circulation using specific growth factors (GFs), such as the granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF), in order to collect a graft for hematopoietic rescue after high-dose anticancer therapy(To *et al.*, 1997). Although hematopoietic grafts have been collected from PB for at least 20 years and are today predominantly used for clinical transplantations, the mechanisms underlying HSC mobilization are not yet fully understood. HPC mobilization has been related to BM release of proteases, including the neutrophil serine proteases (i.e., elastase and cathepsin G) and the matrix metalloproteinase (MMP) -9, which are able to degrade the extra-cellular matrix (ECM). A local increase of proteolytic activity induces a disruption of the interaction between the microenvironment and HSCs, which involves predominantly the cytoadhesive molecule VCAM-1 and the b1 integrin VLA-4, the GF Stem Cell Factor (SCF) and its receptor c-Kit, and the chemokine Stromal cell-Derived Factor-1 (SDF-1) and its receptor CXCR4.

Neutrophil elastase has been shown to degrade SDF-1 during G-CSF-induced mobilization, resulting in a dramatic decrease of the chemokine BM concentration(Petit *et al.*, 2002); neutrophil elastase is also known to cleave the extracellular domain of CXCR-4(Levesque *et al.*, 2003a) and VCAM-1(Levesque *et al.*, 2001). A role for MMP-9 in G-CSF-induced HSC/HPC mobilization has also been suggested in mice models(Heissig *et al.*, 2002) as in humans(Carion *et al.*, 2003). However, neutrophils and monocytes/macrophages, which are the main source of elastase and MMP-9, respectively, are not truly part of the HSC niche. Since these proteases have a very localized action, it is possible that they do not contribute predominantly to the HSC egress from the niche, in contrast to their known role in mobilization of more differentiated cells.

Thus, we decided to investigate whether G-CSF could directly stimulate human stromal cells to promote HSC/HPC mobilization from their BM niches. To this aim, we used an *in vitro* migration model, where CD34+ cells were able to migrate through a BM MSC layer in response to a SDF-1 gradient. Our results suggest that G-CSF drives, by a direct action on G-CSF receptor (G-CSFR) expressed on MSCs, HSC/HPC egress from BM niches via the synthesis and the activation of MMP-2, and not MMP-9.

MATERIAL AND METHODS

BM-derived MSC cultures. BM cells were obtained from informed and consenting patients undergoing orthopedic surgery (Cardiovascular Surgery Department, Trousseau Hospital, Tours, France). Cells were centrifuged, seeded in flasks at a density of $5x10^4$ per cm^2 in aMEM culture medium (Invitrogen) supplemented with 10% screened FCS, 20 µmol/l L-glutamine (Invitrogen), 100 U/ml of penicillin G (Invitrogen), and incubated at 37°C in 95% humidified air and 5% CO_2. Adherent culture-amplified MSCs were used at passage 2 (P2); at this time, no contaminating hematopoietic cells (CD45+, CD34+ or CD14+ cells) were detected, and MSCs were CD73+, CD90+, and CD 106+ (data not shown). When P2 layers were confluent, the supernatant was entirely replaced with migration medium consisting in RPMI with 0.25 % bovine serum albumin (Sigma) alone (control), or supplemented for three consecutive days with 15 ng/ml/day G-CSF (Neupogen®, Amgen) or 15 U/ml/day IL-1b (R&D Systems). For ELISA, supernatants were removed, filtered and stored at -80°C, while cells were trypsinized and collected for RNA extraction and flow cytometry. For zymography and Western blot assays, membrane fractions were extracted. Cells were homogenized in a Dounce homogenizer. After centrifugation at 500 g to remove nuclei and large cell debris, supernatants were centrifuged at 100,000 g to pellet the membranes. Supernatants were then retained as the cytosolic fraction of the cell lysates.

Trans-stromal migration assay. Trans-stromal migration assays were performed in Transwell plates (Costar) with 5-µm pore filters using hematopoietic cells including megakaryocytic leukemia-derived MO7e cells (kindly provided by Dr Fawzia Louache, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France) and human BM-derived CD34+ cells. Human BM $CD34^+$ cells were collected from informed and consenting orthopedic surgery patients and enriched through a magnetic bead separation kit (MiniMACS®, Miltenyi Biotec) according to

the manufacturer's instructions (mean purity of CD34+ cells within the selected cells was 90%). The filter upper face of Transwells was coated with fibronectin (Sigma) and seeded with 10^4 P2 MSCs in culture medium. Two days later, the culture medium was replaced with migration medium and the cell layers were stimulated, or not, for three consecutive days with 15 ng/ml/day G-CSF (Neupogen®, Amgen) or 15 U/ml/day IL-1b (R&D Systems). Twenty hours after the last stimulation, $50x10^4$ MO7e or $2.2x10^4$ $CD34^+$ cells were loaded into the upper chamber in 100 µl of migration medium, while 600 µL of migration medium supplemented with 100 ng/ml SDF-1a (R&D Systems) were added to the bottom chamber. The Transwell plates were then incubated at 37°C, 5% CO_2, for 4 hours. The percentage of cell migration was the ratio (x100) between the cell number recovered in the lower compartment and the number of loaded cells. To investigate the role of MMPs in cell migration, the MMP inhibitor, GM 6001 ($2x10^{-5}$M) (Calbiochem), and specific anti-MMP-1 (clone 41-1E5, Oncogene), anti-MMP-2 (clone CA-4001, Chemicon), or anti-MMP-9 (GE-213, Chemicon) mAbs were added prior to migration.

MMP-2 and MMP-9 mRNA and protein expression in BM MSCs. For mRNA expression, total RNA was isolated from BM MSCs, using the RNeasy® Kit (Qiagen). Extracted RNA was then subjected to reverse transcription using the Superscript® One-Step RT-PCR System kit with Platinum® Taq (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. PCR amplifications were carried out employing specific primers for MMP-2 (R&D System), MMP-9 (5'-ACC ACC ACA ACA TCA CCT ATT GGA TCC-3' and 5'-TGT AGA GTC TCT CGC GGG GGA GAA G-3') and GADPH (5'-ACA GTC CAT GCC ATC ACT GCC-3' and 5'-GCC TGC TTC ACC ACC TTC TTG-3'). PCR products were then analyzed by electrophoresis using 1.6 % (w/v) agarose. Membrane and intracellular MMP-2 and MMP-9 proteins were detected by flow cytometry (FACScalibur®, BD). Cell suspensions ($1x10^6$ cells/ml) were pre-incubated at 37°C with 1 ml of GolgiPlug® (BD Biosciences), a protein

transport inhibitor, for 4 hours. Cells were subsequently stained with specific mouse anti-MMP-2 or anti-MMP-9 mnAbs, biotinylated goat anti-mouse polyclonal IgG (Pharmingen) and R-phycoerythrin-conjugated Streptavidin (Dako Cytomation). For intracellular staining, cells were first permeabilized with the BD Cytofix/Cytoperm® kit (BD Biosciences). MMP-2 and MMP-9 levels (active and latent forms) were measured by ELISA using the Quantikine® human MMP-2 and MMP-9 immunoassays (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions. MMP-2 and MMP-9 gelatinase activities were measured by gelatin zymograghy in BM MSC membrane and cytosolic fractions, as previously described(Chabot *et al.*, 2006).

Immunofluorescence. BM MSCs were cultured on Lab-Tek® chamber slides (Nunc). Confluent layers were fixed and permeabilized with 2% formaldehyde in PBS. Slides were incubated with anti-human MMP-2 (clone VB-3, Oncogene), MMP-14 (clone 114-6G61), ASMA (1A4, Sigma) or vimentin (V9, Sigma) mouse Abs for 1 hour, followed by Alexa-488- or Alexa-594-conjugated goat anti-mouse antibody (Interchim). After 30 minutes, slides were mounted with Vectashield+DAPI® (Vector) and examined under a Leica DMR/HCS fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany).

G-CSF receptor expression. *Flow cytometry.* BM MSCs and normal peripheral blood neutrophils were incubated with primary mouse anti-human G-CSFR (clone 38660; R&D Systems) and subsequently with R-phycoerythrin-conjugated goat anti-mouse Ab after permeabilization as indicated above. *Western blot.* BM MSCs were stimulated or not, with 45ng/ml G-CSF for 24 hours, or transfected with shRNA and membranes extracted as described above. A total of 5 µg proteins were separated using 6% (for G-CSF) or 15% (for G-CSFR) (w/v) acrylamide SDS-PAGE and electrophoretically transferred onto polyvinylide difluoride membranes (PVDF). The PVDF membranes were blocked with 5% dried milk and then incubated with primary mouse anti-human G-CSFR (clone 38660; R&D Systems) or G-

CSF (clone 5.24; Calbiochem) mAbs and then with a secondary rabbit polyclonal IgG anti-mouse antibody conjugated to horseradish peroxidase (Biorad). Bands were revealed by chemiluminescence using the ECLplus® Western blotting detection kit (Amersham Biosciences) and measured with a Chemismart 2000® Imager (Vilber Lourmat).

ShRNA interference targeting G-CSF receptor. Cells were transfected with CSF3R (G-CSFR) Human shRNA 29-mer pRS plasmids (Reference #????, OriGene, Rockville, USA) using Fugene® 6 (Roche, Mannheim, Germany) following manufacturer's protocol. Briefly, MSCs were washed with PBS 1X then transfected with a mix containing 1µg of shRNA expression plasmid DNA and 3µl of Fugene® 6 per cm² of culture area. Cells were incubated at 37°C in a 5% CO2 incubator for 72 hrs before harvesting for protein analysis or trans-stromal migration assay. Six constructs of shRNA were tested, 1 empty shRNA cloning vector construct (shRNA1), 1 non-effective 29-mer scrambled shRNA cassette pRS vector construct (shRNA2) and 4 different CSF3R-specific shRNA constructs (shRNA 3 to 6),

Statistical analysis. Paired values from different experimental groups were compared using the Student's t test with a significance level set at $p < 0.05$.

RESULTS

G-CSF stimulation of human BM MSCs enhances the trans-stromal migration of immature hematopoietic cells

In order to model the interactions between hematopoietic cells and BM stromal MSCs, an *in vitro* assay was set up in which human immature hematopoietic cells (i.e., BM CD34+ or MO7e cells) were allowed to migrate in response to a SDF-1 gradient through a confluent BM MSC layer grown on fibronectin-coated Transwell filters (i.e. trans-stromal migration assay). The hematopoietic supportive capacity of the MSCs was previously verified and their multipotency toward the adipocytic, chondrocytic and osteoblastic lineages, as described(Delorme *et al.*, 2009). Using this model, we investigated whether G-CSF (compared to IL-1b) was able to exert a direct effect on BM MSCs by favoring the migration of hematopoietic cells through the stromal layer. The trans-stromal migration assay was performed after pre-stimulation of the MSC layers with G-CSF or IL-1b for 3 days in order to simulate the clinical mobilizing protocols with G-CSF. We showed that the percentage of cells, which migrated through G-CSF-stimulated MSCs, compared to unstimulated MSCs, was dramatically increased for both MO7e (24±0.9% vs 9±0.6%; $p< 0.001$; Figure 1A) and BM CD34+ cells (38.9±2.8% vs 20.2±2.1%; $p< 0.01$; Figure 1B). In contrast, IL-1b pre-treatment did not display any effect on trans-stromal migration of MO7e (Fig 1A). We verified that, in the absence of a stromal layer, the G-CSF did not affect the migration of MO7e cells through a cellular filters (data not shown), which is in agreement with the fact that these cells are irresponsive to G-CSF(Avanzi *et al.*, 1988).

MMP-2 (but not MMP-9 or MMP-1) is involved in the G-CSF-stimulated trans-stromal migration of hematopoietic cells

We hypothesized that the G-CSF-stimulated HSC/HPC trans-stromal migration could be linked to the local production of MMPs. To test this hypothesis, we performed our trans-stromal migration assays of hematopoietic cells in the presence/absence of MMP inhibitors. First, we used the broad-spectrum MMP inhibitor GM 6001, known to exert an inhibitory effect on MMP-1, -2, -3, -8 and -9, and a negative control molecule provided by the manufacturer. Only when the stromal cells were pre-stimulated with G-CSF, did GM 6001 decrease the percentage of MO7e cells migrating through the MSC layer, from 26.2±1.8% to 16.6±0.9%, which represents a significant ($p<0.01$) inhibition of 36% (Figure 1 C). In contrast, no inhibitory effect was seen with unstimulated or IL-1b-pre-stimulated MSCs. To identify which MMPs are involved in this G-CSF-enhanced migration, we then performed our migration assays in the presence of monoclonal antibodies (mAb) specifically neutralizing the activity of MMP-1, MMP-2 and MMP-9 (each at the optimal blocking concentration of 5µg/ml). The migration of both MO7e (Figure 1D) and CD34+ cells (Figure 1E) was significantly ($p<0.01$) inhibited by the anti-MMP-2 mAb, while no inhibition was observed with anti-MMP-9, anti-MMP-1 or irrelevant anti-IgG1 negative control. The percentage of migrated cells was significantly ($p<0.001$) reduced from 23.0±1.4% to 9.7±0.9% (58% inhibition) for MO7e cells, and from 35.4±2.2% to 21.3±3.0% (40% inhibition) for CD34+ cells.

