Rôle de la niche mésenchymateuse dans la régulation du phénotype SP des progéniteurs hématopoïétiques humains

Jean-Valère Malfuson

▶ **To cite this version:**

Jean-Valère Malfuson. Rôle de la niche mésenchymateuse dans la régulation du phénotype SP des progéniteurs hématopoïétiques humains. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA11T025 . tel-00956760

HAL Id: tel-00956760

https://theses.hal.science/tel-00956760

Submitted on 7 Mar 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE DE CANCEROLOGIE

DISCIPLINE BIOLOGIE-MEDECINE-SANTE

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 05 juin 2013 à Paris

par

Jean-Valère MALFUSON

UMR-S972, Hôpital Paul Brousse-Villejuif
Laboratoire de recherche du CTSA, Hôpital Percy-Clamart

Rôle de la niche mésenchymateuse dans la régulation du phénotype SP des progéniteurs hématopoïétiques humains

Directeur de thèse : Marie-Caroline LE BOUSSE-KERDILES ; DR2 INSERM ; Unité 972, Hôpital Paul Brousse, Villejuif
Co-directeur de thèse : Jean-Jacques LATAILLADE ; Professeur Agrégé du Val-de-Grâce, CTSA, Clamart

Composition du jury :

Président du jury :	Olivier HERMINE	PUPH (Hôpital Necker, Paris)
Rapporteurs :	Dominique BONNET	Senior Group Leader (London Research Institute, Londres)
	Jorge DOMENECH	PUPH (CHU Bretonneau, Tours)
Examinateurs :	Laure COULOMBEL	DR1 INSERM (Paris)
	Thierry DE REVEL	Professeur Agrégé du Val-de-Grâce (HIA Percy, Clamart)

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier toutes les personnes qui m'ont soutenu au cours de ma thèse, tant sur le plan scientifique que personnel. Sans vous, ce travail n'aurait pu être mené à bien.

A mon épouse, Martine
A ma fille, Chjara
A ma mère, Nicole
Je vous remercie pour votre soutien constant et le bonheur que vous m'apportez.

A mes amis et ma famille

Je remercie chaleureusement les membres de mon jury de thèse :

Mr le **Pr Olivier HERMINE** de me faire l'honneur de juger ma thèse en qualité de président de jury et pour l'intérêt scientifique manifesté.

Mme le **Dr Dominique BONNET** et Mr le **Pr Jorge DOMENECH** de me faire l'honneur de juger ma thèse en qualité de rapporteur et pour l'intérêt scientifique manifesté.

Mme le **Dr Laure COULOMBEL** et Mr le **Pr Thierry de REVEL** de me faire l'honneur de juger ma thèse en qualité de rapporteur et pour l'intérêt scientifique manifesté.

Je remercie mes deux directeurs de thèse, **Marie-Caroline LE BOUSSE-KERDILES** et **Jean-Jacques LATAILLADE**. Vous m'avez fait confiance durant ce long parcours. J'ai pu apprécier vos grandes qualités humaines et scientifiques, amplifiées par votre exceptionnelle complémentarité.

Laboratoire de recherche du Centre de Transfusion Sanguine des Armées

Je remercie **Laetitia BOUTIN** pour son aide indispensable à toutes les étapes de cette thèse, son dynamisme et sa bonne humeur.

Je remercie **Cédric THEPENIER** pour son aide technique et sa disponibilité constante pour des discussions scientifiques toujours très enrichissantes.

Je remercie **Marie PRAT** pour son aide scientifique pendant mes premières années de thèse.

Je remercie également tous les membres du laboratoire de recherche pour leur disponibilité, leur rigueur et leur bonne humeur, qui permettent de travailler dans les meilleures conditions au sein du laboratoire : **Didier, Marina, Juliette, Massimo, Kyle, Frédéric, Christophe, Maïa, Elodie, Muriel, Frédérique, Sandrine, Laurence**.

INSERM U972

Je remercie **Denis CLAY** pour son aide indispensable au cytomètre et sa disponibilité.

Je remercie **Adrienne ANGINOT** pour son aide scientifique et technique sur l'organisation des manips, la stratégie globale et les greffes de souris.

Je remercie **Christophe DESTERKE** pour son aide dans le domaine de la biologie moléculaire, des migrations et des marquages intra-cellulaires.

Je remercie **Frédéric TOROSSIAN** pour son aide à la mise en œuvre des greffes de souris.

Je remercie **Olivier PIERRE-LOUIS** pour m'avoir initié à la technique SP.

Je remercie **Bernadette GUERTON** pour son aide technique sur certaines manips.

Service d'Hématologie, HIA Percy

Je remercie le **Pr Thierry de REVEL** de m'avoir permis de réaliser ce travail et de la confiance qu'il m'a accordée.

Je remercie les cliniciens du Service qui ont du assumer une charge de travail plus conséquente pendant mes périodes au laboratoire : **Johanna KONOPACKI**, **Thierry FAGOT**, **Bertrand SOULEAU**.

ABREVIATIONS

ABC: ATP Binding-Cassette

ABCG2: ABC Group 2

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

ADP: Adénosine DiPhosphate

Ang1: Angiopoïétine-1

APC: Allophycocyanine

ATP: Adénosine Tri-Phosphate

BCRP1: Breast Cancer Resistant Protein 1

BFU-E: Burst Forming Unit-Erythroid

BMPs: Bone Morphogenetic Proteins

Ca^{++}: Ion Calcium

CAFC: Cobblestone Area Forming Cells

CAM-DR: Cell Adhesion Mediated Drug Resistance

CAR: CXCL12-abondant reticular

CaR : Calcium sensing Receptor

CD: Cluster of Differentiation

CDK: Cyclin Dependent Kinase

CFU-E: Colony Forming Unit-Erythroid

CFU-GEMM: Colony Forming Unit-Granulocyte, Erythroid, Macrophage, Megakaryocyte

CFU-GM: Colony Forming Unit-Granulo-Macrophagic

CRU: Competitive Repopulating Unit

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

CSL: Cellule Souche Leucémique

CSM: Cellule Souche Mésenchymateuse

CSPH: Cellules Souches et Progéniteurs hématopoïétiques

CXCL12: C-X-C motif Ligand 12

CXCR4: C-X-C chimiokine Receptor type 4

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: DiMethylSulfOxide

FACS: Fluorescence-activated cell sorting

FITC: Fluoresceine Iso Thio Cyanate

FSC: Forward Scatter

G-CSF: Granulocytic Colony Stimulating Factor

HBSS: Hank´s Balanced Salt Solution

HCELL: Hematopoietic Cell E-/L- selectin Ligand

HIF-1α: Hypoxia-Inducible Factor-1 α

ICAM: Intercellular Cell Adhesion Molecule

IFN-α: Interferon α

IGF: Insulin Growth Factor

IL: InterLeukine

IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Media

KDR: Kinase insert Domain protein Receptor

LAM: Leucémie aiguë myéloblastique

LFA-1: Leukocyte Function Associated-1 Antigen

LIF: Leukemia Inhibitory Factor

Lin^-: Lignage négatif

LSK: Lin^- $Sca\text{-}1^+$ Kit^+

LTC-IC: Long Term Culture-Initiating Cells

LT-SRC: Long Term SCID Repopulating Cell

MDR: Multi-Drug Resistance

MP: Main Population

MPL: Myeloproliferative leukemia virus proto oncogene

NCAD: N-cadhérine

NOD-SCID: Non Obese Diabetic - Severe Combined Immuno-Deficiency

NOD-SCID $\beta 2^{-/-}$: Souris diabétiques non obèses, déficientes en β2 microglobuline

NSG : Souris diabétiques non obèses, déficientes pour la chaine gamma commune

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell

PBS: Phosphate Buffered Saline

PE: PhycoErythrine

PE Cy-5: PhycoErythrine Cyanine-5

PGE2: Prostaglandine E2

PH: Progéniteur hématopoïétique

PI3K: Phosphatidyl Inositol 3-kinase

PTH: Prothèse Totale de Hanche

ROS: Radical Oxygen Species

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

QRT-PCR: Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

SCF: Stem Cell Factor

7-AAD: 7-Amino Actinomycin D

SL-IC: SCID Leukemia Initiating Cell

SNO: Spindle-Shaped N-cadherin^{+} Osteoblastic

SP: Side Population

SRC: SCID Repopulating Cells

SSC: Side SCatter

SVF: Sérum de Veau Foetal

TGF-β: Transforming Growth Factor β

TPO: Trombopoïétine

VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule

VLA: Very Late Antigen

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS **21**

INTRODUCTION **23**

I. GENERALITES SUR L'HEMATOPOIESE **25**

I.1. Ontogénèse de l'hématopoïèse 25

I.2. Notion de CSH et hiérarchie du système hématopoïétique 28

II. CARACTERISATION ET MISE EN EVIDENCE DES CELLULES SOUCHES ET PROGENITEURS HEMATOPOIETIQUES **32**

II.1. Tests fonctionnels 32

II.1.1. Tests *in vitro* 32

II.1.1.1. Tests à court terme 32

II.1.1.2. Tests à long terme 33

II.1.2. Tests *in vivo* 34

II.2. Marqueurs phénotypiques 35

III. REGULATION DES CSH **37**

III.1. Régulation intrinsèque de la quiescence et de l'auto-renouvellement des CSH 38

III.1.1. Régulateurs positifs 38

III.1.1.1. Facteurs de transcription 38

III.1.1.2. Inhibiteurs de cyclin-dependent kinase 39

III.1.1.3. Autres régulateurs positifs de la quiescence 41

III.1.2. Régulateurs négatifs 41

III.2. Régulation épigénétique des CSH 42

III.3. Régulation des CSPH par les niches hématopoïétiques médullaires 44

III.3.1. Les composants cellulaires des niches hématopoïétiques 45

III.3.1.1. Ostéoblastes et concept de niche endostéale 45

III.3.1.2. Cellules endothéliales et concept de niche vasculaire 50

III.3.1.3. Cellules stromales mésenchymateuses et concept de niche périvasculaire 51

III.3.1.4. Autres cellules de la niche hématopoïétique 53

III.3.2. Régulation des niches hématopoïétiques par le système nerveux sympathique 56

III.3.3. Facteurs environnementaux 57

III.3.3.1. Le calcium 57

III.3.3.2. L'oxygène 57

III.3.3.3. Les prostaglandines 58

III.3.3.4. Les protéoglycanes 59

III.3.4. Les niches hématopoïétiques « spécialisées » 61

III.4. Autres éléments de la régulation extrinsèque des CSPH 61

III.4.1. Les cytokines et chimiokines de l'hématopoïèse 61

III.4.2. La matrice extracellulaire 63

III.4.3. Un point sur les intégrines ... 65
III.4.4. Un point sur le CD44 ... 68
IV. LA CIRCULATION DES CSPH ... 70
IV.1. Le homing des CSPH ... 70
IV.2. La mobilisation des CSPH ... 74
V. LES CELLULES SP ... 77
V.1. Les cellules hématopoïétiques SP murines. ... 77
V.2. La famille des ABC transporteurs et ABCG2 ... 79
V.2.1. Structure des ABC transporteurs ... 81
V.2.2. Le transporteur ABCG2 ... 83
V.2.2.1. Structure d'ABCG2 ... 83
V.2.2.2. Le gène ABCG2 ... 83
V.2.2.3. Les rôles physiologiques d'ABCG2 ... 85
V.2.2.4. Les substrats d'ABCG2 ... 85
V.3. La fonctionnalité SP : un marqueur des cellules souches hématopoïétiques ? ... 87
V.3.1. Fonction SP et CSPH murins ... 87
V.3.1.1. Les cellules SP: un compartiment cellulaire enrichi en CSH ? ... 87
V.3.1.2. La capacité d'efflux du Hoechst 33342 ; un moyen permettant de distinguer les CSH « myéloïdes » des CSH « lymphoïdes » ? ... 89
V.3.1.3. Régulation de la quiescence et du phénotype SP ... 91
V.3.1.4. ABCG2 et CSPH murins ... 94
V.3.2. Cellules SP dans les différents compartiments hématopoïétiques humains ... 95
V.3.2.1. Fonctionnalité SP et CSPH de foie fœtal ... 95
V.3.2.2. Fonctionnalité SP et CSPH de sang placentaire ... 96
V.3.2.3. Fonctionnalité SP et CSPH médullaires ... 97
V.3.2.4. Fonctionnalité SP et CSPH de sang mobilisé ... 97
V.3.2.5. Fonctionnalité SP et sang périphérique ... 98
V.3.2.6. Fonctionnalité SP et hématopoïèse humaine ; synthèse ... 98
V.3.2.7. ABCG2 et fonctionnalité SP des CSPH humains ... 99
V.3.3. Fonction SP et hémopathies malignes ... 100
V.3.3.1. Leucémies aiguës myéloblastiques ... 100
V.3.3.2. Myélome multiple ... 102
V.3.3.3. Lymphomes ... 102
VI. MICRO-ENVIRONNEMENT MEDULLAIRE ET HEMOPATHIES MALIGNES ... 104
VI.1. Le micro-environnement peut promouvoir / influencer la leucémogénèse ... 104
VI.2. Le micro-environnement protège les cellules leucémiques ... 106
BUT DU TRAVAIL ... 109
MATERIELS ET METHODES ... 113

RESULTATS **117**

I. RESUME DES RESULTATS **119**

II. ARTICLE **122**

DISCUSSION **171**

CONCLUSION **183**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **187**

FIGURES

Figure 1 : Ontogénèse de l'hématopoïèse chez l'homme et la souris 27
Figure 2: Le devenir des CSH 29
Figure 3 : Hiérarchie du système hématopoïétique. 31
Figure 4 : Régulation intrinsèque des CSH, schéma récapitulatif simplifié 40
Figure 5 : Principaux acteurs de la régulation des CSH au contact de la niche ostéoblastique 49
Figure 6 : Les niches hématopoïétiques médullaires 60
Figure 7 : Représentation de la famille des intégrines 67
Figure 8 : Schéma récapitulatif du « homing » des CSPH, ... 73
Figure 9 : Schéma récapitulatif de la mobilisation des CSPH 76
Figure 10 : Les cellules SP hématopoïétiques murines 78
Figure 11 : Structure et fonction des ABC transporteurs 82
Figure 12 : Du gène à la protéine ABCG2 84
Figure 13 : La capacité « souche » des cellules SP est corrélée au gradient d'exclusion du Hoechst 3342 88
Figure 14 : Le gradient d'exclusion du Hoechst 33342 combiné au marqueur CD150 permet de distinguer des sous types de CSH 90
Figure 15 : Régulation de la quiescence et du phénotype SP au contact de la niche endostéale 93
Figure 16 : La fonctionnalité SP, un témoin du statut niché *vs.* circulant des CSPH ? 175
Figure 17 : Modèle de régulation de la fonctionnalité SP par le stroma médullaire humain . 178

TABLES

Tableau 1 : Principales cytokines et chimiokines de l'hématopoïèse 62
Tableau 2 : Principales protéines de la matrice extracellulaire 64
Tableau 3 : Les intégrines et leurs ligands 67
Tableau 4 : Les 7 familles d'ABC transporteurs 80
Tableau 5 : Substrats d'ABCG2 86

AVANT-PROPOS

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont les piliers de l'hématopoïèse, permettant sa pérennité et son adaptation aux contraintes. Outre leurs qualités intrinsèques à l'origine de leurs fonctionnalités, les CSH sont finement régulées par une signalisation extrinsèque provenant du micro-environnement médullaire. A l'instar de l'hématopoïèse normale, les hémopathies ont généralement pour origine une/des cellules souches tumorales, régulées par une signalisation extrinsèque provenant de leur micro-environnement, normal ou pathologique. Le micro-environnement médullaire peut donc promouvoir/influencer la leucémogénèse mais il peut également favoriser la survie des cellules tumorales et les protéger des effets des chimiothérapies.

En tant que clinicien et hématologue, il m'a semblé particulièrement important de comprendre comment l'environnement médullaire participe à la protection des cellules souches quelles soient normales ou leucémiques. C'est donc avec le regard du clinicien que j'ai abordé ce travail de thèse dont l'objectif était d'étudier le rôle du stroma dans la protection des cellules souches. Je me suis plus particulièrement intéressé à leur résistance aux agents toxiques dont les drogues, caractéristique partagée par différents types de cellules souches et objectivée par leur fonctionnalité « *Side Population* » (SP).

J'ai étudié donc la régulation de la fonctionnalité SP des CSPH par le stroma médullaire. Mes travaux ont montré que cette fonctionnalité, qui correspond à un mécanisme d'autoprotection des CSPH, est versatile et dépendante de l'adhésion au stroma des CSPH les plus immatures. Un tel mécanisme de régulation est également mis en évidence dans des blastes de leucémies aiguës myéloblastiques, ouvrant de nouvelles pistes thérapeutiques. Ce travail vient d'être soumis pour publication au journal « Blood ».

J'ai également grandement participé au développement d'un modèle tridimensionnel *in vitro* de niche hématopoïétique médullaire qui permettra d'aborder au mieux le rôle des niches dans la régulation de l'hématopoïèse normale et pathologique. Ce modèle a donné lieu à un brevet déposé le 16 aout 2011.

Enfin, j'ai participé à la mise au point d'une technique associant la fonctionnalité SP et ALDH qui permet d'affiner la caractérisation du compartiment des CSPH. Ce travail a été publié dans « stem cells » (*Pierre-Louis et al. 2009*).

INTRODUCTION

I. GENERALITES SUR L'HEMATOPOIESE

L'hématopoïèse se définit comme l'ensemble des mécanismes qui assurent le renouvellement continu et régulé des différents éléments figurés du sang, c'est à dire les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes. Le renouvellement permanent de ces cellules matures se fait à partir d'un petit nombre de cellules, les cellules souches hématopoïétiques (CSH), qui représentent moins de 1% des cellules mononucléées médullaires (*Fritsch et al. 1995*) et se trouvent essentiellement dans la moelle osseuse, au sein de niches spécifiques. Les CSH donnent naissance à des progéniteurs hématopoïétiques (PH) des lignées lymphoïdes et myéloïdes, lesquels produiront les cellules différenciées fonctionnelles du sang.

I.1. Ontogénèse de l'hématopoïèse

Chez la souris, les premières cellules hématopoïétiques apparaissent au niveau du sac vitellin après 7,25 jours de développement embryonnaire (E7.25), et sont rapidement accompagnées de cellules endothéliales pour former les « ilôts sanguins » (*Palis et al. 1999; Ferkowicz and Yoder 2005*). Ces premières cellules hématopoïétiques sont des cellules différenciées, nécessaires à l'oxygénation et la protection de l'embryon en développement : érythroblastes, macrophages, mégacaryocytes (*Palis et al. 1999; Xu et al. 2001*). Les premières CSH, caractérisées par leur capacité d'auto-renouvellement et de reconstitution d'hématopoïèse « multilignée » après greffes primaires et secondaires, sont détectées à partir de E10,5 dans la région aorte-gonades-mésonéphros (AGM) et les artères vitellines et ombilicales (*Muller et al. 1994; Medvinsky and Dzierzak 1996; de Bruijn et al. 2000*). Le foie devient le principal réservoir de CSH à partir de mi gestation jusqu'à ce que ces dernières colonisent la moelle osseuse à compter de E17.

Chez l'homme, l'hématopoïèse primitive apparaît au niveau du sac vitellin 30 jours après la conception et le premières CSH multipotentes apparaissent au niveau de la région AGM vers la quatrième semaine post conception (4SPC), pour initier l'hématopoïèse définitive. L'hématopoïèse migre vers le foie fœtal vers 5SPC puis vers la moelle osseuse vers 12 SPC (*Wang and Wagers 2011*) (figure 1). A la naissance, l'essentiel de l'hématopoïèse humaine est médullaire, à la différence de la souris chez qui persiste pendant quelques semaines une hématopoïèse splénique.

La concordance de temps, chez la souris, entre la détection des CSH au niveau embryonnaire (AGM) et extra-embryonnaire (artères vitellines et ombilicales), alors qu'existe déjà une circulation sanguine pose la question de leur origine anatomique précise. Sur des modèles aviaires et amphibiens, dont le mode de développement embryonnaire (*in ovo* et externe) permet la réalisation de modèles de greffes, l'origine intra-embryonnaire des CSH a pu être démontrée (*Lassila et al. 1978; Turpen et al. 1981*). Ces expériences de greffes ne peuvent être reproduites sur des embryons de mammifères compte tenu de leur développement intra utérin, et les différents modèles expérimentaux développés ne permettent pas de conclure formellement sur l'origine anatomique des CSH chez la souris (*Cumano et al. 2001; Samokhvalov et al. 2007; Ueno and Weissman 2010*).

Que ce soit au niveau du sac vitellin ou de l'AGM, les premières cellules hématopoïétiques sont en relation étroite avec l'endothélium. Il est actuellement suggéré qu'au niveau de l'AGM, les CSH naissent à partir de cellules endothéliales dites « hémogéniques » (*Boisset et al. 2010*).

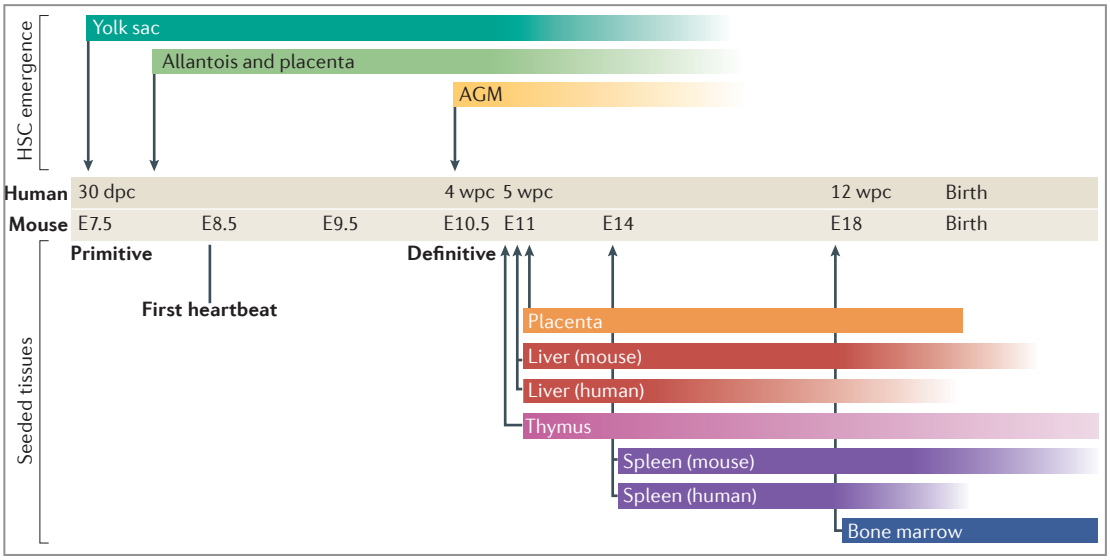


Figure 1 : Ontogénèse de l'hématopoïèse chez l'homme et la souris

d'après Wang *et al. ;* (*Wang and Wagers 2011*)
Dpc = jours post conception
Wpc = semaines post conception

I.2. Notion de CSH et hiérarchie du système hématopoïétique

Les CSH sont définies sur le plan fonctionnel par leur double capacité d'auto-renouvellement et de différenciation multipotente (Figure2). L'auto-renouvellement correspond au processus par lequel, lors de sa division, une CSH donne naissance à au moins une cellule fille ayant gardé un potentiel souche à l'identique. Cette division des CSH peut être symétrique (une CSH donne deux nouvelles CSH) ou asymétrique (une CSH donne une nouvelle CSH et une cellule fille destinée à perdre ses capacités souches). Cette capacité d'auto-renouvellement est donc indispensable au maintien du « pool » global des CSH, ou à la reconstitution des réserves de CSH en cas de perte d'une partie ces dernières après un stress. La capacité de différenciation multipotente caractérise le potentiel des CSH à donner naissance à tous les éléments figurés du sang.

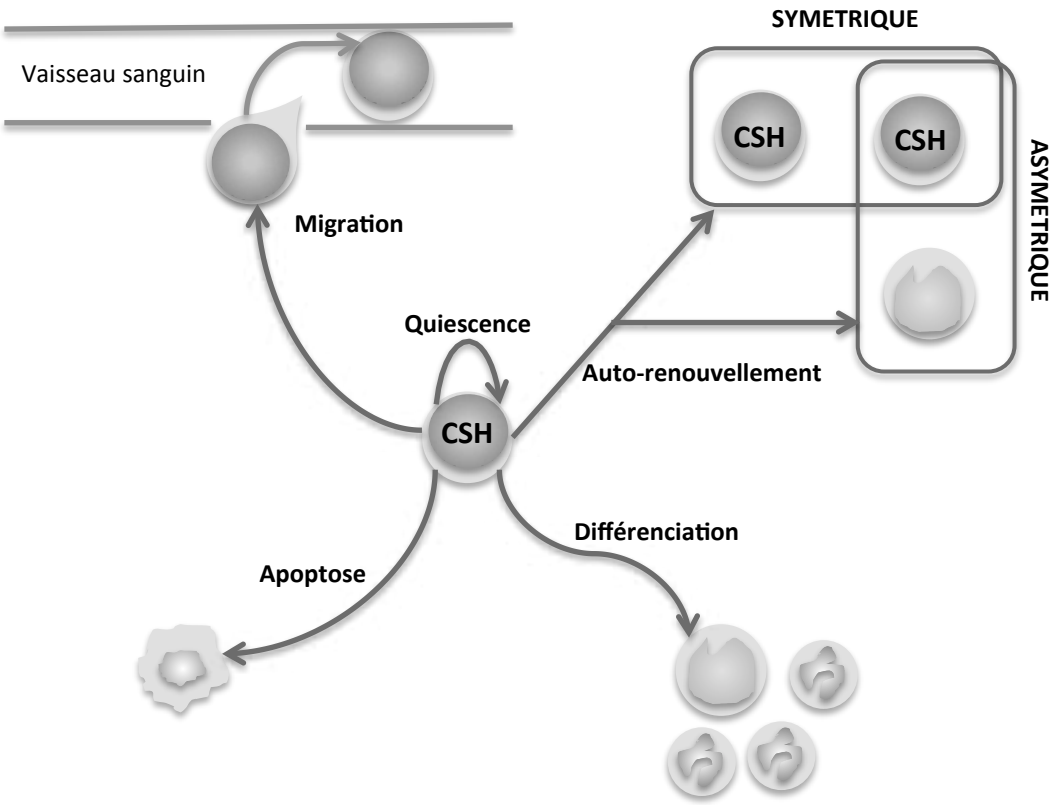


Figure 2: Le devenir des CSH

Pendant ou après la division cellulaire, les deux cellules filles d'une CSH ont plusieurs options : rester des CSH (auto-renouvellement) dans le cadre d'une division symétrique ou asymétrique, entrer en différenciation, entrer en apoptose ou rester en quiescence. Enfin, elles peuvent parfois migrer dans d'autres sites anatomiques intra ou extra-médullaires. ***.*** *Enfin, elles peuvent parfois migrer vers d'autres sites anatomiques intra ou extra-médullaires* (schéma adapté de Blank *et al.* (*Blank et al. 2008*)).

Pendant longtemps le système hématopoïétique a été décrit comme un système organisé de façon hiérarchisée, avec à la base une population rare, les CSH, donnant naissance à des cellules filles qui vont progressivement perdre leur potentiel d'auto-renouvellement et devenir de plus en plus restreintes dans leur capacité de différenciation, jusqu'à devenir des cellules matures et fonctionnelles libérées dans le sang. On a pu ainsi schématiquement définir trois compartiments constitués d'un continuum de cellules de degrés de maturation variables (figure 3) :

- Le compartiment des **cellules souches hématopoïétiques**, situé au sommet de la pyramide, représente un groupe de cellules capables de se différencier vers les différentes lignées hématopoïétiques myéloïdes et lymphoïdes B et T et de reconstituer l'hématopoïèse à long terme chez la souris irradiée. Ces cellules sont douées d'un potentiel d'auto-renouvellement et sont majoritairement quiescentes.
- Le compartiment des **progéniteurs hématopoïétiques** comprend les cellules issues de la différenciation des cellules souches. On y distingue les progéniteurs primitifs, capables d'une prolifération importante et de différenciation vers plusieurs lignées hématopoïétiques et des progéniteurs plus matures, déterminés ou commis vers une, au plus deux, lignées distinctes. Ces cellules ne possèdent plus de capacité d'auto-renouvellement.
- Le compartiment des **précurseurs hématopoïétiques**, capables d'engendrer les cellules matures, morphologiquement reconnaissables sur frottis cellulaire et ne se divisant plus. A la fin de ce processus de maturation médullaire, les cellules hématopoïétiques traversent la barrière endothéliale, quittent la moelle et migrent dans la circulation sanguine.

Ce modèle très hiérarchisé de l'hématopoïèse est imparfait. Des études récentes montrent que la régulation de l'hématopoïèse est beaucoup plus complexe, avec la coopération d'un grand nombre de facteurs de transcription formant différents « modules » de gènes co-exprimés aux différents stades de l'hématopoïèse. Si certains facteurs de transcriptions sont spécifiques de lignée, la plupart sont plus ou moins exprimés dans toutes les lignées au sein de ces « modules » (*Novershtern et al. 2011; Doulatov et al. 2012*).