MMP-2 (but not MMP-9) is expressed in human BM MSCs and is activated by G-CSF

Involvement of MMP-2 in the trans-migration process of HPC, led us to measure MMP-2 and MMP-9 in the human BM MSCs that were used in our transmigration assay, and to investigate whether the levels were modified by the G-CSF treatment. In MSC supernatants, only MMP-2, and not MMP-9, was detected both by RT-PCR (Figure 2A) and by ELISA

(Figure 2B). MMP-2 expression level was not modified by G-CSF treatment (Figure 2B). MMP-2 was also detected by flow cytometry, at low level on the MSC cell membrane, and at higher level intracellularly, with, again no clear change after G-CSF treatment (Figure 2C). In agreement with the ELISA results, MMP-9 was not detected either in the membrane or intracellularly. MMP-2 expression was also confirmed by immunofluorescence (Figure 2D) on BM MSCs expressing, as expected, the mesenchymal markers vimentin and alpha smooth muscle actin (ASMA). The finding of a simultaneous expression of MMP-14 (or MT1-MMP) has to be noted, since it is known to be the major MMP-2 activator(Seiki, 2002). The antigenic detection of MMPs does not necessarily reflect their functionality, since MMPs are secreted as inactive (latent) zymogens (i.e., pro-MMPs) that have to be activated by cleavage to reveal their proteolytic activity. Therefore, we assessed the gelatinolytic activity of both MMP-2 and MMP-9 by zymography on membrane and cytosolic extracts of unstimulated and G-CSF-stimulated BM MSCs. As shown in Figure 3, pro-MMP-2 (72 kD) was detected in both membrane (Figure 3A) and cytosolic (Figure 3B) fractions of unstimulated MSCs and its expression increased in both fractions after G-CSF-treatment. Interestingly, active MMP-2 (62 kD) was exclusively detected in the membrane fractions and increased upon G-CSF stimulation (in 2 of 3 experiments) (Figure 3A). Moreover, the absence of MMP-9 expression in BM MSCs was confirmed by zymography, since neither the latent (92 kD) nor the active (83 kD) forms could be detected in any of the cell fractions (Figure 3C).

The G-CSF receptor is expressed by BM MSCs

To further support the hypothesis of a direct effect of G-CSF, we evaluated the expression of the G-CSFR both by flow cytometry on permeabilized BM MSCs and by Western blotting on membrane extracts of BM MSCs obtained 24 hours after stimulation with 45ng/ml G-CSF, or in the absence of such stimulation. Flow cytometry analysis allowed detect consistent levels of G-CSFR expression on BM MSCs at comparable levels than on neutrophils (Figure 4A).

This expression was confirmed by Western blot analysis that showed, as indicated in Figure 4B, G-CSFR expression in the BM MSC membrane fraction prior to stimulation, with a slight increase after G-CSF exposure. The molecular weight (97 kD) of the G-CSFR expressed by BM MSCs was identical to that found for PB neutrophils. G-CSF of expected molecular size (19 kD) was also detected in MSC membranes prior to any G-CSF treatment (Fig 4C), and its expression level increased after addition of exogenous G-CSF.

ShRNA-induced down regulation of G-CSF receptor in BM MSCs leads to decreased CD34+ cell trans-stromal migration after G-CSF stimulation

A shRNA strategy was used to down regulate the G-CSFR gene and demonstrate the functional role of G-CSFR expressed on BM MSCs in the migration of hematopoietic progenitor cells. First, down regulation of G-CSFR expression was verified to be effective by Western blotting after specific shRNA transfection into MSCs while it was not observed with negative controls (Figure 5A). Transfection procedure did not affect trans-stromal migration since percentages of migration were not clearly different by comparing untransfected MSCs and MSCs transfected with negative controls (shRNA1 and 2) with or without G-CSF stimulation. Percentages of trans-stromal migration through MSCs transfected with the four G-CSFR-specific shRNAs (shRNA3 to 6) dramatically decreased as compared to negative controls but only after G-CSF stimulation. In contrast, trans-stromal migration through untreated MSCs was nearly equivalent to that through intact MSCs or transfected with negative controls.

DISCUSSION

In the present study, we modelized the mobilization process of HSC/HPC using an *in vitro* migration assay by which we demonstrated a direct role of G-CSF on MSCs to favor the egress of HSC/HPC from the niche. G-CSF activity is dependant on G-CSFR expression on human BM MSCs and is mediated by a MMP-2-dependant mechanism.

Several reports have suggested during the recent last years involvement of MMP-9 (gelatinase B) in the HSC/HPC mobilizing process. Thus, blocking MMP-9 antibodies have been shown to inhibit IL-8-induced mobilization that is associated with increased MMP-9 circulating levels and is strictly dependant on the presence of neutrophils(Pruijt *et al.*, 1999d). In addition, G-CSF treatment is followed by increased MMP-9 expression in BM together with an impairment of HPC mobilization in MMP-$9^{-/-}$ mice(Heissig *et al.*, 2002), although not found by other authors(Levesque *et al.*, 2004). Likewise, we also reported that MMP-9 plasma levels are correlated with HPC mobilizing capacity in humans(Carion *et al.*, 2003). Gelatinases MMP-9 and MMP-2 share similar biological activities including degradation of denatured collagens (gelatins) as well as that of native collagen IV (constitutive of the basement membrane) and collagen V. MMP-2 can also degrade collagene VII and collagene X(Janowska-Wieczorek *et al.*, 1999). In addition, both gelatinases are able to inactivate *in vitro* the chemokine SDF-1/CXCL12 as shown for MMP-1, -3, -13 and -14 (MT1-MMP)(McQuibban *et al.*, 2001) and for CD26/dipeptidylpeptidase IV (DPPIV)(Christopherson *et al.*, 2006). Otherwise, G-CSF induced MMP-2 and MMP-9 expressions on BM CD34+ cells and their trans-matrix migration(Janowska-Wieczorek *et al.*, 1999). Finally, activated MMP-2, as does MT1-MMP, can also induce the activation of other MMPs, such as pro-MMP-1, pro-MMP-9, and pro MMP-13 (Seiki, 2002). MMP-9 is mainly expressed physiologically by hematopoietic cells (including neutrophils, macrophages, lymphocytes, dendritic cells)(Opdenakker *et al.*, 2001) and osteoclasts(Kollet *et al.*, 2006), in

contrast to MMP-2, which is particularly expressed by mesenchyme-derived cells (including fibroblasts and MSCs). Therefore the involvement of MMP-9 in the HSC egress from the mesenchymal niche after G-CSF treatment remains questionable. To investigate the molecular mechanisms involved in this process, we hypothesized that G-CSF could exert a direct effect on the niche-forming cells represented by MSCs through MMPs. Using an *in vitro* migration assay, we demonstrated that G-CSF pretreatment of MSC layers favored the trans-stromal migration of both MO7e cells, a G-CSF-irresponsive megakaryoblastic cell line(Avanzi *et al.*, 1988), and normal CD34+ cells. This effect on MSCs seems to be specific to G-CSF since IL-1b, a classical cytokine inducer of mesenchymal cells, did not exhibit such an effect. These findings suggest that G-CSF can act directly on BM MSCs to enhance migration of hematopoietic cells from the niche, although an additional indirect mechanism cannot be excluded after contact with CD34+ cells. Thereafter, we demonstrated that this enhancing effect of G-CSF on trans-stromal migration of hematopoietic cells involved MMPs, using the chemical inhibitor GM6001, and more precisely MMP-2 (and not MMP-1 or MMP-9), using specific blocking antibodies. Thus, gelatinase A MMP-2 appears a crucial (but not exclusive) mediator involved in the G-CSF-induced mobilization process of HSC out of the stem cell niche. In contrast, collagenase MMP-1 and gelatinase B MMP-9 do not seem to participate in this process. However, these results do not contradict the reported role of MMP-9 on hematopoietic cell mobilization(Heissig *et al.*, 2002), which could concern more differentiated cells (HPC and precursors) from others BM sites, a protease produced by mature leukocytes or osteoclasts(Kollet *et al.*, 2006). The particular role of MMP-2 in the stromal cell control of HSC mobilization, is not unexpected since previous works(Marquez-Curtis *et al.*, 2001; Son *et al.*, 2006) showed that MMP-2 is the gelatinase predominantly expressed by stromal cells, while MMP-9 detection seems due to contaminating hematopoietic accessory cells. These findings prompted us to explore basically the expression of the gelatinases MMP-2 and MMP-9 by the BM MSCs of our model. As expected, we

found consistent expression of MMP-2 on MSCs in terms of transcripts (by RT-PCR), secreted protein (by ELISA) and cell associated protein (by flow cytometry and immunofluorescence). Such clear MMP-2 expression by BM MSCs contrasted with the lack of MMP-9 expression found in parallel by the same techniques. The simultaneous detection by immunofluorescence of MT1-MMP (MMP-14), a membrane-anchored MMP, appeared of particular interest since this molecule is known to be the major MMP-2 activator in the presence of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2(Seiki, 2002). The functional importance of MT1-MMP on human BM MSCs has previously been pointed out with the demonstration of a crucial role in MSC migration(Annabi *et al.*, 2003; Son *et al.*, 2006). Moreover, a very recent report indicates that G-CSF treatment of human CD34+ cells induces expression and activation of MT1-MMP, mediates proMMP-2 activation and cell migration across reconstituted basement membrane(Shirvaikar *et al.*, 2010).

As our results did not indicate any G-CSF-induced up-regulation of MMP-2, we decided to assess the gelatinolytic activity of unstimulated and G-CSF-stimulated MSCs. Zymography analysis showed the presence of both latent (pro-MMP-2) and activated forms of MMP-2 in membrane extracts while only pro-MMP-2 was found in cytosol extracts. This sensible functional assay allowed us to detect an increased protein expression of pro-MMP-2 (particularly evident in cytosol) but also of activated MMP-2 at the membrane after G-CSF treatment. Although the mechanism by which G-CSF induces activation of MMP-2 at BM MSC membrane remains to be clarified, a possible role of MT1-MMP (also expressed at the membrane) can be evoked by a mechanism similar to that described for trans-matrix migration of CD34+ cells by Shirvaika et al.(Shirvaikar *et al.*, 2010). Interestingly, these authors observed that MMP-2 activation through MT1-MMP occurred only after G-CSF treatment of CD34+ cells when co-cultured with BM fibroblasts. Nevertheless, their experimental protocol did not allow identify the cell origin of activated MMP-2 that could be BM fibroblasts since they are the only cells expressing pro-MMP-2.

All the results reported above suggest that G-CSF stimulates BM MSCs in a direct way. First, we had verified (see Material and Methods section) that our stromal layers were totally devoid of contaminating hematopoietic cells. Second, we observed an increase in trans-stromal migration of hematopoietic cells upon G-CSF stimulation even when using MO7e cells, which are irresponsive to G-CSF. Third, we detected activated MMP-2 at the membrane of MSCs that had not been in contact with hematopoietic cells. Since MSCs were able to directly respond to G-CSF, it appeared us indispensable to investigate whether G-CSFR/CD114 is expressed on BM MSCs, an expression not yet clearly reported in the literature. Immunoreactive G-CSFR was detected in both total MSCs by flow cytometry and membrane extracts (including plasma and internal membranes) by Western blotting. G-CSFR protein expressed by BM MSCs is apparently not different to its classical counterpart present on peripheral blood neutrophils with a same molecular weight of 97 kD. However, the possibility of a minor variant isoform cannot totally be excluded and need to be explored further. In parallel, we noted G-CSF expression in membrane extracts at the expected molecular weight. This expression was observed yet before G-CSF treatment corresponding to the endogenous production of this growth factor and increased after exogenous treatment. The simultaneous detection of G-CSF and G-CSFR in membrane extracts suggests potential receptor/ligand binding at the membrane site. This is the first demonstration, to the best of our knowledge, of G-CSFR expression on MSCs. The fact that BM MSCs directly respond to G-CSF may explain some previous reported data such as the effect of G-CSF on human stromal cells to enhance CD34+ cell adhesion through an increase of VCAM-1 expression(Fuste *et al.*, 2004) and also to reduce BM osteoblast density and activity(Semerad *et al.*, 2005). Really, G-CSFR expression is not restricted to granulocyte lineage, since it has been shown yet to be expressed by endothelial cells(Bocchietto *et al.*, 1993), placenta tissues and several nonhematopoietic cell lines, derived from small cell lung and colon carcinomas(Avalos, 1996). Using a shRNA interference strategy to target G-CSF receptor, we next demonstrated

that trans-stromal migration of CD34+ cells after G-CSF-stimulation was strictly dependent on the expression of G-CSFR on BM MSC membranes. Indeed, G-CSF-stimulated migration was clearly impaired through MSCs in which G-CSFR was previously down regulated.

Collectively, our results show that, in addition to its effects on mature hematopoietic cells to induce expression of serine proteases and MMP-9, G-CSF can also directly stimulate BM MSCs to induce MMP-2 synthesis and its activation at the membrane, in which involvement of MT1-MMP is possible and remains to be investigated. On the other hand, MMP-9 does not seem to play a significant role in this process. Thus, MMP-2 would be necessary to remove the most primitive HSCs from BM niches, while serine proteases and MMP-9, locally produced by neutrophils or monocytes/macrophages, would rather be involved in the transendothelial migration of HSC/HPC and their egress into the blood stream. Such direct activity of G-CSF on BM MSCs prompt to investigate a role of this growth factor on other MSC functions including their proliferation and differentiation capacities.

Acknowledgments

The authors are grateful to Elfi Ducrocq and Marie-Christine Bernard for their expert technical assistance. This work was supported by grants from the European Integrated Projects FIRST (contract N° 503436) and Genostem (contract N° 503161), the French Cancéropôle Grand-Ouest and the French Council of Centre Region.

Authorship Contributions

Contribution: A.L.P. and T.R.F. planned and performed most of the experiments, interpreted results, wrote and edited the manuscript. V.C. performed flow cytometry experiments, analyzed data and provided expertise for zymography techniques. F.G. and A.L. provided expertise for biochemistry analyses. O.H. provided expertise for flow cytometry analyses. P.C.

provided expertise for MSC biology and reviewed the manuscript. J.D. conceived and coordinated the work, interpreted results and wrote and edited the manuscript.

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

REFERENCES

Abedin, M., Y. Tintut, et al. (2004). "Mesenchymal stem cells and the artery wall." Circ Res **95**(7): 671-6.

Abkowitz, J. L., A. E. Robinson, et al. (2003). "Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure." Blood **102**(4): 1249-53.

Adams, G. B., K. T. Chabner, et al. (2006). "Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor." Nature **439**(7076): 599-603.

Adams, G. B. and D. T. Scadden (2006). "The hematopoietic stem cell in its place." Nat Immunol **7**(4): 333-7.

Aiuti, A., I. J. Webb, et al. (1997). "The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood." J Exp Med **185**(1): 111-20.

Allan, J. A., A. J. Docherty, et al. (1995). "Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components." Biochem J **309 (Pt 1)**: 299-306.

Almeida-Porada, G. and J. L. Ascensao (1996). "Isolation, characterization, and biologic features of bone marrow endothelial cells." J Lab Clin Med **128**(4): 399-407.

Alsalameh, S., R. Amin, et al. (2004). "Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage." Arthritis Rheum **50**(5): 1522-32.

Amit, M., M. K. Carpenter, et al. (2000). "Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture." Dev Biol **227**(2): 271-8.

Andrews, R. G., J. W. Singer, et al. (1986). "Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors." Blood **67**(3): 842-5.

Andrews, R. G., J. W. Singer, et al. (1989). "Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties." J Exp Med **169**(5): 1721-31.

Annabi, B., Y. T. Lee, et al. (2003). "Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation." Stem Cells **21**(3): 337-47.

Ara, T., K. Tokoyoda, et al. (2003). "Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny." Immunity **19**(2): 257-67.

Arai, F., A. Hirao, et al. (2004). "Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche." Cell **118**(2): 149-61.

Arroyo, A. G., D. Taverna, et al. (2000). "In vivo roles of integrins during leukocyte development and traffic: insights from the analysis of mice chimeric for alpha 5, alpha v, and alpha 4 integrins." J Immunol **165**(8): 4667-75.

Asosingh, K., W. Renmans, et al. (1998). "Circulating CD34+ cells in cord blood and mobilized blood have a different profile of adhesion molecules than bone marrow CD34+ cells." Eur J Haematol **60**(3): 153-60.

Avalos, B. R. (1996). "Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor." Blood **88**(3): 761-777.

Avanzi, G. C., P. Lista, et al. (1988). "Selective growth response to IL-3 of a human leukaemic cell line with megakaryoblastic features." Br J Haematol **69**(3): 359-66.

Avecilla, S. T., K. Hattori, et al. (2004). "Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis." Nat Med **10**(1): 64-71.

Avigdor, A., P. Goichberg, et al. (2004). "CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow." Blood **103**(8): 2981-9.

Baggiolini, M., B. Dewald, et al. (1997). "Human chemokines: an update." Annu Rev Immunol **15**: 675-705.

Bajetto, A., R. Bonavia, et al. (2002). "Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications." J Neurochem **82**(6): 1311-29.

Balabanian, K., B. Lagane, et al. (2005). "The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes." J Biol Chem **280**(42): 35760-6.

Barker, J. E. (1994). "Sl/Sld hematopoietic progenitors are deficient in situ." Exp Hematol **22**(2): 174-7.

Baum, C. M., I. L. Weissman, et al. (1992). "Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(7): 2804-8.

Bellucci, R., M. S. De Propris, et al. (1999). "Modulation of VLA-4 and L-selectin expression on normal CD34+ cells during mobilization with G-CSF." Bone Marrow Transplant **23**(1): 1-8.

Benboubker, L., C. Binet, et al. (2002). "Frequency and differentiation capacity of circulating LTC-IC mobilized by G-CSF or GM-CSF following chemotherapy: a comparison with steady-state bone marrow and peripheral blood." Exp Hematol **30**(1): 74-81.

Bennett, J. H., C. J. Joyner, et al. (1991). "Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential." J Cell Sci **99 (Pt 1)**: 131-9.

Bensinger, W., F. Appelbaum, et al. (1995). "Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells." J Clin Oncol **13**(10): 2547-55.

Berenson, R. J., R. G. Andrews, et al. (1988). "Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons." J Clin Invest **81**(3): 951-5.

Bernstein, A., L. Forrester, et al. (1991). "The murine W/c-kit and Steel loci and the control of hematopoiesis." Semin Hematol **28**(2): 138-42.

Bhardwaj, G., B. Murdoch, et al. (2001). "Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation." Nat Immunol **2**(2): 172-80.

Bhatia, M., J. C. Wang, et al. (1997). "Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5320-5.

Bianchi, G., A. Banfi, et al. (2003). "Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2." Exp Cell Res **287**(1): 98-105.

Bianco, P., M. Riminucci, et al. (1999). "Multipotential cells in the bone marrow stroma: regulation in the context of organ physiology." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **9**(2): 159-73.

Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.

Bjorklund, M. and E. Koivunen (2005). "Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells." Biochim Biophys Acta **1755**(1): 37-69.

Bleul, C. C., M. Farzan, et al. (1996). "The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry." Nature **382**(6594): 829-33.

Bocchietto, E., A. Guglielmetti, et al. (1993). "Proliferative and migratory responses of murine microvascular endothelial cells to granulocyte-colony-stimulating factor." J Cell Physiol **155**(1): 89-95.

Bodine, D. M., N. E. Seidel, et al. (1996). "Bone marrow collected 14 days after in vivo administration of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor to mice has 10-fold more repopulating ability than untreated bone marrow." Blood **88**(1): 89-97.

Bodine, D. M., N. E. Seidel, et al. (1993). "In vivo administration of stem cell factor to mice increases the absolute number of pluripotent hematopoietic stem cells." Blood **82**(2): 445-55.

Bonig, H., A. Wundes, et al. (2008). "Increased numbers of circulating hematopoietic stem/progenitor cells are chronically maintained in patients treated with the CD49d blocking antibody natalizumab." Blood **111**(7): 3439-41.

Borzillo, G. V., R. A. Ashmun, et al. (1990). "Macrophage lineage switching of murine early pre-B lymphoid cells expressing transduced fms genes." Mol Cell Biol **10**(6): 2703-14.

Boyer, L. A., T. I. Lee, et al. (2005). "Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells." Cell **122**(6): 947-56.

Bradley, T. R., G. S. Hodgson, et al. (1980). Characteristic of primitive macrophage progenitor cells with high proliferative potential : their relationship to cells with marrow repopulating ability in 5-fluorouracil treated mouse bone marrow. Experimental Hematology Today. G. D. L. S.G. Baum, D.W. Van Bekkum. New York, Karger**:** 284.

Brandt, J., N. Baird, et al. (1988). "Characterization of a human hematopoietic progenitor cell capable of forming blast cell containing colonies in vitro." J Clin Invest **82**(3): 1017-27.

Brasel, K., H. J. McKenna, et al. (1997). "Flt3 ligand synergizes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or granulocyte colony-stimulating factor to mobilize hematopoietic progenitor cells into the peripheral blood of mice." Blood **90**(9): 3781-8.

Breems, D. A., E. A. Blokland, et al. (1994). "Frequency analysis of human primitive haematopoietic stem cell subsets using a cobblestone area forming cell assay." Leukemia **8**(7): 1095-104.

Broxmeyer, H. E., C. M. Orschell, et al. (2005). "Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist." J Exp Med **201**(8): 1307-18.

Bryon, P. A. (1998). Anatomie et histologie de la moelle osseuse. Encycl Méd Chir. Elsevier. Paris. **Hématologie, 13-000-M-80:** 10 p.

Buhring, H. J., V. L. Battula, et al. (2007). "Novel markers for the prospective isolation of human MSC." Ann N Y Acad Sci **1106**: 262-71.

Burckardt, R. (1971). Atlas d'histopathologie de la moelle osseuse et de l'os. Masson. Paris.

Burns, J. M., B. C. Summers, et al. (2006). "A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development." J Exp Med **203**(9): 2201-13.

Calvi, L. M., G. B. Adams, et al. (2003). "Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche." Nature **425**(6960): 841-6.

Campbell, C., R. M. Risueno, et al. (2008). "Signal control of hematopoietic stem cell fate: Wnt, Notch, and Hedgehog as the usual suspects." Curr Opin Hematol **15**(4): 319-25.

Caplan, A. I. (1991). "Mesenchymal stem cells." J Orthop Res **9**(5): 641-50.

Cardier, J. E. and E. Barbera-Guillem (1997). "Extramedullary hematopoiesis in the adult mouse liver is associated with specific hepatic sinusoidal endothelial cells." Hepatology **26**(1): 165-75.

Carion, A., L. Benboubker, et al. (2003). "Stromal-derived factor 1 and matrix metalloproteinase 9 levels in bone marrow and peripheral blood of patients mobilized by granulocyte colony-stimulating factor and chemotherapy. Relationship with mobilizing capacity of haematopoietic progenitor cells." Br J Haematol **122**(6): 918-26.

Carion, A., J. Domenech, et al. (2002). "Decreased stroma adhesion capacity of CD34+ progenitor cells from mobilized peripheral blood is not lineage- or stage-specific and is associated with low beta 1 and beta 2 integrin expression." J Hematother Stem Cell Res **11**(3): 491-500.

Carstanjen, D., N. Ulbricht, et al. (2002). "Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is elevated during mobilization of peripheral blood progenitor cells by G-CSF." Transfusion **42**(5): 588-96.

Chabot, V., P. Reverdiau, et al. (2006). "CCL5-enhanced human immature dendritic cell migration through the basement membrane in vitro depends on matrix metalloproteinase-9." J Leukoc Biol **79**(4): 767-78.

Chambers, I., D. Colby, et al. (2003). "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." Cell **113**(5): 643-55.

Charbord, P. (1998). "Le micro-environnement médullaire chez l'homme normal et pathologique." Hématologie **4**: 29-40.

Charbord, P., E. Tamayo, et al. (1999). "The Hematopoietic Microenvironment: Phenotypic and Functional Characterization of Human Marrow Vascular Stromal Cells." Hematol **4**(3): 257-282.

Chitteti, B. R., Y. H. Cheng, et al. (2010). "Impact of interactions of cellular components of the bone marrow microenvironment on hematopoietic stem and progenitor cell function." Blood **115**(16): 3239-48.

Choi, K. (1998). "Hemangioblast development and regulation." Biochem Cell Biol **76**(6): 947-56.

Christopherson, K. W., 2nd, S. Cooper, et al. (2003a). "Cell surface peptidase CD26/DPPIV mediates G-CSF mobilization of mouse progenitor cells." Blood **101**(12): 4680-6.

Christopherson, K. W., 2nd, G. Hangoc, et al. (2002). "Cell surface peptidase CD26/dipeptidylpeptidase IV regulates CXCL12/stromal cell-derived factor-1 alpha-mediated chemotaxis of human cord blood CD34+ progenitor cells." J Immunol **169**(12): 7000-8.

Christopherson, K. W., 2nd, S. E. Uralil, et al. (2006). "G-CSF- and GM-CSF-induced upregulation of CD26 peptidase downregulates the functional chemotactic response of CD34+CD38- human cord blood hematopoietic cells." Exp Hematol **34**(8): 1060-8.

Christopherson, K. W., S. Cooper, et al. (2003b). "CD26 is essential for normal G-CSF-induced progenitor cell mobilization as determined by CD26-/- mice." Exp Hematol **31**(11): 1126-34.

Cicuttini, F. M., M. Martin, et al. (1992). "Support of human cord blood progenitor cells on human stromal cell lines transformed by SV40 large T antigen under the influence of an inducible (metallothionein) promoter." Blood **80**(1): 102-12.

Civin, C. I., L. C. Strauss, et al. (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**(1): 157-65.

Civin, C. I., L. C. Strauss, et al. (1990). "Positive stem cell selection--basic science." Prog Clin Biol Res **333**: 387-401; discussion 402.

Codony-Servat, J., J. Albanell, et al. (1999). "Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells." Cancer Res **59**(6): 1196-201.

Colter, D. C., R. Class, et al. (2000). "Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3213-8.

Colter, D. C., I. Sekiya, et al. (2001). "Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(14): 7841-5.

Cornelius, L. A., L. C. Nehring, et al. (1998). "Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization." J Immunol **161**(12): 6845-52.

Corre, J., V. Planat-Benard, et al. (2004). "Human bone marrow adipocytes support complete myeloid and lymphoid differentiation from human CD34 cells." Br J Haematol **127**(3): 344-7.

Coulombel, L., A. C. Eaves, et al. (1983). "Enzymatic treatment of long-term human marrow cultures reveals the preferential location of primitive hemopoietic progenitors in the adherent layer." Blood **62**(2): 291-7.

Crisan, M., S. Yap, et al. (2008). "A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs." Cell Stem Cell **3**(3): 301-13.