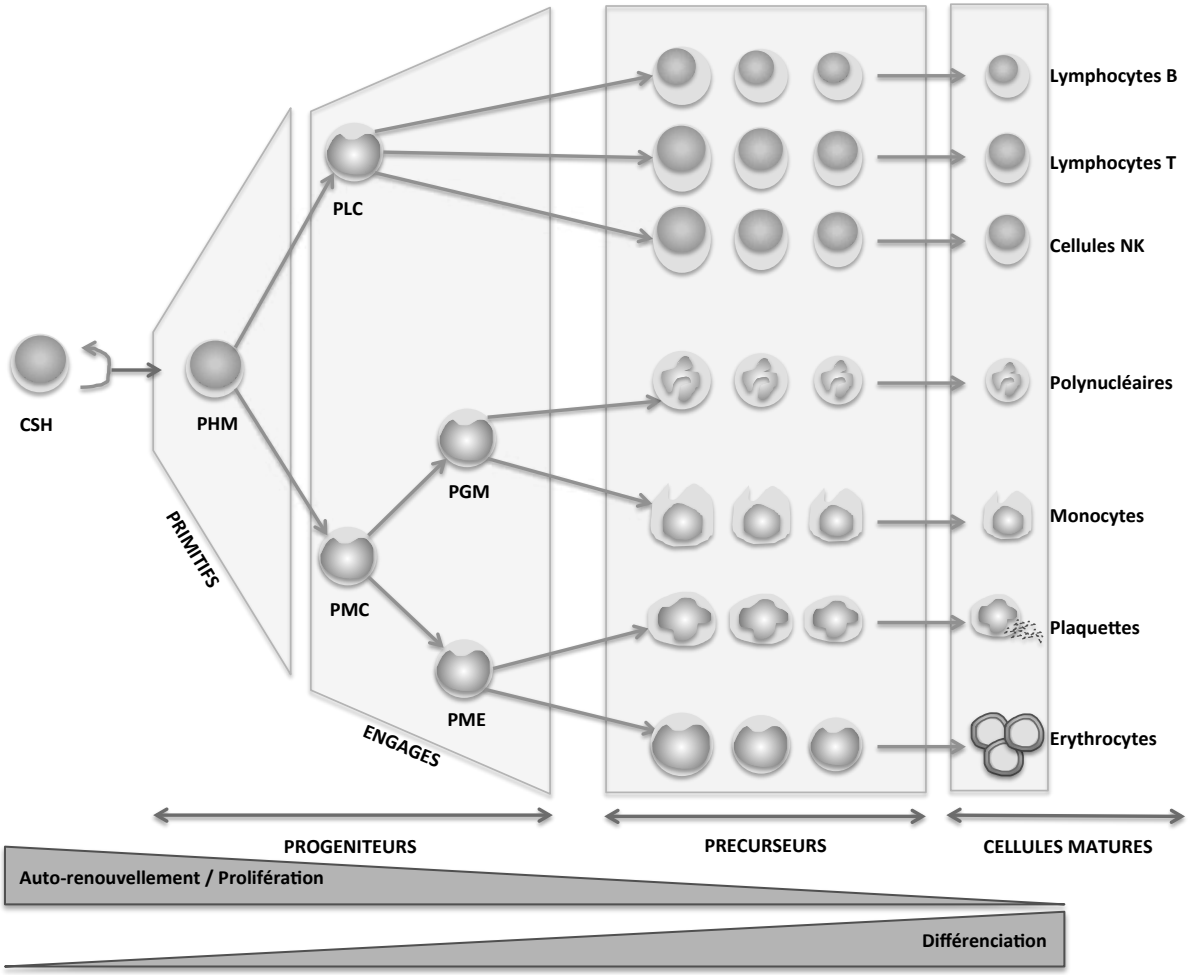


Figure 3 : Hiérarchie du système hématopoïétique.

Outre le compartiment des cellules souches, le système hématopoïétique est très schématiquement divisé en trois autres compartiments, ceux des progéniteurs, des précurseurs et des cellules matures. Le compartiment des progéniteurs peut être scindé en compartiment des progéniteurs immatures et compartiment des progéniteurs engagés. CSH = cellule souche hématopoïétique, PLC = progéniteur lymphoïde commun, PMC = progéniteur myéloïde commun, PGM = progéniteur granuleux-monocytaire, PME = progéniteur mégacaryocytaire-érythrocytaire.

II. CARACTERISATION ET MISE EN EVIDENCE DES CELLULES SOUCHES ET PROGENITEURS HEMATOPOIETIQUES

Le système hématopoïétique est caractérisé par un continuum de cellules avec un phénotype et des propriétés fonctionnelles se modifiant au cours de la différenciation des CSH en cellules différenciées. De nombreux tests, *in vitro* et *in vivo* ont été mis au point pour caractériser le compartiment des CSH et PH primitifs. Ces tests étudient les caractéristiques cardinales de ces cellules : auto-renouvellement, prolifération et différenciation. Ils ne permettent pas d'isoler les CSH, mais d'en étudier leur descendance.

II.1. Tests fonctionnels

II.1.1. Tests *in vitro*

Ces tests peuvent être séparés en tests à court terme et tests à long terme.

II.1.1.1. Tests à court terme

Il s'agit essentiellement des tests de culture en milieux semi-solides qui, dans des conditions bien standardisées, permettent d'identifier et quantifier les progéniteurs déjà engagés vers une lignée. Mis au point en 1966 par Bradley et Metcalf (*Bradley and Metcalf 1966*), ils consistent à cultiver pendant un temps court (2 semaines environ chez l'homme) des cellules hématopoïétiques médullaires ou sanguines dans un support semi-solide constitué de, en présence d'un cocktail adéquat de facteurs de croissance (*Fauser and Messner 1978*). L'identification de ces progéniteurs dits « clonogéniques » en milieu semi-solide répond à la définition de CFU pour « Colony Forming Unit » ou CFC pour « Colony Forming Cell » (*Broxmeyer 1984*).
Ces tests clonogéniques à court terme ne sont pas adaptés pour la détection des progéniteurs les plus immatures qui ne sont pas clonogéniques.

II.1.1.2. Tests à long terme

Ces tests, destinés à révéler les progéniteurs les plus immatures, doivent durer plus de 3 à 5 semaines. Ce délai permet aux PH immatures de compléter leur différenciation et de devenir clonogéniques. Ces tests nécessitent généralement un support stromal qui permet des interactions et la production de facteurs de régulation, « reproduisant » l'effet du micro-environnement médullaire. Deux types de cellules ont été identifiés par ces tests, aussi bien chez la souris que chez l'homme : les LTC-IC pour « Long Term Culture Initiating Cells » et les CAFC pour « Cobblestone Area Forming Cells ». Les LTC-IC sont définies par leur capacité à donner naissance à des cellules filles détectables par des tests clonogéniques, lorsqu'elles ont été cultivées sur un support de cellules stromales (*Dexter et al. 1977; Coulombel et al. 1983*). Les CAFC se développent dans la couche de cellules adhérentes, dans laquelle elles forment des « cobblestone area » caractérisées par un groupe de cellules fortement associées aux cellules stromales (*Ploemacher et al. 1989; Breems et al. 1994*). Initialement, dans les cultures de moelle à long terme, la couche de cellules adhérentes dérivait de CSM médullaires qui prolifèraient *in vitro* (*Dexter et al. 1977*). La présence de LTC-IC dans ces cultures est affirmée par des tests clonogéniques révélant les PH persistants après 5 à 8 semaines de culture (*Sutherland et al. 1989*). La fréquence de ces LTC-IC peut ensuite être évaluée par régression linéaire. Les cultures initiales ont pu être prolongées jusqu'à 10-12 semaines afin d'identifier des cellules à durée de vie encore plus longue, définies comme ELTC-IC (« Extended-LTC-IC ») (*Hao et al. 1996*). Chez l'homme, les CAFC à 6 semaines sont considérées équivalentes aux LTC-IC à 5 semaines (*Pettengell et al. 1994*), alors que les CAFC à 12 semaines correspondraient aux ELTC-IC (*Denning-Kendall et al. 2003*). Un autre test utilise pour la phase initiale un milieu liquide sans stroma où les cellules hématopoïétiques sont cultivées en présence de cytokines recombinantes d'action précoce telles que le « stem cell factor » (SCF), la thrombopoïétine (TPO) et le FLT3-Ligand (*Piacibello et al. 1999*). Ce test parfois appelé « delta assays » permet, au même titre que les tests LTC-IC, de réaliser des études quantitatives et qualitatives en fonction de la durée de la culture et du type de colonies identifiées dans un second temps, par un test clonogénique.

II.1.2. Tests *in vivo*

Ces tests ont permis de hiérarchiser le compartiment des CSPH.

Dans les modèles murins, trois grands groupes de CSPH ont pu être identifiés : 1) cellules à durée de vie courtes de type « CFU-Spleen » 12 jours (CFU-S 12) capables de former des colonies mixtes spléniques 12 jours après greffe de souris irradiées (*McCulloch and Till 1964; Magli et al. 1982*) , 2) pré-CFU-S (*Hodgson and Bradley 1979*) et « marrow repopulating activity » (MRA) (*Lord and Woolford 1993*) mis en évidence dans la moelle osseuse de souris deux semaines après la greffe et caractérisés par leur capacité à former des CFU-S après greffe secondaire, 3) « Long-Term Reconstituing cells » (LTRC) à l'origine de cellules différenciées des lignées myéloïdes et lymphoïdes retrouvées dans la moelle osseuse et les organes lymphoïdes des receveurs plusieurs mois après la greffe (*Jordan and Lemischka 1990*). Plus récemment, la greffe, chez la souris irradiée, d'un nombre limité de cellules syngéniques en compétition avec une population de cellules accessoires, a permis de définir une cellule appelée « Competitive Repopulating Unit » (CRU), capable de produire des cellules différenciées lymphoïdes et myéloïdes 3-4 mois après la greffe. Cette cellule est actuellement considérée comme la plus proche de la CSH (*Szilvassy et al. 1990*).

L'étude des CSPH humains est permise par la réalisation de xénogreffes dans des modèles murins immunodéficients irradiés. Il s'agit en particulier de souris SCID (Severe Combined Immunodeficiency) (*Kamel-Reid and Dick 1988*), NOD-SCID (Severe Combined Immunodeficiency Non Obese Diabetic) (*Larochelle et al. 1996*), ou de modèles également déficients pour l'activité NK tels que les souris NOD-SCID $\beta 2\mu^-$ (invalidées pour le gène de la β2 microglobuline) (*Kollet et al. 2000*) ou les souris NOD-SCID $\gamma c^{-/-}$ (invalidées pour le gène de la chaine γ commune) (*Hiramatsu et al. 2003*) qui permettent une meilleure différenciation T et NK des cellules humaines. Les cellules humaines responsables de la prise de greffe *in vivo* sont définies comme « SCID Repopulating Cells » (SRC). Les « Short Term SRC » (ST-SRC) sont détectées deux semaines après la greffe et disparaissent en 4 à 6 semaines (*Glimm et al. 2001*). La présence de « Long Term SRC » (LT-SRC) est évaluée 8 à 10 semaines après la greffe (*Pflumio et al. 1996; Cashman et al. 1997*). La fréquence de ces SRC peut être évaluée par des expériences de dilution limite. Pour étudier la reconstitution hématopoïétique à long terme, ces modèles sont limités par la durée de vie des souris. La capacité de greffe sériée à des receveurs secondaires et éventuellement tertiaires reste le meilleur test pour établir le potentiel « souche » des cellules hématopoïétiques (*Domen and*

Weissman 1999). Les xénogreffes de cellules humaines chez le fœtus de mouton représentent un modèle de choix pour l'étude de la reconstitution hématopoïétique à long terme mais sont lourds à mettre en œuvre (*Zanjani et al. 1994*).

II.2. Marqueurs phénotypiques

L'analyse par cytométrie en flux de l'expression des antigènes présents à la membrane des cellules hématopoïétiques permet d'identifier différents stades de différenciation au sein du compartiment des CSH et des PH. Il est également possible de les trier afin de disposer de populations plus homogènes, enrichies en CSH. Bien que nos travaux aient concerné uniquement des PH humains, la majorité des études sur les niches hématopoïétiques et les cellules douées de fonctionnalité Side-Population (SP) ayant été réalisées chez la souris, nous allons brièvement décrire la caractérisation des CSPH murins afin de mieux appréhender les différentes études décrites dans cette introduction.

Chez la souris, la combinaison de marqueurs la plus utilisée pour isoler les CSH est l'association d'une expression de c-Kit (recepteur à activité tyrosine kinase du Stem Cell Factor, SCF), du « Stem Cell Antigen-1 » (Sca-1), en l'absence d'expression des marqueurs de différenciation de lignée (Lin^-) (*Morrison et al. 1995*). On parle communément de cellules LSK pour désigner cette purification qui permet d'isoler l'ensemble des CSPH capable de reconstituer une hématopoïèse à long terme (*Uchida and Weissman 1992*). L'expression du CD34 ne peut pas être utilisée de la même manière que chez l'homme car 90% des CSH médullaires de souris adultes sont $CD34^-$(*Osawa et al. 1996; Morel et al. 1998*). L'utilisation des récepteurs de la famille « signalling lymphocyte activation molecule » (SLAM), notamment du marqueur CD150, paraît très efficace pour différencier PH et CSH murines (*Kent et al. 2009; Morita et al. 2010*), particulièrement les combinaisons $CD150^+$ $CD244^-$ $CD48^-$ et $CD150^+$ $CD48^-$ $CD41^-$(*Kiel et al. 2005*). La combinaison de l'ensemble de ces marqueurs en cytométrie en flux permet de purifier une population LSK $CD34^-$, $CD48^-$, $CD150^+$, capable de reconstituer l'ensemble du système hématopoïétique d'hôtes irradiés et de réaliser des greffes sériées (*Purton and Scadden 2007; Wilson et al. 2007*).

Depuis bientôt 30 ans, l'antigène CD34 est le principal marqueur positif des PH et des CSH chez l'homme (*Civin et al. 1984*). Ce marqueur est exprimé sur 1 à 5% des cellules mononucléées médullaires, environ 1% des cellules de sang placentaire et moins de 0,1% des cellules mononucléées du sang périphérique en conditions normales. La plupart des CSH

humaines expriment le CD34 (*Andrews et al. 1992; Larochelle et al. 1996; Zanjani et al. 1997*) cependant, l'essentiel de la fraction $CD34^+$ est composée de PH déjà engagés vers une lignée et les CSH ne représentent qu'une infime sous-population au sein de cette fraction (<1%). D'autres marqueurs sont donc combinés avec le CD34 afin de caractériser plus précisément les PH primitifs. Le CD38 est un marqueur d'intérêt, la majorité des cellules exprimant l'antigène CD34 expriment le CD38. La fraction $CD34^+CD38^+$ correspond à des PH engagés, à l'inverse de la fraction $CD34^+CD38^-$ enrichie en SRC et LTC-IC (*Baum et al. 1992; Larochelle et al. 1996; Petzer et al. 1996*). Les principaux marqueurs positifs combinés avec le CD34 afin d'enrichir la fraction en PH primitifs sont le CD117 (c-Kit) (*Gunji et al. 1993*), le CD90 (Thy-1) (*Baum et al. 1992*) et le CD133 (*Gallacher et al. 2000*). Ainsi, les fractions $Lin^-CD34^{fort}CD38^{-/faible}$, $Lin^-CD34^{fort}CD90^{fort}$, $Lin^-CD34^{fort}CD117^{fort}$, $Lin^-CD34^{fort}CD133^{fort}$ sont enrichies en cellules primitives pluripotentes (LTC-IC ou SRC). Parmi d'autres marqueurs permettant d'identifier les PH primitifs, citons le récepteur de type 2 du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) ou KDR (*Ziegler et al. 1999*). L'expression du CD34 ne permet toutefois pas d'isoler tous les PH primitifs puisqu'il existe une fraction de PH $CD34^-$ capable de greffer dans des modèles murins et ovins et d'être à l'origine de PH $CD34^+$ (*Bhatia et al. 1998; Zanjani et al. 1998; Nakamura et al. 1999; Zanjani et al. 2003*).