Cuevas, P., F. Carceller, et al. (2004). "Bone marrow stromal cell implantation for peripheral nerve repair." Neurol Res **26**(2): 230-2.

Cui, L., V. Ramsfjell, et al. (1997). "Thrombopoietin promotes adhesion of primitive human hemopoietic cells to fibronectin and vascular cell adhesion molecule-1: role of activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5." J Immunol **159**(4): 1961-9.

Cynshi, O., K. Satoh, et al. (1991). "Reduced response to granulocyte colony-stimulating factor in W/Wv and Sl/Sld mice." Leukemia **5**(1): 75-7.

D'Arena, G., P. Musto, et al. (1998). "Predictive parameters for mobilized peripheral blood CD34+ progenitor cell collection in patients with hematological malignancies." Am J Hematol **58**(4): 255-62.

Dave, B., T. Watanabe, et al. (2000). "Growth factor mobilization and modulation of progenitor cell adhesion to stromal cells: role of VLA-4." J Hematother Stem Cell Res **9**(4): 507-15.

De Bari, C., F. Dell'Accio, et al. (2001). "Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane." Arthritis Rheum **44**(8): 1928-42.

de Haan, G., E. Weersing, et al. (2003). "In vitro generation of long-term repopulating hematopoietic stem cells by fibroblast growth factor-1." Dev Cell **4**(2): 241-51.

Delgado, M. B., I. Clark-Lewis, et al. (2001). "Rapid inactivation of stromal cell-derived factor-1 by cathepsin G associated with lymphocytes." Eur J Immunol **31**(3): 699-707.

Delorme, B., E. Nivet, et al. (2009). "The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties." Stem Cells Dev **19**(6): 853-66.

Dennis, J. E. and P. Charbord (2002). "Origin and differentiation of human and murine stroma." Stem Cells **20**(3): 205-14.

Deryugina, E. I., B. Ratnikov, et al. (2001). "MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin alphavbeta3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells." Exp Cell Res **263**(2): 209-23.

Dexter, T. M., T. D. Allen, et al. (1977). "Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro." J Cell Physiol **91**(3): 335-44.

Dexter, T. M. and M. A. Moore (1977). "In vitro duplication and "cure" of haemopoietic defects in genetically anaemic mice." Nature **269**(5627): 412-4.

Dicker, A., K. Le Blanc, et al. (2005). "Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue." Exp Cell Res **308**(2): 283-90.

Donnelly, D. S., D. Zelterman, et al. (1999). "Functional activity of murine CD34+ and CD34- hematopoietic stem cell populations." Exp Hematol **27**(5): 788-96.

Driessen, R. L., H. M. Johnston, et al. (2003). "Membrane-bound stem cell factor is a key regulator in the initial lodgment of stem cells within the endosteal marrow region." Exp Hematol **31**(12): 1284-91.

Duband, J. L., G. H. Nuckolls, et al. (1988). "Fibronectin receptor exhibits high lateral mobility in embryonic locomoting cells but is immobile in focal contacts and fibrillar streaks in stationary cells." J Cell Biol **107**(4): 1385-96.

Dyer, M. A., S. M. Farrington, et al. (2001). "Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo." Development **128**(10): 1717-30.

Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." Nat Rev Cancer **2**(3): 161-74.

English, W. R., X. S. Puente, et al. (2000). "Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2." J Biol Chem **275**(19): 14046-55.

Enver, T., C. M. Heyworth, et al. (1998). "Do stem cells play dice?" Blood **92**(2): 348-51; discussion 352.

Fibbe, W. E., J. F. Pruijt, et al. (1999). "Biology of IL-8-induced stem cell mobilization." Ann N Y Acad Sci **872**: 71-82.

Fillmore, H. L., T. E. VanMeter, et al. (2001). "Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion." J Neurooncol **53**(2): 187-202.

Fleming, W. H., E. J. Alpern, et al. (1993). "Functional heterogeneity is associated with the cell cycle status of murine hematopoietic stem cells." J Cell Biol **122**(4): 897-902.

Flomenberg, N., S. M. Devine, et al. (2005). "The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone." Blood **106**(5): 1867-74.

Foudi, A., P. Jarrier, et al. (2006). "Reduced retention of radioprotective hematopoietic cells within the bone marrow microenvironment in CXCR4-/- chimeric mice." Blood **107**(6): 2243-51.

Fraser, J. R., T. C. Laurent, et al. (1997). "Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover." J Intern Med **242**(1): 27-33.

Freedman, A. S., J. M. Munro, et al. (1990). "Adhesion of human B cells to germinal centers in vitro involves VLA-4 and INCAM-110." Science **249**(4972): 1030-3.

Frenette, P. S., T. N. Mayadas, et al. (1996). "Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins." Cell **84**(4): 563-74.

Frenette, P. S., S. Subbarao, et al. (1998). "Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14423-8.

Fridman, R., M. Toth, et al. (1995). "Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2)." Cancer Res **55**(12): 2548-55.

Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhjan, et al. (1970). "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells." Cell Tissue Kinet **3**(4): 393-403.

Friedenstein, A. J., J. F. Gorskaja, et al. (1976). "Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs." Exp Hematol **4**(5): 267-74.

Fruehauf, S., M. R. Veldwijk, et al. (1998). "Delineation of cell cycle state and correlation to adhesion molecule expression of human CD34+ cells from steady-state bone marrow and peripheral blood mobilized following G-CSF-supported chemotherapy." Stem Cells **16**(4): 271-9.

Fu, S. and J. Liesveld (2000). "Mobilization of hematopoietic stem cells." Blood Rev **14**(4): 205-18.

Fu, X., W. C. Parks, et al. (2008). "Activation and silencing of matrix metalloproteinases." Semin Cell Dev Biol **19**(1): 2-13.

Funk, P. E., P. W. Kincade, et al. (1994). "Native associations of early hematopoietic stem cells and stromal cells isolated in bone marrow cell aggregates." Blood **83**(2): 361-9.

Fuste, B., G. Escolar, et al. (2004). "G-CSF increases the expression of VCAM-1 on stromal cells promoting the adhesion of CD34+ hematopoietic cells: studies under flow conditions." Exp Hematol **32**(8): 765-72.

Galmiche, M. C., V. E. Koteliansky, et al. (1993). "Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway." Blood **82**(1): 66-76.

Gartner, S. and H. S. Kaplan (1980). "Long-term culture of human bone marrow cells." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(8): 4756-9.

Gazitt, Y. (2001). "Recent developments in the regulation of peripheral blood stem cell mobilization and engraftment by cytokines, chemokines, and adhesion molecules." J Hematother Stem Cell Res **10**(2): 229-36.

Gazitt, Y., C. O. Freytes, et al. (1999). "Successful PBSC mobilization with high-dose G-CSF for patients failing a first round of mobilization." J Hematother **8**(2): 173-83.

Gazitt, Y. and Q. Liu (2000). "High steady-state plasma levels of flt3-ligand in the peripheral blood is a good predictor for poor mobilization of CD34+ PBSC in patients undergoing high-dose chemotherapy and stem cell rescue." J Hematother Stem Cell Res **9**(2): 285-93.

Gazitt, Y. and Q. Liu (2001). "Plasma levels of SDF-1 and expression of SDF-1 receptor on CD34+ cells in mobilized peripheral blood of non-Hodgkin's lymphoma patients." Stem Cells **19**(1): 37-45.

Ghaffari, S., G. J. Dougherty, et al. (1995). "Differentiation-associated changes in CD44 isoform expression during normal hematopoiesis and their alteration in chronic myeloid leukemia." Blood **86**(8): 2976-85.

Glimm, H., W. Eisterer, et al. (2001). "Previously undetected human hematopoietic cell populations with short-term repopulating activity selectively engraft NOD/SCID-beta2 microglobulin-null mice." J Clin Invest **107**(2): 199-206.

Gong, J. K. (1978). "Endosteal marrow: a rich source of hematopoietic stem cells." Science **199**(4336): 1443-5.

Goodell, M. A., K. Brose, et al. (1996). "Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo." J Exp Med **183**(4): 1797-806.

Gratwohl, A., J. Passweg, et al. (2002). "Economics, health care systems and utilization of haematopoietic stem cell transplants in Europe." Br J Haematol **117**(2): 451-68.

Greenberger, J. S. (1978). "Sensitivity of corticosteroid-dependent insulin-resistant lipogenesis in marrow preadipocytes of obese-diabetic (db/db) mice." Nature **275**(5682): 752-4.

Greenlee, K. J., Z. Werb, et al. (2007). "Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted." Physiol Rev **87**(1): 69-98.

Gu, Y., M. D. Filippi, et al. (2002). "The Highly Related Rho GTPases, Rac1 and Rac2, Separately Control Hematopoietic Cell Survival and Cycle Progression, but Together Regulate the Engraftment Phenotype." Blood **100**(11): 134a.

Gunji, Y., M. Nakamura, et al. (1992). "Expression and function of adhesion molecules on human hematopoietic stem cells: CD34+ LFA-1- cells are more primitive than CD34+ LFA-1+ cells." Blood **80**(2): 429-36.

Gupta, P., J. B. McCarthy, et al. (1996). "Stromal fibroblast heparan sulfate is required for cytokine-mediated ex vivo maintenance of human long-term culture-initiating cells." Blood **87**(8): 3229-36.

Hamilton, A. J. and D. C. Baulcombe (1999). "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants." Science **286**(5441): 950-2.

Hao, Q. L., A. J. Shah, et al. (1995). "A functional comparison of CD34 + CD38- cells in cord blood and bone marrow." Blood **86**(10): 3745-53.

Harrison, D. E., C. M. Astle, et al. (1978). "Loss of proliferative capacity in immunohemopoietic stem cells caused by serial transplantation rather than aging." J Exp Med **147**(5): 1526-31.

Hartsock, R. J., E. B. Smith, et al. (1965). "Normal variations with aging of the amount of hematopoietic tissue in bone marrow from the anterior iliac crest." Am J Clin Pathol **43**: 326-31.

Hattori, K., B. Heissig, et al. (2001). "Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells." Blood **97**(11): 3354-60.

Healy, L., G. May, et al. (1995). "The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(26): 12240-4.

Heissig, B., K. Hattori, et al. (2002). "Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand." Cell **109**(5): 625-37.

Hemann, M. T., J. S. Fridman, et al. (2003). "An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes in vivo." Nat Genet **33**(3): 396-400.

Hernandez-Barrantes, S., Y. Shimura, et al. (2001). "Differential roles of TIMP-4 and TIMP-2 in pro-MMP-2 activation by MT1-MMP." Biochem Biophys Res Commun **281**(1): 126-30.

Hess, D. A., T. E. Meyerrose, et al. (2004). "Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity." Blood **104**(6): 1648-55.

Hess, D. A., L. Wirthlin, et al. (2006). "Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells." Blood **107**(5): 2162-9.

Hidalgo, A., F. Sanz-Rodriguez, et al. (2001). "Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin- dependent adhesion to fibronectin and VCAM-1 on bone marrow hematopoietic progenitor cells." Exp Hematol **29**(3): 345-55.

Hiraoka, N., B. Petryniak, et al. (1999). "A novel, high endothelial venule-specific sulfotransferase expresses 6-sulfo sialyl Lewis(x), an L-selectin ligand displayed by CD34." Immunity **11**(1): 79-89.

Houshmand, P. and A. Zlotnik (2003). "Therapeutic applications in the chemokine superfamily." Curr Opin Chem Biol **7**(4): 457-60.

Hu, Y., L. Liao, et al. (2003). "Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas." J Lab Clin Med **141**(5): 342-9.

Huntly, B. J. and D. G. Gilliland (2005). "Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research." Nat Rev Cancer **5**(4): 311-21.

Hynes, R. O. (1992). "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion." Cell **69**(1): 11-25.

Imai, K., M. Kobayashi, et al. (1999). "Selective transendothelial migration of hematopoietic progenitor cells: a role in homing of progenitor cells." Blood **93**(1): 149-56.

Issaad, C., L. Croisille, et al. (1993). "A murine stromal cell line allows the proliferation of very primitive human CD34++/CD38- progenitor cells in long-term cultures and semisolid assays." Blood **81**(11): 2916-24.

Itoh, K., H. Tezuka, et al. (1989). "Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow." Exp Hematol **17**(2): 145-53.

Jackson, J. D., Y. Yan, et al. (1995). "Interleukin-12 enhances peripheral hematopoiesis in vivo." Blood **85**(9): 2371-6.

Jacobs, J. J., K. Kieboom, et al. (1999). "The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus." Nature **397**(6715): 164-8.

Jacobs, J. P., C. M. Jones, et al. (1970). "Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5." Nature **227**(5254): 168-70.

Janowska-Wieczorek, A., L. A. Marquez, et al. (1999). "Growth factors and cytokines upregulate gelatinase expression in bone marrow CD34(+) cells and their transmigration through reconstituted basement membrane." Blood **93**(10): 3379-90.

Jarocha, D., E. Lukasiewicz, et al. (2008). "Adventage of mesenchymal stem cells (MSC) expansion directly from purified bone marrow CD105+ and CD271+ cells." Folia Histochem Cytobiol **46**(3): 307-14.

Jazwiec, B., A. Solanilla, et al. (1998). "Endothelial cell support of hematopoiesis is differentially altered by IL-1 and glucocorticoids." Leukemia **12**(8): 1210-20.

Johansson, N., M. Ahonen, et al. (2000). "Matrix metalloproteinases in tumor invasion." Cell Mol Life Sci **57**(1): 5-15.

Johnson, G. R. and D. Metcalf (1977). "Pure and mixed erythroid colony formation in vitro stimulated by spleen conditioned medium with no detectable erythropoietin." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(9): 3879-82.

Jones, E. A., A. English, et al. (2004). "Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis." Arthritis Rheum **50**(3): 817-27.

Kajita, M., Y. Itoh, et al. (2001). "Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration." J Cell Biol **153**(5): 893-904.

Kalderon, D. (2000). "Transducing the hedgehog signal." Cell **103**(3): 371-4.

Kansas, G. S. (1996). "Selectins and their ligands: current concepts and controversies." Blood **88**(9): 3259-87.

Karanu, F. N., B. Murdoch, et al. (2000). "The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells." J Exp Med **192**(9): 1365-72.

Kastan, M. B., E. Schlaffer, et al. (1990). "Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells." Blood **75**(10): 1947-50.

Kaushansky, K. (2003). "Thrombopoietin: accumulating evidence for an important biological effect on the hematopoietic stem cell." Ann N Y Acad Sci **996**: 39-43.

Kawashima, I., E. D. Zanjani, et al. (1996). "CD34+ human marrow cells that express low levels of Kit protein are enriched for long-term marrow-engrafting cells." Blood **87**(10): 4136-42.

Kenney, A. M. and D. H. Rowitch (2000). "Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors." Mol Cell Biol **20**(23): 9055-67.

Kerst, J. M., J. B. Sanders, et al. (1993). "Alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 are differentially expressed during myelopoiesis and mediate the adherence of human CD34+ cells to fibronectin in an activation-dependent way." Blood **81**(2): 344-51.

Kiel, M. J. and S. J. Morrison (2006). "Maintaining hematopoietic stem cells in the vascular niche." Immunity **25**(6): 862-4.

Kiel, M. J. and S. J. Morrison (2008). "Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells." Nat Rev Immunol **8**(4): 290-301.

Kiel, M. J., G. L. Radice, et al. (2007). "Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance." Cell Stem Cell **1**(2): 204-17.

Kiel, M. J., O. H. Yilmaz, et al. (2005). "SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells." Cell **121**(7): 1109-21.

Kikuta, T., C. Shimazaki, et al. (2000). "Mobilization of hematopoietic primitive and committed progenitor cells into blood in mice by anti-vascular adhesion molecule-1 antibody alone or in combination with granulocyte colony-stimulating factor." Exp Hematol **28**(3): 311-7.

Kim, C. H. and H. E. Broxmeyer (1998). "In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment." Blood **91**(1): 100-10.

Kimura, S., A. W. Roberts, et al. (1998). "Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(3): 1195-200.

Kinashi, T. and T. A. Springer (1994). "Steel factor and c-kit regulate cell-matrix adhesion." Blood **83**(4): 1033-8.

Kinoshita, T., H. Sato, et al. (1998). "TIMP-2 promotes activation of progelatinase A by membrane-type 1 matrix metalloproteinase immobilized on agarose beads." J Biol Chem **273**(26): 16098-103.

Kobune, M., Y. Ito, et al. (2004). "Indian hedgehog gene transfer augments hematopoietic support of human stromal cells including NOD/SCID-beta2m-/- repopulating cells." Blood **104**(4): 1002-9.

Koenigsmann, M., J. D. Griffin, et al. (1992). "Myeloid and erythroid progenitor cells from normal bone marrow adhere to collagen type I." Blood **79**(3): 657-65.

Kollet, O., A. Dar, et al. (2006). "Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells." Nat Med **12**(6): 657-64.

Kopp, H. G., S. T. Avecilla, et al. (2005). "The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization." Physiology (Bethesda) **20**: 349-56.

Kovach, N. L., N. Lin, et al. (1995). "Stem cell factor modulates avidity of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrins expressed on hematopoietic cell lines." Blood **85**(1): 159-67.

Kroger, N., W. Zeller, et al. (1998). "Difference between expression of adhesion molecules on CD34+ cells from bone marrow and G-CSF-stimulated peripheral blood." Stem Cells **16**(1): 49-53.

Kronenwett, R., S. Martin, et al. (2000). "The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells." Stem Cells **18**(5): 320-30.

Kunkel, S. L. and N. Godessart (2002). "Chemokines in autoimmunity: from pathology to therapeutics." Autoimmun Rev **1**(6): 313-20.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.

Laharrague, P., B. Cousin, et al. (1999). "L'adipocyte médullaire : une cellule pleine d'avenir." m/s **15**(4): 504-9.

Lambeir, A. M., P. Proost, et al. (2001). "Kinetic investigation of chemokine truncation by CD26/dipeptidyl peptidase IV reveals a striking selectivity within the chemokine family." J Biol Chem **276**(32): 29839-45.

Lane, T. A., P. Law, et al. (1995). "Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation." Blood **85**(1): 275-82.

Laterveer, L., I. J. Lindley, et al. (1995). "Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability." Blood **85**(8): 2269-75.

Leahy, D. J., I. Aukhil, et al. (1996). "2.0 A crystal structure of a four-domain segment of human fibronectin encompassing the RGD loop and synergy region." Cell **84**(1): 155-64.

Leary, A. G., M. Ogawa, et al. (1984). "Single cell origin of multilineage colonies in culture. Evidence that differentiation of multipotent progenitors and restriction of proliferative potential of monopotent progenitors are stochastic processes." J Clin Invest **74**(6): 2193-7.

Leavesley, D. I., J. M. Oliver, et al. (1994). "Signals from platelet/endothelial cell adhesion molecule enhance the adhesive activity of the very late antigen-4 integrin of human CD34+ hemopoietic progenitor cells." J Immunol **153**(10): 4673-83.

Lemieux, M. E., V. I. Rebel, et al. (1995). "Characterization and purification of a primitive hematopoietic cell type in adult mouse marrow capable of lymphomyeloid differentiation in long-term marrow "switch" cultures." Blood **86**(4): 1339-47.

Lemischka, I. R., D. H. Raulet, et al. (1986). "Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells." Cell **45**(6): 917-27.

Lerat, H., J. C. Lissitzky, et al. (1993). "Role of stromal cells and macrophages in fibronectin biosynthesis and matrix assembly in human long-term marrow cultures." Blood **82**(5): 1480-92.

Lessard, J., S. Baban, et al. (1998). "Stage-specific expression of polycomb group genes in human bone marrow cells." Blood **91**(4): 1216-24.

Lessard, J. and G. Sauvageau (2003). "Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells." Nature **423**(6937): 255-60.

Lessard, J., A. Schumacher, et al. (1999). "Functional antagonism of the Polycomb-Group genes eed and Bmi1 in hemopoietic cell proliferation." Genes Dev **13**(20): 2691-703.

Levesque, J. P., D. N. Haylock, et al. (1996). "Cytokine regulation of proliferation and cell adhesion are correlated events in human CD34+ hemopoietic progenitors." Blood **88**(4): 1168-76.

Levesque, J. P., J. Hendy, et al. (2003a). "Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide." J Clin Invest **111**(2): 187-96.

Levesque, J. P., J. Hendy, et al. (2002). "Mobilization by either cyclophosphamide or granulocyte colony-stimulating factor transforms the bone marrow into a highly proteolytic environment." Exp Hematol **30**(5): 440-9.

Levesque, J. P., J. Hendy, et al. (2003b). "Granulocyte colony-stimulating factor induces the release in the bone marrow of proteases that cleave c-KIT receptor (CD117) from the surface of hematopoietic progenitor cells." Exp Hematol **31**(2): 109-17.

Levesque, J. P., D. I. Leavesley, et al. (1995). "Cytokines increase human hemopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins." J Exp Med **181**(5): 1805-15.

Levesque, J. P., F. Liu, et al. (2004). "Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice." Blood **104**(1): 65-72.

Levesque, J. P. and P. J. Simmons (1999). "Cytoskeleton and integrin-mediated adhesion signaling in human CD34+ hemopoietic progenitor cells." Exp Hematol **27**(4): 579-86.

Levesque, J. P., Y. Takamatsu, et al. (2001). "Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor." Blood **98**(5): 1289-97.

Lévesque, J. P., Y. Takamatsu, et al. (2001). "Rôle des intégrines et sélectines dans le développement et les régulations du système hématopoïétique." Hématologie **7**(2): 99-109.

Levesque, J. P., A. C. Zannettino, et al. (1999). "PSGL-1-mediated adhesion of human hematopoietic progenitors to P-selectin results in suppression of hematopoiesis." Immunity **11**(3): 369-78.

Levi, E., R. Fridman, et al. (1996). "Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(14): 7069-74.

Li, J., L. Sensebe, et al. (1995). "Nontransformed colony-derived stromal cell lines from normal human marrows. II. Phenotypic characterization and differentiation pathway." Exp Hematol **23**(2): 133-41.

Li, L., L. A. Milner, et al. (1998). "The human homolog of rat Jagged1 expressed by marrow stroma inhibits differentiation of 32D cells through interaction with Notch1." Immunity **8**(1): 43-55.

Li, L. and T. Xie (2005). "Stem cell niche: structure and function." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 605-31.

Li, W. M., W. Q. Huang, et al. (2000). "Positive and negative hematopoietic cytokines produced by bone marrow endothelial cells." Cytokine **12**(7): 1017-23.

Lichterfeld, M., S. Martin, et al. (2000). "Mobilization of CD34+ haematopoietic stem cells is associated with a functional inactivation of the integrin very late antigen 4." Br J Haematol **110**(1): 71-81.

Lichtman, M. A. (1981). "The ultrastructure of the hemopoietic environment of the marrow: a review." Exp Hematol **9**(4): 391-410.

Liechty, K. W., T. C. MacKenzie, et al. (2000). "Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep." Nat Med **6**(11): 1282-6.

Liesveld, J. L., J. M. Winslow, et al. (1991). "Adhesive interactions of normal and leukemic human CD34+ myeloid progenitors: role of marrow stromal, fibroblast, and cytomatrix components." Exp Hematol **19**(1): 63-70.

Liles, W. C., H. E. Broxmeyer, et al. (2003). "Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist." Blood **102**(8): 2728-30.

Lin, C. S., S. K. Lim, et al. (1996). "Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis." Genes Dev **10**(2): 154-64.

Liu, F., J. Poursine-Laurent, et al. (2000a). "Expression of the G-CSF receptor on hematopoietic progenitor cells is not required for their mobilization by G-CSF." Blood **95**(10): 3025-31.

Liu, Z., X. Zhou, et al. (2000b). "The serpin alpha1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo." Cell **102**(5): 647-55.

Lloyd, A. R., A. Biragyn, et al. (1995). "Granulocyte-colony stimulating factor and lipopolysaccharide regulate the expression of interleukin 8 receptors on polymorphonuclear leukocytes." J Biol Chem **270**(47): 28188-92.

Loeuillet, C., G. Bernard, et al. (2001). "Distinct hematopoietic support by two human stromal cell lines." Exp Hematol **29**(6): 736-45.

Long, M. W., R. Briddell, et al. (1992). "Human hematopoietic stem cell adherence to cytokines and matrix molecules." J Clin Invest **90**(1): 251-5.

Long, M. W. and V. M. Dixit (1990). "Thrombospondin functions as a cytoadhesion molecule for human hematopoietic progenitor cells." Blood **75**(12): 2311-8.

Lymperi, S., N. Horwood, et al. (2008). "Strontium can increase some osteoblasts without increasing hematopoietic stem cells." Blood **111**(3): 1173-81.

Ma, Q., D. Jones, et al. (1999). "The Chemokine Receptor CXCR4 Is Required for the Retention of B Lineage and Granulocytic Precursors within the Bone Marrow Microenvironment." Immunity **10**(4): 463-471.

Mackay, C. R. (2001). "Chemokines: immunology's high impact factors." Nat Immunol **2**(2): 95-101.

Maghazachi, A. A. and A. Al-Aoukaty (1998). "Chemokines activate natural killer cells through heterotrimeric G-proteins: implications for the treatment of AIDS and cancer." Faseb J **12**(11): 913-24.

Marchenko, N. D., G. N. Marchenko, et al. (2004). "Beta-catenin regulates the gene of MMP-26, a novel metalloproteinase expressed both in carcinomas and normal epithelial cells." Int J Biochem Cell Biol **36**(5): 942-56.

Marquez-Curtis, L. A., A. Dobrowsky, et al. (2001). "Matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinase secretion by haematopoietic and stromal precursors and their production in normal and leukaemic long-term marrow cultures." Br J Haematol **115**(3): 595-604.

Martinez-Agosto, J. A., H. K. Mikkola, et al. (2007). "The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view." Genes Dev **21**(23): 3044-60.

Matsushima, K. and J. J. Oppenheim (1989). "Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF." Cytokine **1**(1): 2-13.