III. REGULATION DES CSH

Le maintien de l'homéostasie du système hématopoïétique et son adaptation à toutes les contraintes et stress survenant au long de la vie nécessite une régulation fine, particulièrement au niveau des CSH et des PH immatures. Cette régulation repose sur divers mécanismes.

Les **mécanismes intrinsèques** impliquent des gènes et facteurs de transcription qui peuvent être sous la dépendance de déterminants génétiques, mais également activés en réponse à des signaux du micro-environnement. Ces éléments régulateurs jouent des rôles clés à des étapes spécifiques de la différenciation en stimulant ou en réprimant la transcription en fonction de gènes cibles et c'est l'expression séquentielle de combinaisons spécifiques de gènes et facteurs de transcription qui détermine le processus de différenciation des CSH. A cette régulation transcriptionnelle s'associe une régulation épigénétique. En effet, les facteurs de transcriptions interagissent avec l'ADN en se fixant, grâce à des motifs spécifiques, sur le promoteur des gènes cibles. La régulation épigénétique, en influençant la structure chromatinienne, joue sur l'accessibilité des gènes aux facteurs de transcription (*Rice et al. 2007*).

Les **mécanismes extrinsèques** font intervenir des interactions entre les CSH et le micro-environnement des niches médullaires. Ces interactions peuvent être directes entre les cellules elles mêmes, via des couples de molécules d'adhérence (intégrines, cadhérines…) mais également indirectes par l'intermédiaire de facteurs solubles et membranaires (cytokines, chimiokines), des facteurs environnementaux (tension en oxygène, concentration calcique…) et des éléments de la matrice extra-cellulaire (fibronectines , collagènes, protéoglycanes, laminines…).

Si le rôle de ces différents acteurs de la régulation des CSH a été largement exploré et commence à être mieux connu, il est actuellement difficile de leur attribuer une fonction unique dans la régulation des CSH. Il est en effet très vraisemblable que de multiples combinaisons soient à l'origine de leurs actions finales sur l'hématopoïèse et l'orchestration de cette harmonie au sein des niches reste à préciser.

III.1. Régulation intrinsèque de la quiescence et de l'auto-renouvellement des CSH

L'étude des mécanismes de régulation des CSPH a fait appel à des modèles murins d'activation/inactivation de gènes cibles. Les effets sur ces différents gènes étant soit à l'origine d'une mise en cycle s'accompagnant d'une augmentation de la production de PH et d'une diminution de la réserve de CSH ; soit d'une inhibition du cycle cellulaire s'accompagnant d'une diminution de la production de PH. (Figure 4)

III.1.1. Régulateurs positifs

III.1.1.1. Facteurs de transcription

Parmi les principaux facteurs de transcription intervenant dans cette régulation, nous citerons les principaux. **Gfi-1** est un répresseur de la transcription qui régule négativement p21 (*Gilks et al. 1993; Hock et al. 2004; Zeng et al. 2004*). **Pbx-1** (pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia) est un élément clef de la régulation du développement embryonnaire dont l'inactivation conditionnelle est associée à une diminution du nombre de CSH par défaut de quiescence et d'auto-renouvellement (*DiMartino et al. 2001; Ficara et al. 2008*). Il agirait dans la régulation de la signalisation en aval du TGF-β (*Yamazaki et al. 2009*). La protéine suppressive de tumeurs **p53** régule de nombreux gènes induisant l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et l'apoptose. Elle est fortement exprimée dans les CSH, et sa délétion s'accompagne d'une prolifération (*Dumble et al. 2007; Liu et al. 2009*). Le facteur de transcription **SCL/TAL1** (stem cell leukemia/T-cell acute lymphoblastic leukemia 1) est essentiel au développement des CSH chez l'embryon (*Robb et al. 1995*). Chez l'adulte, il est beaucoup plus exprimé dans les LT-CSH (Long Term CSH) et est impliqué dans le maintien de leur quiescence en régulant la transition G0-G1 (*Lacombe et al. 2010*). **GATA-2** régule la quiescence de CSH murines et de sang placentaire humain, notamment en réduisant l'expression de CDK4 et 6 ainsi que de CCND3 (*Tipping et al. 2009*).

Outre les facteurs ci-dessus, plusieurs autres facteurs de transcription ont été impliqués dans la régulation positive de la quiescence des CSH, citons notamment IRF-2 (interferon regulatory factor-2) (*Sato et al. 2009*), Nurr1 (*Sirin et al. 2010*), JunB (*Santaguida et al. 2009*) et thioredoxin-interactin protein (*Shao et al. 2010*).

III.1.1.2. Inhibiteurs de cyclin-dependent kinase

Ils sont regroupés dans deux grandes familles. La Famille **Cip/Kip** comprend trois protéines p21, p27, p57 qui ont pour fonction de bloquer la transition G1/S en inhibant l'activité du complexe cycline E-CDK2. P57, principal CDK inhibiteur induit par le TGF-β, inhibe également le complexe cycline D-CDK4/6 et est essentiel à la quiescence des CSH (*Scandura et al. 2004; Matsumoto et al. 2011; Pietras et al. 2011*). P21 est surtout impliqué en période de stress (*van Os et al. 2007*). Le rôle de p27 dans les CSH paraît moins important (*Cheng et al. 2000*) . La Famille **Ink4** est composée des CDK inhibiteurs $p15^{Ink4b}$, $p16^{Ink4a}$, $p18^{Ink4c}$ et $p19^{Ink4d}$, tous antagonistes du complexe cycline D-CDK4/6 qui promeut la transition G1/S en phosphorylant les protéines de la famille du rétinoblastome (Rb). $P19^{ARF}$, régulateur positif de p53, n'est pas un CDK inhibiteur et appartient également à cette famille. L'expression de $p16^{Ink4a}$ et $p19^{ARF}$ est physiologiquement réprimée sous le contrôle de Bmi1, dont la délétion entraine une aplasie médullaire par arrêt du cycle cellulaire et apoptose p53 dépendante des CSH (*Lessard and Sauvageau 2003; Park et al. 2003*).

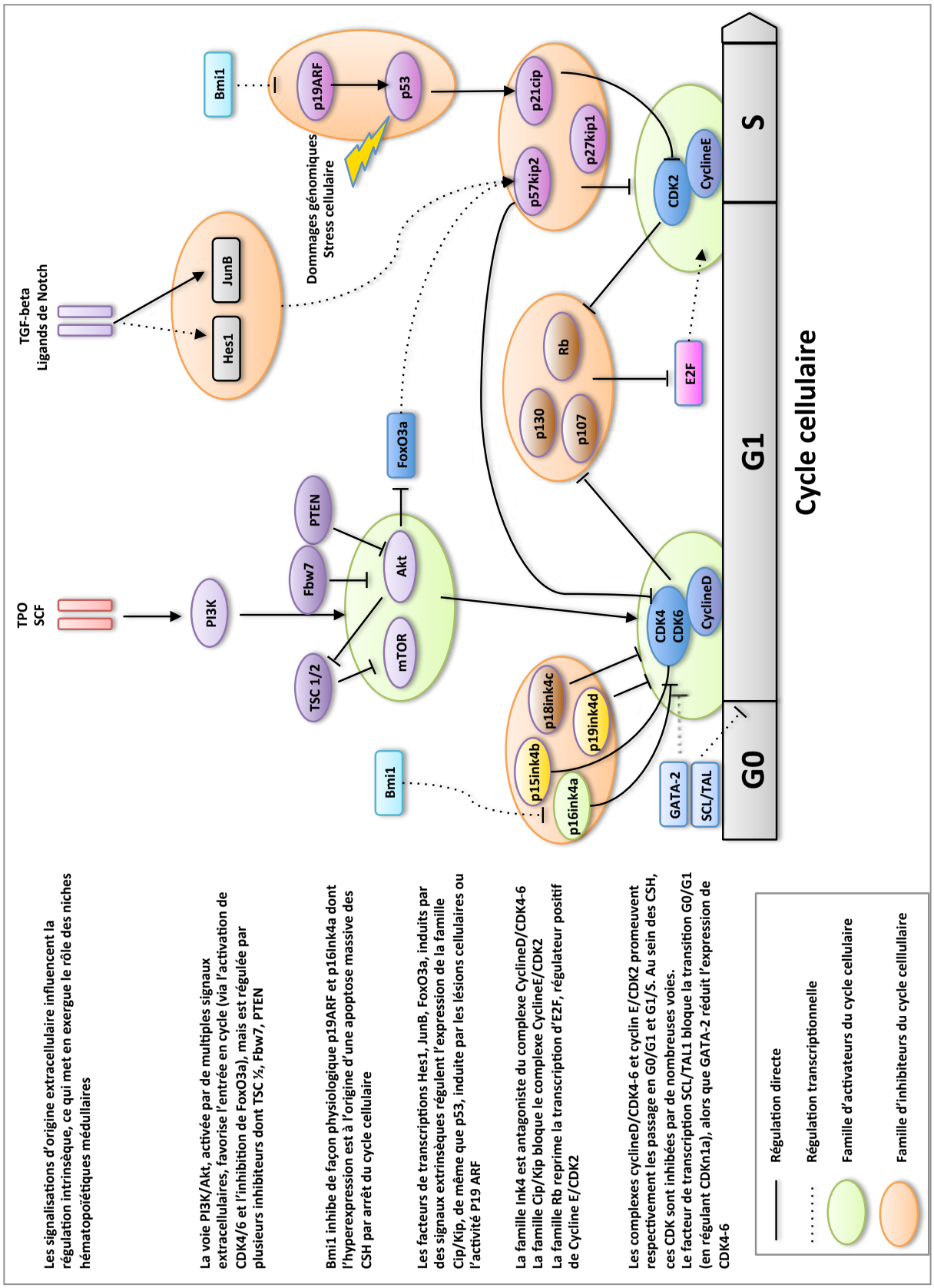


Figure 4 : Régulation intrinsèque des CSH, schéma récapitulatif simplifié

adapté de Pietras et al.(Pietras et al. 2011)

III.1.1.3. Autres régulateurs positifs de la quiescence

La voie de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) est un confluent de plusieurs signaux favorisant prolifération, croissance et survie. Son inhibition est essentielle au maintien de la quiescence et du potentiel d'auto-renouvellement à long terme des CSH (*Warr et al. 2011*). La délétion d'un des inhibiteurs de cette voie était à l'origine d'une prolifération des CSH puis d'un épuisement de l'hématopoïèse par disparition de ces dernières : F-box and W repeat domain containing 7 (**Fbw7**) (*Thompson et al. 2008*), phosphatase and tensin homolog (**pTEN**) (*Zhang et al. 2006*), promyelocytic leukemia protein (**PML**) (*Ito et al. 2008*), tuberous sclerosis 1 (**TSC1**) (*Chen et al. 2008*). Les régulateurs négatifs du niveau reactive oxygen species (ROS) promeuvent la quiescence des CSH, citons **ATM** (*ataxia-telangiectasia-mutated*) et la **famille Fox O** (*Ito et al. 2004*) (*Miyamoto et al. 2007; Tothova et al. 2007*). La proteine Signal transducter and activator of transcription 5 (**STAT5**) a été récemment mise en évidence comme élément de la signalisation intra-cellulaire de MPL (*myeloproliferative leukemia virus proto oncogene*), permettant la quiescence des CSH (*Wang et al. 2009*). Enfin, les protéines de la **Famille Rb** (pRb, p130, p107) limitent l'entrée en cycle en réprimant la transcription d'E2F, un régulateur positif du cycle cellulaire (*Viatour et al. 2008*).

III.1.2. Régulateurs négatifs

Le facteur de transcription **MEF/ELF4** faciliterait l'entrée en cycle des CSH, potentiellement par l'inhibition de p21 (*Lacorazza et al. 2006*). Le gène **Lnk** code pour une protéine adaptatrice impliquée dans la modulation du signal de la Tpo, régulant négativement JAK2 (*Bersenev et al. 2008*). Sa délétion dans les CSH augmente leur quiescence (*Bersenev et al. 2008*). Enfin, le facteur de transcription **c-Myc** regule positivement le cycle cellulaire des CSH, notamment en régulant leur interaction avec les niches hématopoïétiques en influant sur l'expression d'intégrines et de la N-cadherine (NCAD) (*Wilson et al. 2004*).

III.2. Régulation épigénétique des CSH

De multiples facteurs, interconnectés, interviennent dans la régulation du devenir des CSH (quiescence, auto-renouvellement, engagement en différenciation, type de différenciation…). La complexité de ces phénomènes nécessite l'expression/non expression de nombreux gènes à des moments donnés et nécessite une régulation fine. Des profils d'expression géniques spécifiques des CSH ont ainsi été décrits (*Ivanova et al. 2002; Ramalho-Santos et al. 2002*).

La régulation épigénétique, par des modifications de la structure de la chromatine influençant l'accessibilité des facteurs de transcriptions, permet de réguler simultanément l'expression de nombreux gènes et est particulièrement impliquée dans l'hématopoïèse (*Rice et al. 2007*). Ces phénomènes épigénétiques sont essentiellement représentés par des modifications post traductionnelles des histones et des méthylations de promoteurs de gènes. Les modifications post traductionnelles des histones permettent d'orienter de manière réversible le caractère « ouvert » ou « fermé » de la chromatine (euchromatine *vs.* hétérochromatine) et reposent particulièrement sur des phénomènes d'acétylation et de méthylation (*Jaenisch and Bird 2003*). En général, une chromatine hyperacétylée est « ouverte » alors qu'une chromatine déacétylée est fermée. Cette acétylation des histones repose sur des *histone acetyl transférases* alors que la déacétylation est catalysée par quatre familles d'*histone déacétylases* (HDAC). Les phénomènes de méthylation des histones se font sur des résidus lysine ou arginine. Si la méthylation des résidus arginine est plutôt associée à une activation des gènes, la méthylation des résidus lysine a un effet variable (activation/inactivation) selon le type de résidus modifié.