McArthur, G. A., L. R. Rohrschneider, et al. (1994). "Induced expression of c-fms in normal hematopoietic cells shows evidence for both conservation and lineage restriction of

signal transduction in response to macrophage colony-stimulating factor." Blood **83**(4): 972-81.
McQuibban, G. A., G. S. Butler, et al. (2001). "Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1." J Biol Chem **276**(47): 43503-8.
Mendez-Ferrer, S., T. V. Michurina, et al. (2010). "Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche." Nature **466**(7308): 829-34.
Metcalf, D. (1991). "Lineage commitment of hemopoietic progenitor cells in developing blast cell colonies: influence of colony-stimulating factors." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(24): 11310-4.
Metcalf, D. (1998). "Lineage commitment and maturation in hematopoietic cells: the case for extrinsic regulation." Blood **92**(2): 345-7; discussion 352.
Minguell, J. J., A. Erices, et al. (2001). "Mesenchymal stem cells." Exp Biol Med (Maywood) **226**(6): 507-20.
Mitsui, K., Y. Tokuzawa, et al. (2003). "The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells." Cell **113**(5): 631-42.
Miyake, K., K. Medina, et al. (1991a). "A VCAM-like adhesion molecule on murine bone marrow stromal cells mediates binding of lymphocyte precursors in culture." J Cell Biol **114**(3): 557-65.
Miyake, K., I. L. Weissman, et al. (1991b). "Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis." J Exp Med **173**(3): 599-607.
Mohle, R., F. Bautz, et al. (1998). "The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1." Blood **91**(12): 4523-30.
Mohle, R., D. Green, et al. (1997a). "Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(2): 663-8.
Mohle, R., M. A. Moore, et al. (1997b). "Transendothelial migration of CD34+ and mature hematopoietic cells: an in vitro study using a human bone marrow endothelial cell line." Blood **89**(1): 72-80.
Mohle, R., S. Murea, et al. (1995). "Differential expression of L-selectin, VLA-4, and LFA-1 on CD34+ progenitor cells from bone marrow and peripheral blood during G-CSF-enhanced recovery." Exp Hematol **23**(14): 1535-42.
Molineux, G., C. McCrea, et al. (1997). "Flt-3 ligand synergizes with granulocyte colony-stimulating factor to increase neutrophil numbers and to mobilize peripheral blood stem cells with long-term repopulating potential." Blood **89**(11): 3998-4004.
Molineux, G., Z. Pojda, et al. (1990). "Transplantation potential of peripheral blood stem cells induced by granulocyte colony-stimulating factor." Blood **76**(10): 2153-8.
Moore, M. A. and D. Metcalf (1970). "Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo." Br J Haematol **18**(3): 279-96.
Morad, V., M. Pevsner-Fischer, et al. (2008). "The myelopoietic supportive capacity of mesenchymal stromal cells is uncoupled from multipotency and is influenced by lineage determination and interference with glycosylation." Stem Cells **26**(9): 2275-86.
Morikawa, S., Y. Mabuchi, et al. (2009). "Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow." J Exp Med **206**(11): 2483-96.
Morrison, S. J., N. Uchida, et al. (1995). "The biology of hematopoietic stem cells." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 35-71.
Morrison, S. J., D. E. Wright, et al. (1997). "Cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor induces hematopoietic stem cells to proliferate prior to mobilization." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 1908-13.

Muraglia, A., R. Cancedda, et al. (2000). "Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model." J Cell Sci **113 (Pt 7)**: 1161-6.

Murphy, P. M., M. Baggiolini, et al. (2000). "International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors." Pharmacol Rev **52**(1): 145-76.

Murray, L. J., E. Bruno, et al. (1999). "CD109 is expressed on a subpopulation of CD34+ cells enriched in hematopoietic stem and progenitor cells." Exp Hematol **27**(8): 1282-94.

Nagasawa, T., S. Hirota, et al. (1996a). "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1." Nature **382**(6592): 635-8.

Nagasawa, T., S. Hirota, et al. (1996b). "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1." Nature **382**(6592): 635-8.

Nagase, H., R. Visse, et al. (2006). "Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs." Cardiovasc Res **69**(3): 562-73.

Naiyer, A. J., D. Y. Jo, et al. (1999). "Stromal derived factor-1-induced chemokinesis of cord blood CD34(+) cells (long-term culture-initiating cells) through endothelial cells is mediated by E-selectin." Blood **94**(12): 4011-9.

Nakahata, T., A. J. Gross, et al. (1982). "A stochastic model of self-renewal and commitment to differentiation of the primitive hemopoietic stem cells in culture." J Cell Physiol **113**(3): 455-8.

Nakahata, T. and M. Ogawa (1982). "Identification in culture of a class of hemopoietic colony-forming units with extensive capability to self-renew and generate multipotential hemopoietic colonies." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(12): 3843-7.

Nakamura, Y., F. Arai, et al. (2010). "Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells." Blood **116**(9): 1422-32.

Nilsson, S. K., M. S. Dooner, et al. (1997). "Potential and distribution of transplanted hematopoietic stem cells in a nonablated mouse model." Blood **89**(11): 4013-20.

Nilsson, S. K., D. N. Haylock, et al. (2003). "Hyaluronan is synthesized by primitive hemopoietic cells, participates in their lodgment at the endosteum following transplantation, and is involved in the regulation of their proliferation and differentiation in vitro." Blood **101**(3): 856-62.

Nilsson, S. K., H. M. Johnston, et al. (2001). "Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches." Blood **97**(8): 2293-9.

Nilsson, S. K., H. M. Johnston, et al. (2005). "Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells." Blood **106**(4): 1232-9.

Noe, V., B. Fingleton, et al. (2001). "Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1." J Cell Sci **114**(Pt 1): 111-118.

Oberlin, E., A. Amara, et al. (1996). "The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1." Nature **382**(6594): 833-5.

Ogata, Y., J. J. Enghild, et al. (1992). "Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9." J Biol Chem **267**(6): 3581-4.

Oostendorp, R. A. and P. Dormer (1997). "VLA-4-mediated interactions between normal human hematopoietic progenitors and stromal cells." Leuk Lymphoma **24**(5-6): 423-35.

Oostendorp, R. A., G. Reisbach, et al. (1995). "VLA-4 and VCAM-1 are the principal adhesion molecules involved in the interaction between blast colony-forming cells and bone marrow stromal cells." Br J Haematol **91**(2): 275-84.

Opdenakker, G., P. E. Van den Steen, et al. (2001). "Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions." Trends Immunol **22**(10): 571-9.

Osawa, M., K. Hanada, et al. (1996). "Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell." Science **273**(5272): 242-5.

Osborn, L., C. Hession, et al. (1989). "Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes." Cell **59**(6): 1203-11.

Oswald, J., S. Boxberger, et al. (2004). "Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro." Stem Cells **22**(3): 377-84.

Papayannopoulou, T. (2003). "Bone marrow homing: the players, the playfield, and their evolving roles." Curr Opin Hematol **10**(3): 214-9.

Papayannopoulou, T., C. Craddock, et al. (1995). "The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9647-51.

Papayannopoulou, T. and B. Nakamoto (1993). "Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA4 integrin." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(20): 9374-8.

Papayannopoulou, T., G. V. Priestley, et al. (1998). "Anti-VLA4/VCAM-1-induced mobilization requires cooperative signaling through the kit/mkit ligand pathway." Blood **91**(7): 2231-9.

Papayannopoulou, T., G. V. Priestley, et al. (2001a). "Molecular pathways in bone marrow homing: dominant role of alpha(4)beta(1) over beta(2)-integrins and selectins." Blood **98**(8): 2403-11.

Papayannopoulou, T., G. V. Priestley, et al. (2001b). "Synergistic mobilization of hemopoietic progenitor cells using concurrent beta1 and beta2 integrin blockade or beta2-deficient mice." Blood **97**(5): 1282-8.

Pardal, R., M. F. Clarke, et al. (2003). "Applying the principles of stem-cell biology to cancer." Nat Rev Cancer **3**(12): 895-902.

Park, I. K., D. Qian, et al. (2003). "Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells." Nature **423**(6937): 302-5.

Peault, B. and M. Tavian (2003). "Hematopoietic stem cell emergence in the human embryo and fetus." Ann N Y Acad Sci **996**: 132-40.

Pei, D., G. Majmudar, et al. (1994). "Hydrolytic inactivation of a breast carcinoma cell-derived serpin by human stromelysin-3." J Biol Chem **269**(41): 25849-55.

Peled, A., V. Grabovsky, et al. (1999). "The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow." J Clin Invest **104**(9): 1199-211.

Peled, A., O. Kollet, et al. (2000). "The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice." Blood **95**(11): 3289-96.

Pelus, L. M., H. Bian, et al. (2004). "Neutrophil-derived MMP-9 mediates synergistic mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells by the combination of G-CSF and the chemokines GRObeta/CXCL2 and GRObetaT/CXCL2delta4." Blood **103**(1): 110-9.

Pereira, R. F., K. W. Halford, et al. (1995). "Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(11): 4857-61.

Peschle, C., R. Botta, et al. (2001). "Purification and functional assay of pluripotent hematopoietic stem cells." Rev Clin Exp Hematol **5**(1): 3-14.

Petit, I., M. Szyper-Kravitz, et al. (2002). "G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4." Nat Immunol **3**(7): 687-94.

Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-7.

Ploemacher, R. E., J. P. van der Sluijs, et al. (1991). "Use of limiting-dilution type long-term marrow cultures in frequency analysis of marrow-repopulating and spleen colony-forming hematopoietic stem cells in the mouse." Blood **78**(10): 2527-33.

Ploemacher, R. E., J. P. van der Sluijs, et al. (1989). "An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse." Blood **74**(8): 2755-63.

Polakis, P. (2000). "Wnt signaling and cancer." Genes Dev **14**(15): 1837-51.

Polette, M., B. Nawrocki-Raby, et al. (2004). "Tumour invasion and matrix metalloproteinases." Crit Rev Oncol Hematol **49**(3): 179-86.

Ponomaryov, T., A. Peled, et al. (2000). "Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function." J Clin Invest **106**(11): 1331-9.

Potten, C. S. and M. Loeffler (1990). "Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt." Development **110**(4): 1001-20.

Pountos, I. and P. V. Giannoudis (2005). "Biology of mesenchymal stem cells." Injury **36 Suppl 3**: S8-S12.

Powell, W. C., B. Fingleton, et al. (1999). "The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis." Curr Biol **9**(24): 1441-7.

Prockop, D. J. (1997). "Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues." Science **276**(5309): 71-4.

Prosper, F., D. Stroncek, et al. (1998). "Mobilization and homing of peripheral blood progenitors is related to reversible downregulation of alpha4 beta1 integrin expression and function." J Clin Invest **101**(11): 2456-67.

Pruijt, J. F., W. E. Fibbe, et al. (1999a). "Prevention of interleukin-8-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by inhibitory antibodies against the metalloproteinase gelatinase B (MMP-9)." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(19): 10863-8.

Pruijt, J. F., Y. van Kooyk, et al. (1998). "Anti-LFA-1 blocking antibodies prevent mobilization of hematopoietic progenitor cells induced by interleukin-8." Blood **91**(11): 4099-105.

Pruijt, J. F., Y. van Kooyk, et al. (1999b). "Murine hematopoietic progenitor cells with colony-forming or radioprotective capacity lack expression of the beta 2-integrin LFA-1." Blood **93**(1): 107-12.

Pruijt, J. F., R. Willemze, et al. (1999c). "Mechanisms underlying hematopoietic stem cell mobilization induced by the CXC chemokine interleukin-8." Curr Opin Hematol **6**(3): 152-8.

Pruijt, J. F., R. Willemze, et al. (1999d). "Mechanisms underlying hematopoietic stem cell mobilization induced by the CXC chemokine interleukin-8." Curr Opin Hematol **6**(3): 152-8.

Puch, S., S. Armeanu, et al. (2001). "N-cadherin is developmentally regulated and functionally involved in early hematopoietic cell differentiation." J Cell Sci **114**(Pt 8): 1567-77.

Puri, M. C. and A. Bernstein (2003). "Requirement for the TIE family of receptor tyrosine kinases in adult but not fetal hematopoiesis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(22): 12753-8.

Qi, H., D. J. Aguiar, et al. (2003). "Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3305-10.

Qian, H., N. Buza-Vidas, et al. (2007). "Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells." Cell Stem Cell **1**(6): 671-84.

Rafii, S., F. Shapiro, et al. (1995). "Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors." Blood **86**(9): 3353-63.

Ramos-DeSimone, N., E. Hahn-Dantona, et al. (1999). "Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion." J Biol Chem **274**(19): 13066-76.

Ramsfjell, V., O. J. Borge, et al. (1996). "Thrombopoietin, but not erythropoietin, directly stimulates multilineage growth of primitive murine bone marrow progenitor cells in synergy with early acting cytokines: distinct interactions with the ligands for c-kit and FLT3." Blood **88**(12): 4481-92.

Remy-Martin, J. P., A. Marandin, et al. (1999). "Vascular smooth muscle differentiation of murine stroma: a sequential model." Exp Hematol **27**(12): 1782-95.

Renstrom, J., M. Kroger, et al. (2009). "How the niche regulates hematopoietic stem cells." Chem Biol Interact **184**(1-2): 7-15.

Reya, T., A. W. Duncan, et al. (2003). "A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells." Nature **423**(6938): 409-14.

Rice, G. E. and M. P. Bevilacqua (1989). "An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion." Science **246**(4935): 1303-6.

Rice, G. E., J. M. Munro, et al. (1991). "Vascular and nonvascular expression of INCAM-110. A target for mononuclear leukocyte adhesion in normal and inflamed human tissues." Am J Pathol **138**(2): 385-93.

Richards, M., S. P. Tan, et al. (2004). "The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE." Stem Cells **22**(1): 51-64.

Riches, K., M. E. Morley, et al. (2009). "Chronic hypoxia inhibits MMP-2 activation and cellular invasion in human cardiac myofibroblasts." J Mol Cell Cardiol **47**(3): 391-9.

Roberts, A. W., C. Kim, et al. (1999). "Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense." Immunity **10**(2): 183-96.

Roberts, A. W. and D. Metcalf (1995). "Noncycling state of peripheral blood progenitor cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor and other cytokines." Blood **86**(4): 1600-5.

Robinson, S. N., V. M. Pisarev, et al. (2003). "Use of matrix metalloproteinase (MMP)-9 knockout mice demonstrates that MMP-9 activity is not absolutely required for G-CSF or Flt-3 ligand-induced hematopoietic progenitor cell mobilization or engraftment." Stem Cells **21**(4): 417-27.

Robledo, M. M., F. Sanz-Rodriguez, et al. (1998). "Differential use of very late antigen-4 and -5 integrins by hematopoietic precursors and myeloma cells to adhere to transforming growth factor-beta1-treated bone marrow stroma." J Biol Chem **273**(20): 12056-60.

Rochet, N., J. Dubousset, et al. (1999). "Establishment, characterisation and partial cytokine expression profile of a new human osteosarcoma cell line (CAL 72)." Int J Cancer **82**(2): 282-5.

Rodriguez-Frade, J. M., A. J. Vila-Coro, et al. (1999). "The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3628-33.

Roecklein, B. A. and B. Torok-Storb (1995). "Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes." Blood **85**(4): 997-1005.

Romanov, Y. A., V. A. Svintsitskaya, et al. (2003). "Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord." Stem Cells **21**(1): 105-10.

Rood, P. M., W. R. Gerritsen, et al. (1999). "Adhesion of hematopoietic progenitor cells to human bone marrow or umbilical vein derived endothelial cell lines: a comparison." Exp Hematol **27**(8): 1306-14.

Rosenfeld, C. S., B. Bolwell, et al. (1996). "Comparison of four cytokine regimens for mobilization of peripheral blood stem cells: IL-3 alone and combined with GM-CSF or G-CSF." Bone Marrow Transplant **17**(2): 179-83.

Rossbach, H. C., L. Krizanac-Bengez, et al. (1996). "An antibody to CD44 enhances hematopoiesis in long-term marrow cultures." Exp Hematol **24**(2): 221-7.

Rothlein, R., M. Czajkowski, et al. (1988). "Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines. Regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies." J Immunol **141**(5): 1665-9.

Rubinson, D. A., C. P. Dillon, et al. (2003). "A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference." Nat Genet **33**(3): 401-6.

Sacchetti, B., A. Funari, et al. (2007). "Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment." Cell **131**(2): 324-36.

Salingcarnboriboon, R., H. Yoshitake, et al. (2003). "Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property." Exp Cell Res **287**(2): 289-300.

Sato, T., J. H. Laver, et al. (1999). "Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells." Blood **94**(8): 2548-54.

Scherr, M., K. Battmer, et al. (2003). "Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA." Cell Cycle **2**(3): 251-7.

Schofield, K. P., M. J. Humphries, et al. (1998). "The effect of alpha4 beta1-integrin binding sequences of fibronectin on growth of cells from human hematopoietic progenitors." Blood **91**(9): 3230-8.

Schofield, K. P., G. Rushton, et al. (1997). "Influence of interleukin-3 and other growth factors on alpha4beta1 integrin-mediated adhesion and migration of human hematopoietic progenitor cells." Blood **90**(5): 1858-66.

Schofield, R. (1978). "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell." Blood Cells **4**(1-2): 7-25.

Schols, D., P. Proost, et al. (1998). "CD26-processed RANTES(3-68), but not intact RANTES, has potent anti-HIV-1 activity." Antiviral Res **39**(3): 175-87.

Schwartz, M. A., M. D. Schaller, et al. (1995). "Integrins: emerging paradigms of signal transduction." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 549-99.

Schweitzer, C. M., C. E. van der Schoot, et al. (1995). "Isolation and culture of human bone marrow endothelial cells." Exp Hematol **23**(1): 41-8.

Schweitzer, K. M., A. M. Drager, et al. (1996). "Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues." Am J Pathol **148**(1): 165-75.

Schweitzer, K. M., P. Vicart, et al. (1997). "Characterization of a newly established human bone marrow endothelial cell line: distinct adhesive properties for hematopoietic progenitors compared with human umbilical vein endothelial cells." Lab Invest **76**(1): 25-36.

Seiki, M. (2002). "The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration." Curr Opin Cell Biol **14**(5): 624-32.

Semerad, C. L., M. J. Christopher, et al. (2005). "G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow." Blood **106**(9): 3020-7.

Shen, H., T. Cheng, et al. (2001). "CXCR-4 desensitization is associated with tissue localization of hemopoietic progenitor cells." J Immunol **166**(8): 5027-33.

Shirozu, M., T. Nakano, et al. (1995). "Structure and chromosomal localization of the human stromal cell- derived factor 1 (SDF1) gene." Genomics **28**(3): 495-500.

Shirvaikar, N., L. A. Marquez-Curtis, et al. (2010). "MT1-MMP association with membrane lipid rafts facilitates G-CSF--induced hematopoietic stem/progenitor cell mobilization." Experimental Hematology **38**(9): 823-835.

Sieff, C., D. Bicknell, et al. (1982). "Changes in cell surface antigen expression during hemopoietic differentiation." Blood **60**(3): 703-13.

Simmons, P. J., G. W. Aylett, et al. (1994). "c-kit is expressed by primitive human hematopoietic cells that give rise to colony-forming cells in stroma-dependent or cytokine-supplemented culture." Exp Hematol **22**(2): 157-65.

Simmons, P. J., J. P. Levesque, et al. (1997). "Adhesion molecules in haemopoiesis." Baillieres Clin Haematol **10**(3): 485-505.

Simmons, P. J., B. Masinovsky, et al. (1992). "Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells." Blood **80**(2): 388-95.

Sitnicka, E., Q. R. Wang, et al. (1995). "Support versus inhibition of hematopoiesis by two characterized stromal cell types." Stem Cells **13**(6): 655-65.

Skillington, J., L. Choy, et al. (2002). "Bone morphogenetic protein and retinoic acid signaling cooperate to induce osteoblast differentiation of preadipocytes." J Cell Biol **159**(1): 135-46.

Smadja-Joffe, F., R. S. Charrad, et al. (1998). "CD44 et Hématopoïèse." Hématologie **4**(5): 339-49.

Solar, G. P., W. G. Kerr, et al. (1998). "Role of c-mpl in early hematopoiesis." Blood **92**(1): 4-10.

Son, B. R., L. A. Marquez-Curtis, et al. (2006). "Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases." Stem Cells **24**(5): 1254-64.

Spangrude, G. J., S. Heimfeld, et al. (1988). "Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells." Science **241**(4861): 58-62.

Sparrow, R. L. and N. Williams (1986). "The pattern of HLA-DR and HLA-DQ antigen expression on clonable subpopulations of human myeloid progenitor cells." Blood **67**(2): 379-84.

Spradling, A., D. Drummond-Barbosa, et al. (2001). "Stem cells find their niche." Nature **414**(6859): 98-104.

Springael, J. Y., E. Urizar, et al. (2005). "Dimerization of chemokine receptors and its functional consequences." Cytokine Growth Factor Rev **16**(6): 611-23.

Springer, T. A. (1994). "Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm." Cell **76**(2): 301-14.

Srour, E. F., J. E. Brandt, et al. (1991). "Human CD34+ HLA-DR- bone marrow cells contain progenitor cells capable of self-renewal, multilineage differentiation, and long-term in vitro hematopoiesis." Blood Cells **17**(2): 287-95.

Stier, S., Y. Ko, et al. (2005). "Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size." J Exp Med **201**(11): 1781-91.

Strongin, A. Y., I. Collier, et al. (1995). "Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease." J Biol Chem **270**(10): 5331-8.

Suda, T., F. Arai, et al. (2005). "Hematopoietic stem cells and their niche." Trends Immunol **26**(8): 426-33.

Suda, T., J. Suda, et al. (1984). "Disparate differentiation in mouse hemopoietic colonies derived from paired progenitors." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(8): 2520-4.

Suda, T., J. Suda, et al. (1985). "Permissive role of interleukin 3 (IL-3) in proliferation and differentiation of multipotential hemopoietic progenitors in culture." J Cell Physiol **124**(2): 182-90.

Sugiyama, T., H. Kohara, et al. (2006). "Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches." Immunity **25**(6): 977-88.

Sutherland, H. J., C. J. Eaves, et al. (1989). "Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro." Blood **74**(5): 1563-70.

Sweeney, E. A., H. Lortat-Jacob, et al. (2002). "Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem/progenitor cells." Blood **99**(1): 44-51.

Szilvassy, S. J., T. E. Meyerrose, et al. (2001). "Homing and engraftment defects in ex vivo expanded murine hematopoietic cells are associated with downregulation of beta1 integrin." Exp Hematol **29**(12): 1494-502.

Taichman, R., M. Reilly, et al. (2001). "Hepatocyte growth factor is secreted by osteoblasts and cooperatively permits the survival of haematopoietic progenitors." Br J Haematol **112**(2): 438-48.

Taichman, R. S. and S. G. Emerson (1994). "Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor." J Exp Med **179**(5): 1677-82.

Taichman, R. S. and S. G. Emerson (1998). "The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment." Stem Cells **16**(1): 7-15.

Taichman, R. S., M. J. Reilly, et al. (1996). "Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures." Blood **87**(2): 518-24.

Taipale, J. and P. A. Beachy (2001). "The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer." Nature **411**(6835): 349-54.

Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell **126**(4): 663-76.

Takamatsu, Y., P. J. Simmons, et al. (1998). "Dual control by divalent cations and mitogenic cytokines of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrin avidity expressed by human hemopoietic cells." Cell Adhes Commun **5**(5): 349-66.

Taranger, C. K., A. Noer, et al. (2005). "Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells." Mol Biol Cell **16**(12): 5719-35.

Tavassoli, M. and A. Friedenstein (1983). "Hemopoietic stromal microenvironment." Am J Hematol **15**(2): 195-203.

Tavassoli, M. and C. L. Hardy (1990). "Molecular basis of homing of intravenously transplanted stem cells to the marrow." Blood **76**(6): 1059-70.

Tavor, S., I. Petit, et al. (2004). "CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice." Cancer Res **64**(8): 2817-24.

Teixido, J., M. E. Hemler, et al. (1992). "Role of beta 1 and beta 2 integrins in the adhesion of human CD34hi stem cells to bone marrow stroma." J Clin Invest **90**(2): 358-67.

Terstappen, L. W., S. Huang, et al. (1991). "Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells." Blood **77**(6): 1218-27.

Thelen, M. and M. Baggiolini (2001). "Is dimerization of chemokine receptors functionally relevant?" Sci STKE **2001**(104): pe34.

Till, J. E. and E. A. Mac Culloch (1961). "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." Radiation Res **14**: 213.

Till, J. E., E. A. McCulloch, et al. (1964). "A Stochastic Model of Stem Cell Proliferation, Based on the Growth of Spleen Colony-Forming Cells." Proc Natl Acad Sci U S A **51**: 29-36.

Tiscornia, G., O. Singer, et al. (2003). "A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 1844-8.

To, L. B., D. N. Haylock, et al. (1997). "The biology and clinical uses of blood stem cells." Blood **89**(7): 2233-58.

Torok-Storb, B. (1988). "Cellular interactions." Blood **72**(2): 373-85.

Touw, I. and B. Lowenberg (1983). "No stimulative effect of adipocytes on hematopoiesis in long-term human bone marrow cultures." Blood **61**(4): 770-4.

Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.

Trounson, A. (2006). "The production and directed differentiation of human embryonic stem cells." Endocr Rev **27**(2): 208-19.

Trowbridge, J. J., M. P. Scott, et al. (2006). "Hedgehog modulates cell cycle regulators in stem cells to control hematopoietic regeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(38): 14134-9.

Tuli, R., S. Tuli, et al. (2003). "Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone." Stem Cells **21**(6): 681-93.

Tuschl, T., P. D. Zamore, et al. (1999). "Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro." Genes Dev **13**(24): 3191-7.

Twining, S. S. (1994). "Regulation of proteolytic activity in tissues." Crit Rev Biochem Mol Biol **29**(5): 315-83.

Uchida, N., D. He, et al. (1997). "The unexpected G0/G1 cell cycle status of mobilized hematopoietic stem cells from peripheral blood." Blood **89**(2): 465-72.

Ulyanova, T., L. M. Scott, et al. (2005). "VCAM-1 expression in adult hematopoietic and nonhematopoietic cells is controlled by tissue-inductive signals and reflects their developmental origin." Blood **106**(1): 86-94.

Valenzuela-Fernandez, A., T. Planchenault, et al. (2002). "Leukocyte elastase negatively regulates Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 binding and functions by amino-terminal processing of SDF- 1 and CXCR4." J Biol Chem **277**(18): 15677-89.

Valtieri, M., D. J. Tweardy, et al. (1987). "Cytokine-dependent granulocytic differentiation. Regulation of proliferative and differentiative responses in a murine progenitor cell line." J Immunol **138**(11): 3829-35.

van der Loo, J. C., X. Xiao, et al. (1998). "VLA-5 is expressed by mouse and human long-term repopulating hematopoietic cells and mediates adhesion to extracellular matrix protein fibronectin." J Clin Invest **102**(5): 1051-61.

van der Lugt, N. M., J. Domen, et al. (1994). "Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene." Genes Dev **8**(7): 757-69.

van Pel, M., R. van Os, et al. (2006). "Serpina1 is a potent inhibitor of IL-8-induced hematopoietic stem cell mobilization." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(5): 1469-74.