Les phénomènes de méthylation des îlots CpG de l'ADN constituent l'autre principal élément de la régulation épigénétique : la méthylation de l'ADN des promoteurs de gènes permet le recrutement d'HDAC à leur niveau et aboutit à « éteindre » les gènes cibles. La méthylation de l'ADN est catalysée par des *DNA méthyl transferases* (DNMT) : DNMT1 assure le maintien d'un état méthylé, alors que DNMT3a/3b permettent la méthylation *de novo*. Les modifications de structure chromatinienne induites par les mécanismes épigénétiques sont ainsi à l'origine de modifications globales de profils d'expression génique régissant les fonctions et le devenir cellulaires (*Jaenisch and Bird 2003*).

Beaucoup de données sur la régulation épigénétique des cellules souches proviennent de l'étude des cellules souches embryonnaires pluripotentes (CSE). Les CSE sont en effet caractérisées par une chromatine très peu condensée, accessible à de nombreux facteurs de

transcription, et en équilibre dynamique entre une chromatine « ouverte » ou « fermée » (*Eberharter et al. 2005*).

Ces mécanismes de régulation épigénétique concernent également la CSH. Ces dernières expriment peu de gènes spécifiques de lignée avant l'engagement en différenciation et la différenciation s'accompagne d'une diminution progressive de l'accessibilité à la transcription des gènes « multilignée ». Ces modifications d'expression de gènes dans les CSPH pendant leur différenciation ont pu être corrélées à des modifications de structure chromatinienne. Les études de méthylome à haut débit ont montré que la différenciation lignée spécifique était associée à une modulation de la méthylation de l'ADN et que la différenciation myéloïde nécessitait moins de méthylation que la différenciation lymphoïde (*Ji et al. 2010*). Il existe également un profil de méthylation des PH âge-dépendant (*Bocker et al. 2011*). Les CSH humaines présentent par ailleurs un très haut niveau de remodelage chromatinien, traduisant un état « dynamique » d'ouverture/fermeture chromatinienne qui disparaît progressivement avec la différenciation (*Chung et al. 2009*). Ce haut niveau de remodelage chromatinien, caractéristique des cellules souches, leur permettrait de s'adapter rapidement à des stimuli, intrinsèques ou environnementaux (facteurs de transcription, régulation par la niche…), engageant leur devenir (maintien dans un état indifférencié, engagement vers telle ou telle lignée…) (*Oh and Humphries 2012*). Ce caractère « dynamique » de la chromatine se perd au cours de la différenciation, cette dernière devenant progressivement fermée, les PH perdant leur potentiel d'adaptation. Ainsi, les traitements « épigénétiques » n'ont pas le même effet sur les CSH et les PH engagés. L'administration d'agent déméthylants et d'inhibiteurs d'HDAC sur des CSH s'accompagne d'un maintien de l'état indifférencié et d'une augmentation du potentiel d'auto-renouvellement, alors que les mêmes traitements promeuvent l'apoptose lorsqu'ils sont appliqués à des PH engagés (*Chung et al. 2009*). Des études fonctionnelles confirment le rôle de l'épigénétique dans le maintien de la capacité d'auto-renouvellement des CSH puisque des modèles de délétion conditionnelle de DNMT 1, 3a, 3b ont montré que ces délétions sont à l'origine d'une altération des capacités d'auto-renouvellement des CSH (*Tadokoro et al. 2007; Trowbridge et al. 2009*).

III.3. Régulation des CSPH par les niches hématopoïétiques médullaires

Au sein d'un organe, les cellules souches sont localisées dans des sites anatomiques particuliers appelés « niches » (*Moore and Lemischka 2006*). La seule présence de cellules souches en un lieu donné ne suffit cependant pas à définir une niche. Celle-ci doit avoir une réalité fonctionnelle permettant à la cellule souche de se maintenir en quiescence et/ou de s'auto-renouveler sous le contrôle de signaux cellulaires intrinsèques ou extrinsèques. En situation de stress, cette niche est également capable de promouvoir la prolifération et la différenciation cellulaire. Ainsi, les niches à cellules souches correspondent à une entité spatio-temporelle dynamique dans laquelle des évènements de communication intercellulaire doivent se produire au bon endroit et au bon moment, pour contrôler le destin des cellules souches.

Le rôle clé du micro-environnement dans la régulation de l'hématopoïèse a été principalement mis en évidence par des expériences de greffes de CSH chez des souris déficientes pour le gène c-KIT codant pour le récepteur du SCF (Stem Cell Factor) et par des expériences de transgénèse chez la souris (*Thoren et al. 2008*). C'est Schofield qui a le premier proposé le concept de niche hématopoïétique, capable de réguler la survie, la quiescence, l'auto-renouvellement et la différenciation des CSH (*Schofield 1978*). Bien que des avancées significatives dans leur mise en évidence *in vivo* aient été très récemment réalisées, en particulier grâce à des techniques de microscopie intra-vitale (*Lo Celso et al. 2009*), à ce jour, son existence chez l'homme n'a pas encore été expérimentalement démontrée.

III.3.1. Les composants cellulaires des niches hématopoïétiques

III.3.1.1. Ostéoblastes et concept de niche endostéale

Le lien entre os et hématopoïèse est connu depuis la fin des années 1970, avec des travaux montrant qu'en cas de greffe sous cutanée de moelle osseuse non manipulée, la moelle hématopoïétique ne se développait qu'après la formation d'os (*Patt and Maloney 1972*). L'endoste est à l'interface entre l'os et la moelle osseuse. Cette région est tapissée de cellules de la lignée ostéoblastique, d'origine mésenchymateuse, à différents stades de différenciation. Seule une fraction de ces cellules est capable de former de l'os. Les ostéoclastes, d'origine hématopoïétique, impliqués dans la résorption osseuse, sont également présents dans cette région, participant au métabolisme osseux en équilibre avec les ostéoblastes. Le rôle des ostéoblastes comme soutien de l'hématopoïèse *in vitro*, notamment leur capacité à permettre un maintien et une expansion des CSH en co-culture, a été suggéré il y a une vingtaine d'années (*Taichman and Emerson 1998*). Depuis, plusieurs modèles murins *in vivo* confirment le lien entre hématopoïèse et ostéoblastes. Les souris invalidées pour le core binding factor α1 (CBFα1), facteur de transcription précoce de la différenciation ostéoblastique, présentent un défaut de formation osseuse et développent une hématopoïèse extramédullaire (*Deguchi et al. 1999*). En modulant la quantité d'ostéoblastes dans des modèles murins il a été possible de montrer que le nombre de CSH variait parallèlement. Calvi *et al*. ont montré que des souris génétiquement modifiées pour exprimer un récepteur constitutivement activé de la parathormone (PTH) présentaient un nombre augmenté d'ostéoblastes et que cette augmentation des ostéoblastes s'accompagnait d'une augmentation du nombre de CSH (*Calvi et al. 2003*). Visnjic *et al*. ont développé un modèle murin exprimant la thymidine kinase (TK), sous le contrôle du promoteur d'un gène précoce et spécifique de la différenciation ostéoblastique (collagène α1 type I). Ils ont pu montré que le traitement de ces souris par ganciclovir s'accompagnait d'une perte osseuse progressive, associée à une hypocellularité médullaire, une diminution des CSH médullaires et au développement d'une hématopoïèse extramédullaire (*Visnjic et al. 2004*). Ce phénomène est réversible, à l'arrêt du ganciclovir. Lorsque l'expression de la TK est sous le contrôle du promoteur de l'ostéocalcine (exprimée plus tardivement que le collagène α1 type I lors de la différenciation ostéoblastique), le déficit ostéoblastique induit par le ganciclovir n'a pas d'impact sur l'hématopoïèse (*Corral et al. 1998*), traduisant le rôle probable d'ostéoblastes

immatures dans le maintien des CSH. Zhang *et al*. ont également montré, sur des modèles murins avec inactivation conditionnelle du récepteur RIA de la bone morphogenetic protein (BMP), que l'augmentation des ostéoblastes s'accompagnait d'une augmentation des CSH, et que ces CSH étaient au contact d'ostéoblastes immatures exprimant la N-cadhérine (NCAD), appelées cellules SNO (spindle-shaped N-cadherin^{+} osteoblastic) (*Zhang et al. 2003*). De plus, des études récentes utilisant des techniques de microscopie biphotonique *in vivo* sont également en faveur d'une localisation préférentielle des CSH au contact de l'endoste (*Lo Celso et al. 2009; Xie et al. 2009*). Les travaux de Grassinger *et al.* montrent cependant que des CSPH de phénotype LSK CD150^{+} CD48^{-}, sont également retrouvés dans la zone centromédullaire mais celles-ci auraient une capacité de reconstitution hématopoïétique inférieure à celle de CSPH isolés à partir de l'endoste (*Grassinger et al. 2010*).

Ces résultats suggèrent que les ostéoblastes de l'endoste jouent un rôle de niche pour les CSPH. Au sein de cette niche, les CSPH sont au contact de différents médiateurs, solubles ou membranaires, dont le rôle majeur serait le maintien d'un état de quiescence. La figure 5 synthétise les interactions moléculaires entre niche ostéoblastique et CSPH.
Parmi les acteurs clés, citons :

- la voie Notch : les ostéoblastes expriment Jagged, ligand du récepteur Notch exprimé sur les CSH. L'activation de cette voie, *in vitro*, inhibe la différenciation et augmente l'auto-renouvellement des CSH (*Varnum-Finney et al. 2000; Butler et al. 2010*). *In vivo*, les travaux de Calvi *et al.* attribuent l'augmentation des CSH, secondaire à la stimulation d'ostéoblastes par la PTH, à l'hyper-expression de Jagged induite chez ces derniers (*Calvi et al. 2003*). Les souris invalidées pour le gène de Notch2 présentent un défaut de restauration hématopoïétique après chimiothérapie par 5-Fluoro Uracile (5-FU) et une diminution des CSH médullaires avec activité de repopulation (*Varnum-Finney et al. 2011*). Cependant, des études d'invalidation de Notch dans les CSH n'ont pas montré d'anomalie de différenciation ou d'auto-renouvellement (*Mancini et al. 2005; Maillard et al. 2008*). Le rôle de cette voie dans la régulation des CSH reste donc débattu.

- l'ostéopontine : cette glycoprotéine matricielle est exprimée par les ostéoblastes et régule négativement le nombre de CSH médullaires (*Stier et al. 2005*). Elle est impliquée dans la localisation au niveau de l'endoste et le maintien en quiescence des CSH grâce notamment à une adhésion médiée par des intégrines β1 (*Nilsson et al. 2005*). Elle inhibe la prolifération des CSH *in vitro* et *in vivo*, alors que la greffe de cellules LSK à des souris invalidées pour l'ostéopontine s'accompagne d'un défaut de prise de greffe (*Nilsson et al. 2005*). Il s'agit donc d'un élément régulateur favorisant la quiescence des CSH.

- Le SCF membranaire : Le SCF se fixe sur le récepteur à activité tyrosine kinase c-Kit, exprimé sur les CSH douées d'activité LTR. Il en existe deux formes, soluble et membranaire, résultant d'un épissage alternatif. Le SCF membranaire, exprimé à la surface des ostéoblastes, active c-Kit de façon plus puissante et prolongée que la forme soluble (*Flanagan et al. 1991; Lyman and Jacobsen 1998*). L'activation de c-Kit permet d'augmenter l'adhésion des CSH à la niche en induisant l'expression des intégrines VLA4 et 5 (*very late antigen*) (*Kovach et al. 1995*). Les souris hétérozygotes déficientes pour le gène du SCF (Sl/Sl^d) ont un défaut de « homing » et de prise de greffe après injection de CSH (*McCulloch et al. 1965*) ; elles semblent de plus subir un épuisement progressif du pool de CSH avec l'âge puisque la moelle de jeunes souris Sl/Sl^d a une activité LTR normale à l'inverse de celle de souris plus âgées (*Barker 1994; Barker 1997*). Par son interaction directe avec les CSH, Le SCF membranaire semble donc être un acteur majeur du maintien d'une activité « souche » à long terme. Des doutes subsistent toutefois sur son mécanisme d'action car il est également nécessaire à l'activation et la prolifération ostéoblastique. Le SCF membranaire pourrait donc également avoir un rôle indirect en régulant les ostéoblastes.

- La N-cadhérine (NCAD): Il s'agit d'une intégrine homophile calcium dépendante, exprimée à la fois sur les ostéoblastes immatures et matures. Elle participe, par une interaction homotypique NCAD-NCAD, à l'ancrage des CSH aux cellules SNO et à leur maintien en quiescence (*Zhang et al. 2003; Arai et al. 2004*). *In vitro,* Elle favorise le maintien d'une activité LTC-IC lors de co-cultures CSM-CSPH (*Wein et al. 2010*). Enfin, des expériences de greffes de CSH invalidées pour NCAD ont montré un défaut d'ancrage à l'endoste et une diminution de la reconstitution hématopoïétique à long terme (*Hosokawa et al. 2010*). Malgré ces données, le rôle de NCAD reste controversé car les souris déficientes pour le gène codant la NCAD n'ont pas de perturbation de l'hématopoïèse (*Kiel et al. 2009; Bromberg et al. 2012; Greenbaum et al. 2012*).

- La thrombopoïétine (TPO) : les ostéoblastes produisent cette cytokine intervenant principalement dans la mégacaryocytopoïèse. Son récepteur « myeloproliferative leukemia virus proto oncogene » (MPL) est exprimé par les CSH. Le couple TPO/MPL participe à la régulation du cycle cellulaire des CSH au niveau de l'endoste, en favorisant leur maintien en quiescence et l'augmentation de l'expression des intégrines β1 (*Yoshihara et al. 2007*). Ce maintien en quiescence passe par la modulation de $p57^{kip2}$ (inhibiteur de « cyclin dependant kinase ») (*Qian et al. 2007*), et permet le maintien/expansion de la réserve de CSH, puisque les souris invalidées pour le gène de la TPO ou de MPL voient leur nombre de CSH diminuer (*Carver-Moore et al. 1996; Kimura et al. 1998; Qian et al. 2007*).

- L'angiopoïétine 1 (Ang1) : les ostéoblastes sécrètent Ang1 qui interagit avec le récepteur à activité tyrosine kinase Tie2 à la surface des CSH. La signalisation induite par le couple Tie2/Ang1 active les intégrines β1 et la NCAD à la surface de cellules LSK-$Tie2^{+}$, ce qui augmente l'ancrage de ces cellules aux composants cellulaires et matriciels de la niche, favorise leur maintien en quiescence et exerce des effets anti-apoptotiques (*Takakura et al. 1998; Arai et al. 2004*). La quiescence des CSH induite par le couple Tie2/Ang1 permet le maintien de leur activité de repopulation à long terme et les protège d'une chimiothérapie myélotoxique (5-FU) (*Arai et al. 2004; Arai et al. 2005*). Ces effets pourraient être médiés par l'activation de la voie PI3K/AKT qui contrôle plusieurs régulateurs du cycle cellulaire, notamment l'inhibiteur de CDK $p21^{Cip1}$ essentiel à la quiescence des CSH (*Cheng et al. 2000; Arai et al. 2005*).

- Le CXCL12 : la chimiokine C-X-C motif ligand 12 (CXCL12) a pour récepteur principal CXCR4 (C-X-C chimiokine receptor type 4). CXCR4 est exprimé par les CSH et PH. L'importance du couple CXCR4/CXCL12 dans l'hématopoïèse a été démontrée par des modèles murins déficients pour le CXCR4 ou le CXCL12, qui présentent une altération majeure de la myélopoïèse (*Nagasawa et al. 1996; Zou et al. 1998*). CXCL12 exerce une activité de promotion du cycle cellulaire des CSPH à faible dose (*Lataillade et al. 2000; Lataillade et al. 2002*), alors qu'à forte concentration il inhibe la prolifération (*Nie et al. 2008*). C'est également une chimiokine majeure permettant le « homing » des CSPH au sein des niches hématopoïétiques médullaires (*Peled et al. 1999; Jung et al. 2006; Sugiyama et al. 2006*). Les ostéoblastes secrètent abondamment CXCL12 (*Semerad et al. 2005*), favorisant ainsi la migration et le maintien des CSPH au niveau de l'endoste.

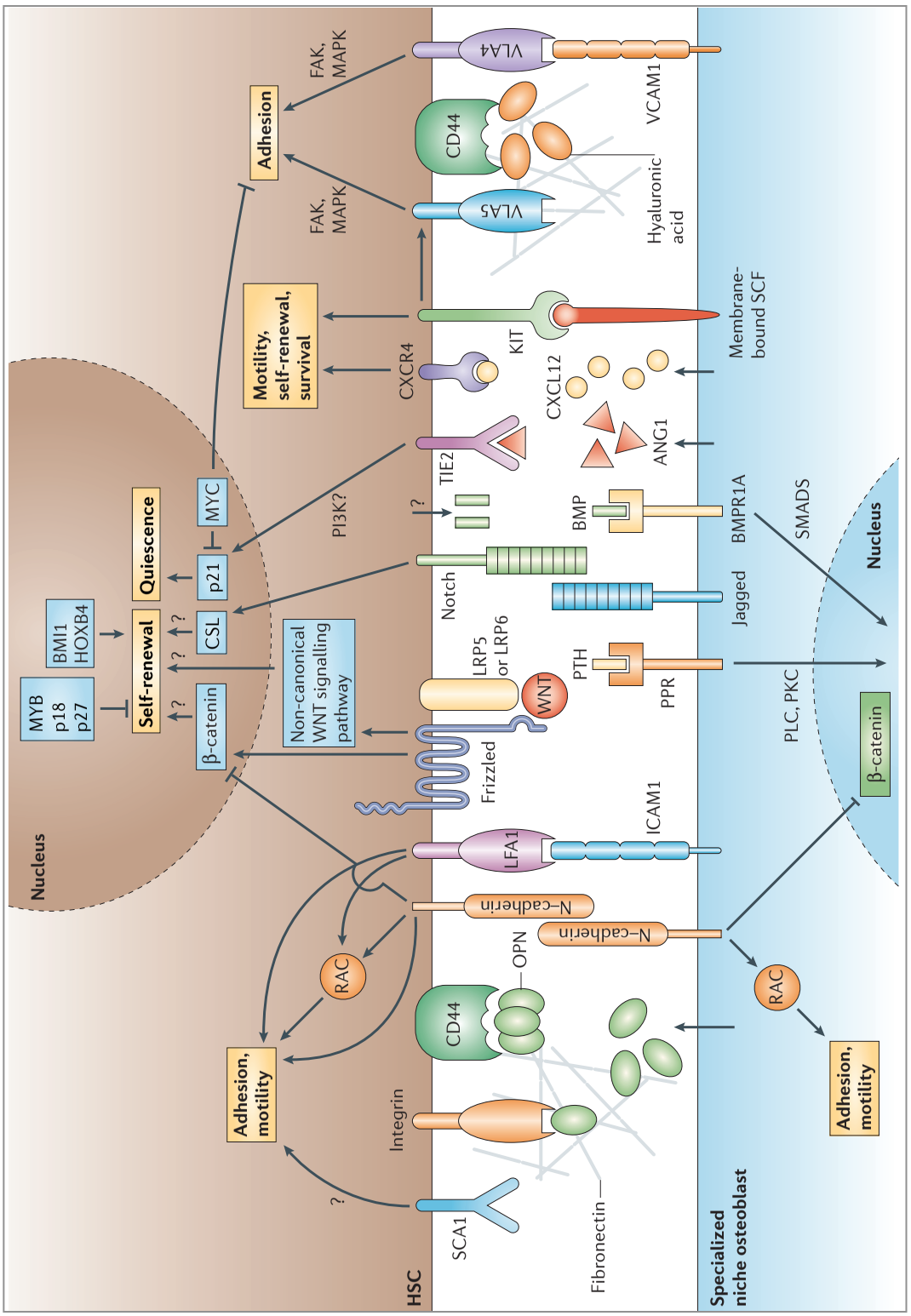


Figure 5 : Principaux acteurs de la régulation des CSH au contact de la niche ostéoblastique

d'après Wilson et al.(Wilson and Trumpp 2006)

III.3.1.2. Cellules endothéliales et concept de niche vasculaire

Malgré l'absence de cellules endostéales, des CSH sont présentes au niveau du foie et de la rate (*Taniguchi et al. 1996*) et une hématopoïèse extra-médullaire peut se développer au cours de processus pathologiques au sein de ces deux organes (*Johnson et al. 1992; Yang et al. 1995*). Ces données suggèrent que d'autres cellules que les ostéoblastes de l'endoste sont capables de fournir des niches aux CSH. Plusieurs données expérimentales évoquent l'existence d'une niche vasculaire médullaire. Le lien entre cellules endothéliales et CSH existe dès l'embryogénèse, puisque les premières CSH semblent dériver des cellules endothéliales « hémogéniques » de la région AGM (*Boisset et al. 2010*). La moelle osseuse est très vascularisée avec notamment un important réseau de sinusoïdes, capillaires à paroi fine tapissés de cellules endothéliales maintenant une organisation fenêtrée, qui permettent l'échange de cellules hématopoïétiques entre la circulation sanguine et la moelle osseuse. Ces cellules endothéliales médullaires expriment des molécules clefs du homing et de la mobilisation des PH (CXCL12, E-Selectine, vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1)) (*Rafii et al. 1997; Sipkins et al. 2005*) et semblent particulièrement impliquées dans la thrombopoïèse par leurs interactions avec les mégacaryocytes (*Avecilla et al. 2004*). En utilisant les marqueurs SLAM pour caractériser les CSH, Kiel *et al.* ont montré, sur des sections de moelle osseuse de souris, que 60% des CSH se trouvaient au contact des sinusoïdes alors que seulement 20% étaient localisées au niveau de l'endoste (*Kiel et al. 2005*), apportant un argument majeur pour l'existence d'une niche vasculaire. Cette hypothèse est plus indirectement évoquée à partir de données provenant d'expériences de mobilisation montrant qu'après stimulation par IL-8, des CSH sont mobilisées en quelques minutes dans la circulation sanguine de modèles murins (*Laterveer et al. 1995*). Cette rapidité de mobilisation est en faveur d'une proximité entre les CSH et les sinusoïdes médullaires. Dans des systèmes de co-cultures, des sous-populations de cellules endothéliales semblent capables de maintenir l'activité de repopulation à long terme et / ou d'amplifier des CSH (*Ohneda et al. 1998; Li et al. 2004; Butler et al. 2010*). De plus, des expériences de délétion conditionnelle montrent la nécessité de cellules endothéliales fonctionnelles pour maintenir une hématopoïèse fonctionnelle : la délétion conditionnelle de la gp130 sur les cellules endothéliales de souris s'accompagne d'une hypo-cellularité médullaire et d'un défaut de prise de greffe après irradiation (*Yao et al. 2005*), la délétion conditionnelle du *vascular endothelial growth factor recepteur 2* (VEGFR2) chez des souris adultes inhibe la régénération des sinusoïdes

endothéliaux et empêche la reconstitution hématopoïétique après irradiation sub-léthale et greffe de CSH (*Hooper et al. 2009*). Les cellules endothéliales des sinusoïdes médullaires peuvent promouvoir la quiescence des CSH par la production de la glycoprotéine Angiopoietin-like protein 3 (Angptl-3). Cette protéine se fixe aux CSH et favorise leur quiescence en réprimant Ikaros (*Zheng et al. 2011*). A l'inverse, des travaux récents ont montré que l'endothélium des sinusoïdes médullaires, par l'intermédiaire de la E-selectine, promouvait la prolifération des CSH (*Winkler et al. 2012*). Il semblerait également que la capacité de l'endothélium médullaire à favoriser l'auto-renouvellement ou la différenciation soit fonction de son mode d'activation (*Kobayashi et al. 2010*).

L'ensemble de ces éléments est en faveur d'un rôle des cellules endothéliales des sinusoïdes médullaires dans le maintien de l'hématopoïèse, et plus particulièrement dans l'auto-renouvellement/prolifération des CSH (*Kiel et al. 2005; Wilson and Trumpp 2006*).

III.3.1.3. Cellules stromales mésenchymateuses et concept de niche périvasculaire

Bien qu'il soit difficile de dissocier le rôle de l'endothélium et des CSM périvasculaires qui sont deux compartiments cellulaires intimement liés, dans un souci de clarté, nous avons choisi de les traiter individuellement dans notre description en raison de leur composition cellulaire propre.

Sugiyama *et al.* ont montré qu'une population de cellules « réticulaires » était la source principale de CXCL12 médullaire, dans un modèle murin co-exprimant les gènes de CXCL12 et de la GFP (green fluorescent protein) (*Sugiyama et al. 2006*). Ces cellules forment un réseau intra-médullaire, sont retrouvées à proximité de l'endoste mais prédominent nettement à proximité de l'endothélium des sinusoïdes. Chez la souris, les CSH (définies par les marqueurs SLAM) sont retrouvées à leur contact, aussi bien au niveau endostéal que péri-vasculaire (*Sugiyama et al. 2006*). Ces cellules ont été nommées CXCL12-abondant reticular cells (CAR). Secondairement, en utilisant un modèle murin permettant un « KO » sélectif des cellules CAR, Omatsu *et al.* ont montré que ces cellules étaient les principales productrices de SCF et CXCL12 médullaire et que leur déplétion sélective s'accompagnait d'une déplétion massive des PH et d'environ 50% des CSH médullaires (*Omatsu et al. 2010*). Ces cellules CAR expriment des gènes des lignées ostéoblastiques et

adipocytaires et sont capables de se différencier vers ces deux types cellulaires, arguments en faveur de leur parenté avec des CSM (*Omatsu et al. 2010*).

Chez la souris, une sous-population de CSM médullaire exprimant la nestine, décrite par Mendez-Ferrer *et al.*(*Mendez-Ferrer et al. 2010*), semble jouer un rôle majeur dans la niche hématopoïétique. La nestine est une protéine filamenteuse décrite initialement comme marqueur des progéniteurs neuronaux (*Day et al. 2007*). Les CSM nestine$^+$ ont une distribution exclusivement périvasculaire, aussi bien au niveau de l'endothélium endostéal que centro-médullaire. Elles sont associées aux CSH (CD150$^+$ CD48$^-$ Lin$^-$), aux fibres adrénergiques du système nerveux sympathique et sur-expriment les gènes de facteurs favorisant la maintenance des CSH (CXCL12, SCF, Ang1, Il-7, VCAM-1) (*Mendez-Ferrer et al. 2010*). Leur suppression conditionnelle s'accompagne d'une diminution des CSH médullaires avec mobilisation vers la rate, et réduit de 90% la capacité de homing médullaire des CSPH lors de greffes. Enfin, le traitement par parathormone double le nombre de CSM nestine$^+$ médullaires (*Mendez-Ferrer et al. 2010*) et favorise leur différenciation ostéoblastique, ce qui permet d'évoquer leur rôle dans l'amplification de la niche endostéale liée à cette hormone (*Calvi et al. 2003*).

Les cellules CAR et les CSM nestine$^+$ correspondent donc à des sous types de CSM médullaires, à prédominance périvasculaire, mais sont retrouvées également au niveau des sinusoïdes endostéaux qui sont impliquées dans le maintien, le homing et la mobilisation des CSH. Elles correspondent à des éléments essentiels et probablement redondants d'une même niche périvasculaire. Les CSM nestine$^+$ sont plus rares que les cellules CAR (0,08% des cellules nucléées médullaires *vs.* 0,27%), mais semblent plus primitives et pourraient correspondre à une sous-population des cellules CAR (*Ehninger and Trumpp 2011*).

Des travaux récents de l'équipe de Morrison confortent l'hypothèse de la niche périvasculaire, mais posent le problème de l'hétérogénéité de la population de cellules stromales qui participent à cette niche. Ils ont développé un modèle murin permettant de remplacer le gène du SCF par celui de la GFP (qui reste sous contrôle du promoteur du SCF) dans différentes sous-populations cellulaires et de réaliser des délétions conditionnelles (*Ding et al. 2012*). Ils ont ainsi pu montrer que dans la moelle osseuse le SCF est principalement exprimé par les cellules stromales périvasculaires et que la délétion du SCF dans les PH, les ostéoblastes et les CSM nestine$^+$ n'avait pas d'effet sur le nombre de CSH médullaires. Par contre la déplétion du SCF au niveau des cellules endothéliales ou de cellules stromales périvasculaires exprimant le récepteur à la leptine (LepR) s'accompagnait d'une diminution de la réserve de CSH (diminution beaucoup plus importante dans le cas des cellules stromales LepR). La

double déplétion du SCF au niveau des cellules endothéliales et des cellules stromales LepR s'accompagnait même d'une disparition quasi totale des CSH médullaires. Ces cellules stromales LepR ont des caractéristiques de CSM et produisent du CXCL12, ce qui les rapproche des cellules CAR. Elles n'expriment cependant pas la nestine (*Ding et al. 2012*). L'existence de CSM périvasculaires CD146^{+} capable de soutenir l'hématopoïèse a également été décrite chez la souris où elles semblent jouer un rôle dans l'auto-renouvellement des CSH (*Sacchetti et al. 2007*). Chez l'homme, ces CSM CD146^{+} expriment à la fois CXCL12, la nestine et le LepR et agissent par l'intermédiaire de contacts CSH/CSM et la voie Notch (*Corselli et al. 2013*).

III.3.1.4. Autres cellules de la niche hématopoïétique

D'autres types cellulaires sont également impliqués dans la régulation des CSH au sein des niches médullaires.