Van Wart, H. E. and H. Birkedal-Hansen (1990). "The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(14): 5578-82.

Van Zant, G. and E. Goldwasser (1977). "Simultaneous effects of erythropoietin and colony-stimulating factor on bone marrow cells." Science **198**(4318): 733-5.

Van Zant, G. and E. Goldwasser (1979). "Competition between erythropoietin and colony-stimulating factor for target cells in mouse marrow." Blood **53**(5): 946-65.

Varnum-Finney, B., L. Xu, et al. (2000). "Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling." Nat Med **6**(11): 1278-81.

Vecchi, M., L. A. Rudolph-Owen, et al. (1998). "Tyrosine phosphorylation and proteolysis. Pervanadate-induced, metalloprotease-dependent cleavage of the ErbB-4 receptor and amphiregulin." J Biol Chem **273**(32): 20589-95.

Velders, G. A., J. F. Pruijt, et al. (2002). "Enhancement of G-CSF-induced stem cell mobilization by antibodies against the beta 2 integrins LFA-1 and Mac-1." Blood **100**(1): 327-33.

Verfaillie, C. M. (1992). "Direct contact between human primitive hematopoietic progenitors and bone marrow stroma is not required for long-term in vitro hematopoiesis." Blood **79**(11): 2821-6.

Verfaillie, C. M. (2002). "Hematopoietic stem cells for transplantation." Nat Immunol **3**(4): 314-7.

Vermeulen, M., F. Le Pesteur, et al. (1998). "Role of adhesion molecules in the homing and mobilization of murine hematopoietic stem and progenitor cells." Blood **92**(3): 894-900.

Vila-Coro, A. J., M. Mellado, et al. (1999). "Characterization of RANTES- and aminooxypentane-RANTES-triggered desensitization signals reveals differences in recruitment of the G protein-coupled receptor complex." J Immunol **163**(6): 3037-44.

Visnjic, D., Z. Kalajzic, et al. (2004). "Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency." Blood **103**(9): 3258-64.

Visse, R. and H. Nagase (2003). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." Circ Res **92**(8): 827-39.

Voermans, C., M. L. Kooi, et al. (2001). "In vitro migratory capacity of CD34+ cells is related to hematopoietic recovery after autologous stem cell transplantation." Blood **97**(3): 799-804.

Voermans, C., P. M. Rood, et al. (2000). "Adhesion molecules involved in transendothelial migration of human hematopoietic progenitor cells." Stem Cells **18**(6): 435-43.

Vuillet-Gaugler, M. H., J. Breton-Gorius, et al. (1990). "Loss of attachment to fibronectin with terminal human erythroid differentiation." Blood **75**(4): 865-73.

Wagner, W., C. Roderburg, et al. (2007). "Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors." Stem Cells **25**(10): 2638-47.

Watanabe, T., B. Dave, et al. (1997). "GM-CSF-mobilized peripheral blood CD34+ cells differ from steady-state bone marrow CD34+ cells in adhesion molecule expression." Bone Marrow Transplant **19**(12): 1175-81.

Watts, M. J., A. M. Sullivan, et al. (1997). "Progenitor-cell mobilization after low-dose cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor: an analysis of progenitor-cell quantity and quality and factors predicting for these parameters in 101 pretreated patients with malignant lymphoma." J Clin Oncol **15**(2): 535-46.

Weaver, C. H., B. Hazelton, et al. (1995). "An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after the administration of myeloablative chemotherapy." Blood **86**(10): 3961-9.

Wernig, M., A. Meissner, et al. (2007). "In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state." Nature **448**(7151): 318-24.

Whitelock, J. M., A. D. Murdoch, et al. (1996). "The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases." J Biol Chem **271**(17): 10079-86.

Wieczorek, G., C. Steinhoff, et al. (2003). "Gene expression profile of mouse bone marrow stromal cells determined by cDNA microarray analysis." Cell Tissue Res **311**(2): 227-37.

Willert, K., J. D. Brown, et al. (2003). "Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors." Nature **423**(6938): 448-52.

Williams, A. F. and A. N. Barclay (1988). "The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition." Annu Rev Immunol **6**: 381-405.

Williams, D. A., M. Rios, et al. (1991). "Fibronectin and VLA-4 in haematopoietic stem cell-microenvironment interactions." Nature **352**(6334): 438-41.

Wilson, A., M. J. Murphy, et al. (2004). "c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation." Genes Dev **18**(22): 2747-63.

Winkler, I. G., J. Hendy, et al. (2005). "Serine protease inhibitors serpina1 and serpina3 are down-regulated in bone marrow during hematopoietic progenitor mobilization." J Exp Med **201**(7): 1077-88.

Witte, P. L., L. M. Frantsve, et al. (1993). "Cytokine production and heterogeneity of primary stromal cells that support B lymphopoiesis." Eur J Immunol **23**(8): 1809-17.

Wolf, N. S. and J. J. Trentin (1968). "Hemopoietic colony studies. V. Effect of hemopoietic organ stroma on differentiation of pluripotent stem cells." J Exp Med **127**(1): 205-14.

Woltjen, K., I. P. Michael, et al. (2009). "piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells." Nature **458**(7239): 766-70.

Wright, D. E., E. P. Bowman, et al. (2002). "Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines." J Exp Med **195**(9): 1145-54.

Wright, D. E., A. J. Wagers, et al. (2001). "Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells." Science **294**(5548): 1933-6.

Wu, H., X. Liu, et al. (1995). "Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor." Cell **83**(1): 59-67.

Wysocki, L. J. and V. L. Sato (1978). ""Panning" for lymphocytes: a method for cell selection." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(6): 2844-8.

Xie, Y., T. Yin, et al. (2009). "Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging." Nature **457**(7225): 97-101.

Yamaguchi, M., K. Ikebuchi, et al. (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**(3): 842-8.

Yin, A. H., S. Miraglia, et al. (1997). "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells." Blood **90**(12): 5002-12.

Yokota, T., K. Oritani, et al. (1998). "Growth-supporting activities of fibronectin on hematopoietic stem/progenitor cells in vitro and in vivo: structural requirement for fibronectin activities of CS1 and cell-binding domains." Blood **91**(9): 3263-72.

Yong, K. L., M. Watts, et al. (1998). "Transmigration of CD34+ cells across specialized and nonspecialized endothelium requires prior activation by growth factors and is mediated by PECAM-1 (CD31)." Blood **91**(4): 1196-205.

Yoshida, M., K. Tsuji, et al. (1997). "Thrombopoietin alone stimulates the early proliferation and survival of human erythroid, myeloid and multipotential progenitors in serum-free culture." Br J Haematol **98**(2): 254-64.

Yoshihara, H., F. Arai, et al. (2007). "Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche." Cell Stem Cell **1**(6): 685-97.

Young, H. E., T. A. Steele, et al. (2001). "Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors." Anat Rec **264**(1): 51-62.

Yu, J., K. Hu, et al. (2009). "Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences." Science **324**(5928): 797-801.

Yu, J., M. A. Vodyanik, et al. (2007). "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells." Science **318**(5858): 1917-20.

Yu, Q. and I. Stamenkovic (2000). "Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis." Genes Dev **14**(2): 163-76.

Zamore, P. D., T. Tuschl, et al. (2000). "RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals." Cell **101**(1): 25-33.

Zanjani, E. D., G. Almeida-Porada, et al. (1998). "Human bone marrow CD34- cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells." Exp Hematol **26**(4): 353-60.

Zanjani, E. D., A. W. Flake, et al. (1999). "Homing of human cells in the fetal sheep model: modulation by antibodies activating or inhibiting very late activation antigen-4-dependent function." Blood **94**(7): 2515-22.

Zannettino, A. C., M. C. Berndt, et al. (1995). "Primitive human hematopoietic progenitors adhere to P-selectin (CD62P)." Blood **85**(12): 3466-77.

Zhang, J., C. Niu, et al. (2003). "Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size." Nature **425**(6960): 836-41.

Zhao, H., M. M. Bernardo, et al. (2004). "Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 rgulates pro-MMP-2 activation." J Biol Chem **279**(10): 8592-601.

Ziegler, B. L., M. Valtieri, et al. (1999). "KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells." Science **285**(5433): 1553-8.

Zohren, F., D. Toutzaris, et al. (2008). "The monoclonal anti-VLA-4 antibody natalizumab mobilizes CD34+ hematopoietic progenitor cells in humans." Blood **111**(7): 3893-5.

Zou, Y. R., A. H. Kottmann, et al. (1998). "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development." Nature **393**(6685): 595-9.

Zuckerman, K. S., R. K. Rhodes, et al. (1985). "Inhibition of collagen deposition in the extracellular matrix prevents the establishment of a stroma supportive of hematopoiesis in long-term murine bone marrow cultures." J Clin Invest **75**(3): 970-5.

FIGURE LEGENDS

Figure 1

Effect of G-CSF on *in vitro* trans-stromal migration of hematopoietic cells and role of MMP-2. **(A)** Columns represent the average percentage (and bars SEM) of MO7e cells that migrated through unstimulated, G-CSF- and IL-1β-stimulated MSCs (n=7). **Significant difference when compared to unstimulated MSCs ($p<0.001$). **(B)** Columns represent the average percentage (and bars SEM) of migrated BM CD34+ cells through unstimulated and G-CSF-stimulated MSCs (n=5). *Significant difference when compared to unstimulated MSCs ($p<0.01$). **(C)** Columns represent the average percentage (and bars SEM) of migrated MO7e cells through unstimulated, G-CSF- and IL-1β-stimulated MSCs in the presence of the negative control (in black) or GM 6001 inhibitor (in white) (n=4). *Significant difference when compared to negative control ($p<0.01$). **(D), (E)** Columns represent the average percentage (and bars SEM) of migrated MO7e (D; n=7) and CD34+ (E; n=5) cells through G-CSF-stimulated MSCs in the presence of the blocking anti-MMP-1, anti-MMP-2 or anti-MMP-9 mAbs or of an isotypic negative control mAb (IgG1). */**Significant differences when compared to results with negative control mAb (**$p<0.001$; *$p<0.01$).

Figure 2

MMP-2 and MMP-9 expression in BM MSCs. **(A)** Detection of RNA transcripts for MMP-2 and MMP-9 in unstimulated (unst) and G-CSF-stimulated BM MSCs. Total RNAs were isolated and RT-PCR amplification performed using specific MMP-2, MMP-9 and GAPDH primers. **(B)** Columns represent the average MMP-2 and MMP-9 concentrations (ng/ml) measured by ELISA in MSC supernatants from 3 separated experiments (and bars SEM). ND, not detected. **(C)** Histogram plots show the level of fluorescence intensities assessed by flow cytometry for membrane and intracellular MMP-2 and MMP-9 (red curves) compared to the negative control (green curve). **(D)** Immunofluorescence analysis of human BM MSCs. Cells

were incubated with anti-human MMP-2, MMP-14, ASMA or vimentin mouse Abs, followed by Alexa-488- or Alexa-594-conjugated goat anti-mouse antibody. Nuclei were revealed by DAPI staining. A negative control (no primary Ab) is also included. Preparations were observed with a Leica DMR/HCS fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany). Original magnification x200. Scale bars (in white) represent 50 μm.

Figure 3

Effect of G-CSF on membrane MMP-2 activation. (A), (B), **(C)** Membrane and cytosolic fractions were isolated from BM MSCs, G-CSF-stimulated or unstimulated (unst) for assessment of gelatinolytic activity by zymography. The figure shows zymograms of membrane and cytosolic fractions from 3 experiments (Exp) for MMP-2 **(A,B)** and for MMP-9 **(C).** The HL-60 cell supernatant (SN) was used as positive control for pro- (72 kD) and active (62 kD) MMP-2 and for pro- (92 kD) and active (83 kD) MMP-9. Columns represent the quantification of band densities for each experiment (in relative densitometry units), in white for latent (pro-) MMPs and in black for active MMPs. The percentages indicate the proportion between active and total (latent plus active) MMPs.

Figure 4

G-CSF and G-CSF receptor expression on BM MSCs. Flow cytometric analysis of G-CSF receptor expression on BM MSCs and neutrophils **(A)**. Western blot analysis on membrane extracts of BM MSCs with anti-human G-CSFR **(B)** and G-CSF **(C)** mAbs or anti-β actin mAb, as a control. Human neutrophil membrane extracts were used as a positive control for G-CSFR. Presented results are from one representative experiment (out of 2). The molecular weights of G-CSFR and G-CSF are indicated (97 kD and 19 kD, respectively).

Figure 5

ShRNA down-regulation of G-CSF receptor expression in BM MSCs. ShRNA #1,#2 are controls (1 empty shRNA cloning vector construct, 1 non-effective 29-mer scrambled shRNA cassette pRS vector construct, respectively) and shRNA #3,#4,#5,#6 are directed against different parts of the G-CSFR gene. **(A)** Western blot analysis on membrane extracts of BM MSCs (transfected with shRNA) with anti-human G-CSFR mAbs or anti-β actin mAb, as a control. Human neutrophil membrane extracts were used as a positive control for G-CSFR. Presented results are from one representative experiment (out of 4). The molecular weights of G-CSFR are indicated (97 kD). **(B)** Columns represent the average percentage (and bars SEM) of migrated BM CD34+ cells through unstimulated (in white) and G-CSF-stimulated (in black) MSCs after transfection by shRNA (n=3). *Similar responses in the 3 experiments with shRNA as compared to non tranfected MSCs.