Plusieurs sous-populations de **macrophages** peuplent la moelle osseuse. Parmi eux, les osteomacs sont des macrophages situés dans la région endostéale, impliqués dans la régulation de la capacité de minéralisation des ostéoblastes, dont la déplétion sélective entraine une disparition des ostéoblastes dans les zones d'anabolisme osseux (*Chang et al. 2008*). Winkler *et al.* ont montré, à partir de deux modèles murins de déplétion des macrophages, que cette déplétion s'accompagnait d'une disparition des ostéoblastes endostéaux, d'une diminution des sécrétions de CXCL12, SCF et d'Ang1 dans la région endostéale et d'une mobilisation sanguine des CSH (*Winkler et al. 2010*). En utilisant des modèles de délétion sélective de sous-populations de monocytes/macrophages, Chow *et al.*ont montré que la déplétion de ces cellules s'accompagnait d'une mobilisation sanguine et splénique des CSH et d'une diminution de la sécrétion de CXCL12 (*Chow et al. 2010*). Ils ont pu cibler une sous-population de macrophages CD169^{+} dont la déplétion inhibait fortement la production de CXCL12, SCF, Ang1 et l'expression de VCAM-1 par les CSM nestine^{+}(*Chow et al. 2010*). Il semble donc que des sous-populations de macrophages participent à la régulation positive des niches endostéales et périvasculaires.

Les **ostéoclastes**, d'origine hématopoïétique, sont également impliqués dans la niche hématopoïétique dans sa composante endostéale. Ces cellules macrophagiques, spécialisées dans la résorption osseuse, sont couplées aux ostéoblastes par des mécanismes complexes permettant l'équilibre du remodelage osseux. La dégradation osseuse par les ostéoclastes

s'accompagne de la libération de différents facteurs dans la matrice osseuse. Parmi eux, le TGF-β1, les BMP-2 et le BMP-7 sont capables de promouvoir la quiescence de CSH *in vitro* (*Bhatia et al. 1999; Batard et al. 2000*) et le calcium favorise le maintien des CSH au niveau de l'endoste (*Adams et al. 2006*). Les souris traitées par alendronate, biphosphonate inhibant puissamment l'activité de résorption osseuse des ostéoclastes, présentent une diminution de leur réserve de CSH médullaires (avec des CSH plus fréquemment en cycle) et un retard de reconstitution hématopoïétique après greffe (*Lymperi et al. 2011*). Dans un modèle murin d'ostéopétrose sévère (perte de l'activité des ostéoclastes par mutation du gène *Tcirg1*), Mansour *et al.* ont montré que ce défaut d'activité des ostéoclastes s'accompagne d'un défaut de différenciation ostéoblastique et d'une diminution des CSH médullaires associée à une hématopoïèse splénique. La restauration de l'activité des ostéoclastes permet de retrouver une différenciation ostéoblastique correcte et un homing médullaire des CSH (*Mansour et al. 2012*). Ainsi, par les produits de la dégradation osseuse qu'ils induisent et par leur effet sur les ostéoblastes, les ostéoclastes jouent également un rôle clé dans la régulation de la niche endostéale.

Longtemps considérées comme des cellules comblant passivement la vacuité médullaire secondaire à l'âge ou à des pathologies hématologiques, il apparaît en fait que les **adipocytes** sont des régulateurs négatifs de l'hématopoïèse. Naveiras *et al.* ont comparé des CSH provenant de vertèbres caudales (riches en adipocytes) à des CSH de vertèbres thoraciques (pauvres en adipocytes). Les CSH provenant de régions pauvres en adipocytes présentent une meilleure activité de repopulation à long terme (*Naveiras et al. 2009*). De même, l'inhibition génétique ou pharmacologique de l'adipogénèse permet d'améliorer la prise de greffe hématopoïétique dans des modèles murins (*Naveiras et al. 2009*). En co-cultures, les adipocytes inhibent la prolifération et la capacité clonogénique de CSPH, sans que cette inhibition, probablement transmise par une hyperexpression de la neuropiline 1, puisse être levée par l'association à des ostéoblastes (*Chitteti et al. 2010*). Il semble exister une balance ostéoblastes/adipocytes permettant de réguler la récupération hématopoïétique après irradiation subléthale. Rapidement après irradiation, les CSM médullaires se différencient préférentiellement vers la lignée ostéoblastique afin de favoriser la restauration des granuleux. Secondairement les CSM médullaires se différencient vers la voie adipocytaire, et inhibent la prolifération et la différenciation granuleuse, favorisant le retour à une hématopoïèse normale (*Poncin et al. 2012*).

Les **mégacaryocytes**, préférentiellement localisés au niveau des sinusoïdes médullaires, sont capables d'agir sur le remodelage osseux. Ils sont donc potentiellement impliqués dans la

régulation des niches endostéales et vasculaire/périvasculaire. Ces cellules sécrètent de nombreuses protéines capables de promouvoir la formation osseuse (BMP-2, 4, 6) et d'inhiber les ostéoclastes (OPG) (*Kacena et al. 2006*). Les co-cultures entre ostéoblastes et mégacaryocytes favorisent fortement la prolifération des ostéoblastes (*Kacena et al. 2004*). Ces données ont été confirmées *in vivo* chez des souris dont les cellules hématopoïétiques ont été invalidées pour des gènes de différenciation mégacaryocytaire (NF-E2, GATA-1). Dans ces modèles, il existe une thrombopénie et une accumulation médullaire de mégacaryocytes s'accompagnant d'une augmentation de la masse osseuse et des ostéoblastes (*Shivdasani et al. 1997; Kacena et al. 2004*). Ce phénotype osseux est transmissible à des souris saines par greffe de cellules spléniques, traduisant le rôle des mégacaryocytes (*Kacena et al. 2005*). Parallèlement à leur capacité à interagir avec la niche endostéale par leur impact sur le remodelage osseux, les mégacaryocytes peuvent réguler la quiescence des CSH par leur effet sur le taux de Tpo circulante. Les mégacaryocytes expriment MPL, le récepteur à la Tpo, et il est démontré que la quantité de Tpo circulante est inversement corrélée à la quantité de mégacaryocytes (*Emmons et al. 1996*). Des modèles murins mutants pour myb et P330, dont le phénotype associe excès de mégacaryocytes et thrombocytose, sont caractérisés par un taux très faible de Tpo circulante, un excès de CSH en cycle réversible après administration de Tpo, et une diminution progressive de leur réserve de CSH (*de Graaf et al. 2010*). Par la production d'IL-6 et de *proliferation-inducing ligand* (APRIL) les mégacaryocytes pourraient également jouer un rôle de « niche » pour les plasmocytes intra médullaires (*Winter et al. 2010*).

Des **lymphocytes T régulateurs** sont également localisés au niveau des niches hématopoïétiques et pourraient participer à la protection des CSPH contre les réactions inflammatoires et auto-immunes (*Fujisaki et al. 2011*). A l'inverse, la présence de ces cellules pourrait favoriser le développement de processus néoplasiques intra-médullaires.

III.3.2. Régulation des niches hématopoïétiques par le système nerveux sympathique

Le système nerveux sympathique (SNS) est impliqué dans la formation osseuse, *via* un effet négatif des fibres β-adrénergiques (*Takeda et al. 2002*). Katayama et *al* ont montré son implication dans la régulation de la niche endostéale : le tonus sympathique régule négativement la population ostéoblastique par les récepteurs β2-adrénergiques et est impliqué dans la mobilisation des CSPH par le G-CSF qui renforce ce tonus et est à l'origine d'une diminution des ostéoblastes et donc de la sécrétion de CXCL12 (*Katayama et al. 2006*). Cette régulation de la niche endostéale par le SNS nécessite l'intégrité du récepteur de la vitamine D sur les ostéoblastes ; la signalisation intracellulaire induite par ce dernier semblant renforcer les effets de la stimulation β2-adrénergique (*Kawamori et al. 2010*). L'équipe de P. Frenette a également montré que le SNS était à l'origine d'un rythme circadien de mobilisation des CSPH, par une inhibition circadienne de la sécrétion de CXCL12 par les cellules stromales médullaires via un récepteur β3-adrénergique (*Mendez-Ferrer et al. 2008*). Ils ont secondairement identifié les CSM nestine^{+} comme cibles de ce signal (*Mendez-Ferrer et al. 2010*).

Les cellules de Schwann « non myélinisantes » ont récemment fait la preuve de leur implication dans la niche hématopoïétique. Les cellules de Schwann entourent les axones des neurones périphériques du système nerveux périphérique (sympathique et parasympathique). Certaines produisent des feuillets de myéline autour des axones les plus volumineux et sont « myélinisantes ». Autour des axones les plus fins, comme ceux innervant la moelle osseuse, les cellules de Schwann ne produisent pas de myéline et sont « non myélinisantes ». Yamazaki *et al.* ont montré que ces cellules de Schwann étaient capable d'activer le TGF-β présent sous forme inactive dans la matrice extra-cellulaire par l'intermédiaire d'une intégrine β8 (*Yamazaki et al. 2011*). Par la régulation de l'activation du TGF-β, ces cellules de Schwann apparaissent comme des actrices majeures de la quiescence des CSH au sein de la niche hématopoïétique, bien que le mécanisme régulant cette fonction spécifique ne soit pour l'instant pas défini.

III.3.3. Facteurs environnementaux

III.3.3.1. Le calcium

L'endoste, zone de remodelage osseux sous l'influence du couple ostéoblaste-ostéoclaste, présente un taux de calcium extracellulaire très élevé, 20 fois supérieur à celui du sérum par exemple. Par l'intermédiaire d'un senseur calcique (CaR), les CSH utilisent ce gradient de concentration pour se localiser à l'endoste et ainsi accéder aux composants de la niche endostéale (*Adams et al. 2006*). La délétion de ce récepteur sur les CSH s'accompagne d'une diminution du homing et d'une hypocellularité médullaire (*Adams et al. 2006*). Le CaR agit en partie au moins par une modulation de la signalisation du CXCR4 sur les CSH (*Lam et al. 2011*).

III.3.3.2. L'oxygène

Dans la moelle osseuse, la concentration en oxygène varie selon un gradient qui diminue rapidement lorsque l'on s'éloigne des sinusoïdes. De part son faible débit sanguin, la région des sinusoïdes, est plus « hypoxique » que la région des capillaires. Une grande majorité des CSH quiescente semble se localiser dans les régions médullaires les plus « hypoxiques ». Utilisant la technique des « label retaining cells », qui permet de déduire l'activité mitotique à partir de la capacité fixer la bromodeoxyuridine, Kubota *et al.* ont montré que la plupart des PH quiescents étaient au contact de l'endoste, dans les zones les plus hypoxiques, à distance des capillaires (*Kubota et al. 2008*). Des modèles *in vivo*, basés sur la perfusion de Hoechst à des souris confortent cette hypothèse. Dans ces modèles, la capacité à fixer le Hoechst est corrélée à la perfusion des tissus et donc à l'oxygénation. Les cellules qui en fixent le moins seraient les plus « souches » avec une plus grande activité LTC-IC et une meilleure capacité à greffer (*Parmar et al. 2007*). Le caractère hypoxique de ces cellules a pu être confirmé en utilisant un marqueur d'hypoxie, le pimonidazole (*Parmar et al. 2007*). Plus récemment, Winkler *et al.* ont pu montrer que les LT-SRC étaient dans les zones les moins perfusées et que la population cellulaire LSK $CD150^{+}$ $CD41^{-}$ $CD48^{-}$ pouvait être scindée en deux en fonction de sa capacité à fixer le Hoechst ; seule la sous-population ne fixant pas le Hoechst était capable de soutenir des transplantations sériées (*Winkler et al. 2010*). Parmi les cellules du micro-environnement, les ostéoblastes résidaient dans des zones

peu perfusées alors que les CSM et les cellules endothéliales étaient en zones perfusées (*Winkler et al. 2010*). La modulation de l'axe CXCR4/SDF1 par le gène HIF-1 (Hypoxia Inductible Factor-1) participe vraisemblablement à la localisation des CSH dans les niches les plus hypoxiques (*Staller et al. 2003; Ceradini et al. 2004*).

Le rôle de l'hypoxie serait de protéger les CSH des ROS (reactive oxygen species), radicaux toxiques produits par le métabolisme de l'oxygène. Les CSH exprimant un niveau intracellulaire de ROS faible sont plus quiescentes et présentent un potentiel d'auto-renouvellement et de transplantations sériées supérieur aux CSH présentant un niveau intracellulaire élevé de ROS (*Jang and Sharkis 2007*). *In vivo*, les souris déficientes pour le gène ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) présentent un niveau élevé de ROS et deviennent progressivement aplasiques (*Ito et al. 2004*). Outre leur toxicité cellulaire, les ROS sont capables d'inhiber l'expression de molécules d'adhésion et d'induire le cycle cellulaire des CSPH (*Ito et al. 2004; Ito et al. 2006; Hosokawa et al. 2007*).

III.3.3.3. Les prostaglandines

Les prostaglandines sont des acides gras dérivés de l'acide arachidonique. La prostaglandine E2 (PGE2) est la plus étudiée dans le domaine de la régulation de l'hématopoïèse. Après sa synthèse à partir de l'acide arachidonique, elle est secrétée dans le milieu extérieur par des protéines du groupe MDR (multidrug transporter) et est à l'origine d'une signalisation autocrine ou paracrine. De nombreuses cellules clef de la niche hématopoïétique sont capables de sécréter PGE2 : ostéoblastes (*Schmidt et al. 2003*), monocytes/macrophages (*Kennedy et al. 1980*) et cellules endothéliales des sinusoïdes (*Hashimoto et al. 1995*). Les quatre récepteurs connus de PGE2, dénommés EP1-4, couplés à une protéine G, ont été décrits à la surface des CSH (*Hoggatt et al. 2009*). L'exposition de CSH à la PGE2 augmente leur survie, leur capacité d'auto-renouvellement, prolifération et homing, avec pour conséquence une augmentation de leur « greffabilité » (*Hoggatt et al. 2009*). Le mécanisme sous-jacent semble être une up-régulation de CXCR4, de la voie WNT, une inhibition de l'apoptose et une augmentation de la capacité à entrer en cycle (*Goessling et al. 2009; Hoggatt et al. 2009*).

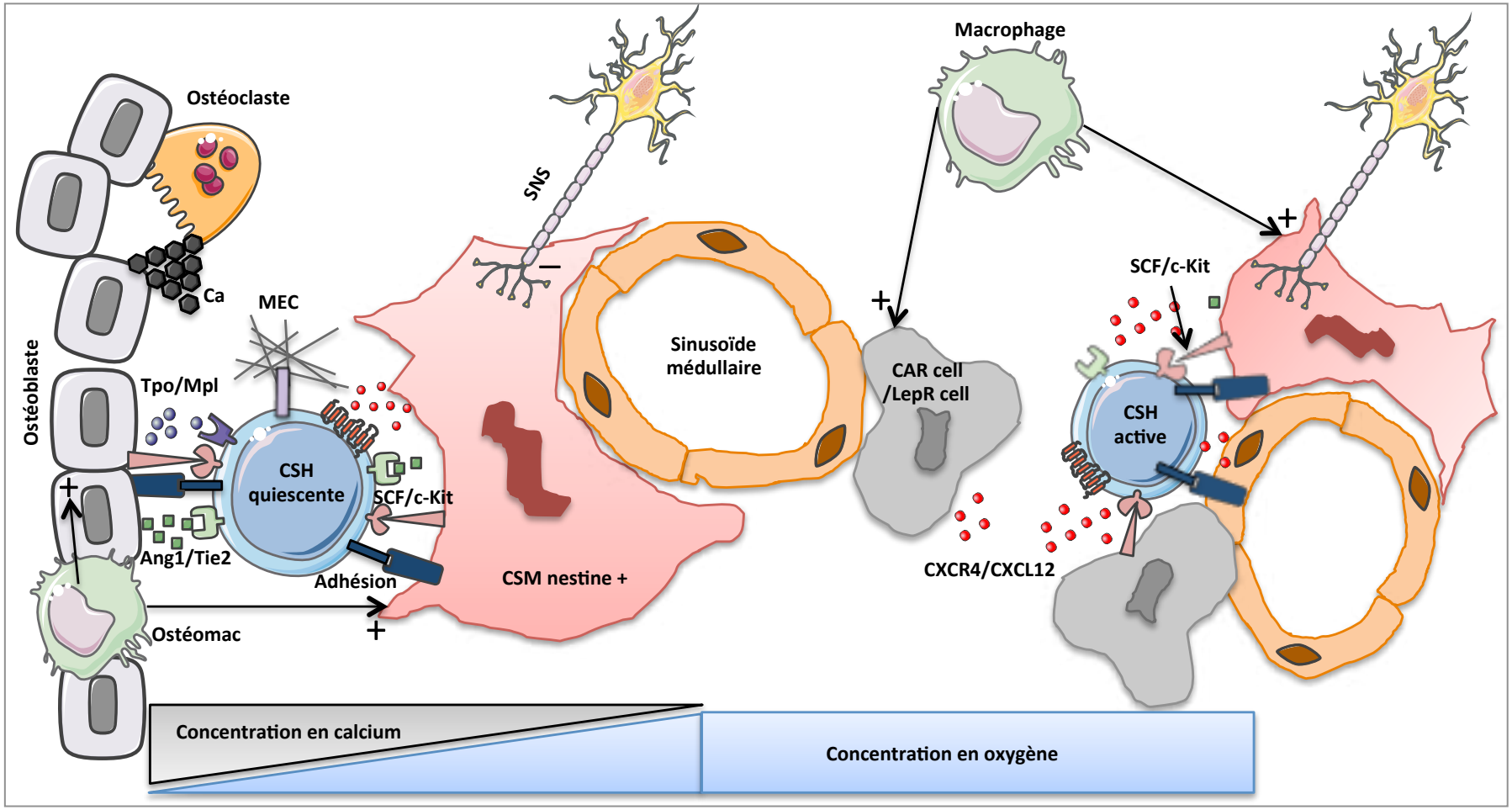
III.3.3.4. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes de la classe des héparines sulfates sont essentiels à l'interaction entre CSPH et cellules du micro-environnement médullaire. Ils fixent les cytokines et les molécules de la matrice extracellulaire, les présentent aux CSH au sein des niches hématopoïétiques, et participent également à l'adhésion des CSH aux cellules des niches (*Siczkowski et al. 1992; Gupta et al. 1998*).

Un protéoglycane a récemment été impliqué dans la niche hématopoïétique : l'agrine, jusqu'alors décrit comme un régulateur de la synapse neuro-musculaire. Au sein du micro-environnement médullaire, l'agrine est exclusivement exprimée par les CSM et les ostéoblastes de l'endoste, alors que les PH LSK^+expriment son récepteur. *In vitro*, les CSM déficientes en agrine présentent un défaut de soutien de l'hématopoïèse. *In vivo*, les souris déficientes pour le gène de l'agrine présentent un défaut sévère d'hématopoïèse touchant essentiellement les CSH capables de reconstituer l'hématopoïèse à court terme, alors que les CSH quiescentes sont préservées. La co-culture avec des CSM produisant de l'agrine restaure le potentiel souche des CSH (*Mazzon et al. 2011*).

La figure 6 résume l'organisation des niches hématopoïétiques médullaires.

Figure 6 : Les niches hématopoïétiques médullaires



Les niches hématopoïétiques médullaires ont initialement été compartimentées en niche endostéale, siège de la quiescence des CSH et niche vasculaire siège de l'auto-renouvellement/prolifération/engagement en différenciation de ces dernières. Il paraît plus probable que les niches hématopoïétiques forment un continuum entre l'endoste où les CSH seraient plus quiescentes au contact des ostéoblastes et des CSM périvasculaires des sinusoïdes endostéaux et les zones périvasculaires un peu plus éloignées de l'endoste, un peu moins hypoxiques, où les CSH sont essentiellement régulées par les CSM périvasculaires et intramédullaires dont plusieurs types ont été décrits (nestine^{+}, CAR cells, leptine récepteur^{+}). Participent également à cette régulation le SNS qui régule négativement la sécrétion de CXCL12 par les CSM nestine^{+}, les macrophages/ostéomacs qui participent au maintien des CSM et ostéoblastes des niches, les ostéoclastes qui assurent l'existence d'un gradient endostéal de calcium. Au niveau moléculaire, les éléments majeurs sont des cytokines/chimiokines (SCF, CXCL12, TPO, Ang1…) et des molécules d'adhésion intercellulaires ou cellule/matrice (VLA-4, VLA-5, CD44, NCAD, Ostéopontine…).

III.3.4. Les niches hématopoïétiques « spécialisées »

Nous venons d'aborder le rôle des niches à cellules souches, qui participent de façon majeure à la régulation de l'équilibre quiescence/auto-renouvellement/engagement en différenciation/prolifération/mobilisation des CSPH. Notons également que le stroma médullaire est capable de former des niches spécialisées, qui participent à la différenciation de différentes sous-populations hématopoïétiques. Citons les CSM galectine^{+} et les CSM IL-7^{+} impliquées dans la lymphopoïèse B (*Mourcin et al. 2011*), les mégacaryocytes capables de former des niches à plasmocytes (*Winter et al. 2010*), et les macrophages récemment décrits comme étant à l'origine d'une niche érythropoïétique indispensable à l'adaptation au stress (*Chow et al. 2013; Ramos et al. 2013*).

III.4. Autres éléments de la régulation extrinsèque des CSPH

III.4.1. Les cytokines et chimiokines de l'hématopoïèse

La majorité des cytokines existent sous forme soluble et sont synthétisées par un grand nombre de cellules telles que les cellules endothéliales, les fibroblastes, les CSM, les monocytes/macrophages et les lymphocytes. Ces glycoprotéines régulent les processus d'auto-renouvellement, de prolifération et de différenciation qui gouvernent l'homéostasie hématopoïétique. Très schématiquement, on peut les classer en facteurs de promotion et de régulation de l'hématopoïèse. Parmi ceux-ci, certains ont une action multipotente et agissent sur différentes lignées, d'autres ont une action plus restreinte à une lignée de différenciation donnée (tableau 1).

Ces facteurs agissent sur les cellules cibles via des récepteurs spécifiques qui sont de deux types : des récepteurs à activité tyrosine kinase (Flt3 et c-Kit) et des récepteurs de cytokines dépourvus d'activité tyrosine kinase intrinsèque (ILs-R, CSFs-R, Epo-R, Tpo-R…). Ces récepteurs peuvent être regroupés en familles selon le nombre de sous-unités dont ils sont composés ; on distingue ainsi les récepteurs de classe I, composés d'une seule sous-unité homo- ou hétéro-dimérique et les récepteurs de classe II, constitués de deux sous-unités distinctes qui assurent toutes deux la signalisation et qui regroupent la famille des interférons.

FACTEURS DE PROMOTION : stimulent le mise en cycle des CSH et PH et les sensibilisent à l'action d'autres facteurs de croissance		
SCF	Régule la prolifération et l'auto-renouvellement des CSH	Kent, Clin Cancer Res, 2008
	Agit en synergie avec le GM-CSF, le G-CSF, L'IL-7, ou l'EPO	Cooper, Curr Protoc Immunol, 2001
	Son action est inhibée par le TGF-β	Ploemacher, Stem Cells, 1993
Flt3-L	Régulation de la balance prolifération/différenciation des CSH	Mueller, Transplantation, 2012
	Prolifération et survie des cellules leucémiques	Drexler, Leuk, Lymphoma, 1999
TPO	Favorise la quiescence des CSH au contact de la niche endostéale	Yoshihara, Cell Stem Cell, 2007
	Action proliférative sur les progéniteurs mégacaryocytaires	Miyasaki, Stem Cells, 1996
IL-1	Stimule la prolifération des CSH	Kovacs, Exp Hematol, 1995
	Agit de concert avec le M-CSF	
Famille IL-6	Comprend l'IL-6, l'IL-11 et le LIF	Garnick, Hematol Oncol.., 1989
	Induisent la prolifération des CSH et agissent en synergie avec l'IL-3	
CXCL12	Mise en cycle des PH à faible concentration	Chabanon, Stem Cells, 2008
	Maintien en quiescence des CSH et PH à forte concentration	Nie, J Exp Med, 2008

FACTEURS DE REGULATION NEGATIVE : inhibent la mise en cycle des CSH		
TGF-β	Inhibe la prolifération et maintien en quiescence les CSH via Pbx1	Ficar, Cell Stem Cell, 2008
MIP-1α	Protège les CSH de l'effet cytotoxique de l'hydroxyurée	Lord, Blood, 1992
Ostéopontine	Inhibe la prolifération des CSH et les maintien au sein des niches	Nilsson, Blood, 2005

FACTEURS DE REGULATION POSITIVE		
1- FACTEURS MULTIPOTENTS : actifs sur les CSH et PH après sensibilisation par les facteurs de promotion		
IL-3	Différenciation et promotion des CSH ; régulation de la mastocytopoïèse	Le Bousse-Kerdiles, Ann Instit Pasteur Immunol, 1986
GM-CSF	Differenciation granulo-monocytaire ; prolifération des CSH	Nicolini, Leukemia, 2004
2- FACTEURS RESTREINTS : actifs sur les PH		
G-CSF	Actif sur la lignée granuleuse neutrophile	Basu, Int J Mol Med, 2002
IL-4	Actif sur les PH, la lignée granuleuse basophile, les lymphocytes T et les mastocytes	Brown, CRI, 1997
M-CSF	Facteur de survie et d'activation des monocytes/macrophages	Motoyoshi, Int J Hematol, 1998
IL-5	Régule la croissance, l'activation et la survie des polynucléaires éosinophiles	Adachi, Am J Physiol, 1998
EPO	Prolifération et différenciation érythrocytaire ; cancérogénèse ?	Sytkowski, Sci STKE, 2007

Tableau 1 : Principales cytokines et chimiokines de l'hématopoïèse

III.4.2. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire ou MEC est une structure dynamique composée de protéines, protéoglycanes et glycanes représentés par :

- des fibres de collagène (types I-V, VII et XVI) produites par les cellules stromales (ostéoblastes, endothéliales…)
- des protéines des membranes basales (laminine, entactine)
- d'autres composants interstitiels comme la ténascine, la fibronectine, l'ostéopontine

Certaines de ces molécules, et en particulier les héparanes sulfates, dont font partie les hyaluronanes, participent à la stabilisation/concentration locale des facteurs de croissance et facilitent ainsi leurs actions régulatrices *in situ* sur les CSH et PH.

En conditions physiologiques, la synthèse et la dégradation de la MEC sont équilibrées. La synthèse de MEC est assurée par les cellules stromales, présentes au sein du micro-environnement médullaire. Ainsi, la synthèse de collagène I est presque exclusivement assurée par les ostéoblastes matures au sein de la niche endostéale. La dégradation de la MEC est catalysée par des enzymes, dont les métalloprotéases matricielles (MMP) et la plasmine (*Krane and Inada 2008*). Des inhibiteurs des MMP, les TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases), interviennent dans la régulation de ces protéases. Enfin, le TGF-ß déséquilibre la balance synthèse/dégradation de la MEC en stimulant la synthèse de nombreux composants de la MEC dont les collagènes I et II, la laminine, la fibronectine et en inhibant les collagénases.

La dérégulation de la balance synthèse/dégradation de la MEC joue un rôle clé dans le développement des fibroses, notamment dans la myélofibrose primitrive (*Castro-Malaspina et al. 1981*).

Le tableau 2 fournit une liste non exhaustive des principaux composants de la MEC médullaire.

Pgp MEC	Fonction	Références
Collagène I	Soutien de l'hématopoïèse au long terme	Schwartz, 1992
	Différenciation des cellules souches	Mauney, 2009
Collagène VI	Interaction étroite avec la fibronectine	Sabatelli, 2001
Sialoprotéines	Synthèse osseuse et ostéoclastogenèse	Malaval, 2008
Decorine	Prolifération et survie des cellules stromales	Bi, 2005
Biglycan	Prolifération et survie des cellules stromales	
Collagène III et V	Composant du tissu conjonctif	Chen, 2007
Syndecan	Adhésion et croissance des CSH/PH	Schofield, 1999
Perlecan	Proteoglycan qui fixe le GM-CSF	Klein, 1995
Laminine	Inhibe la différenciation ostéoclastique	Kukita, 1998
Fibronectine	Chemoattraction CSM	Thibault, 2007
Thrombospondine	Adhésion des CSH/PH	Long, 1990
	Régulateur négatif de la mégacaryopoïèse	Chen, 1997
Tenascine	Inhibe la différenciation des préostéoblates	Kimura, 2007
Ostéopontine	Régulateur négatif de la prolifération des CSH	Nilsson, 2005
Ostéonectine	Differenciation et survie des ostéoblastes	Delany, 2003
Vitronectine	Chemoattraction CSM	Thibault, 2007
	Différenciation ostéogénique	Salasznyk, 2004
	Différenciation ostéoclastique	Weinreb, 1998

Tableau 2 : Principales protéines de la matrice extracellulaire

La matrice extra-cellulaire médullaire représente l'ensemble des molécules situées dans le milieu extra-cellulaire et qui rentrent en interaction avec les cellules osseuses. Ce sont des composants structuraux du tissu osseux (collagène I), des molécules impliquées dans la migration des cellules (Fibronectine) ou des composants des membranes basales (Laminine).Chacune de ces molécules joue un rôle clef dans la régulation de l'équilibre homéostasique des cellules médullaires, au sein de leur micro-environnement.

III.4.3. Un point sur les intégrines

Les intégrines, récepteurs d'adhésion présents uniquement chez les métazoaires, sont des éléments majeurs de l'organisation de ces derniers en intervenant dans les interactions intercellulaires et cellules/matrice extracellulaire. Leur rôle est crucial dans le développement embryonnaire, la stabilité et la réparation tissulaire, les défenses immunitaires et l'hémostase. Ponts entre les cellules, notamment les CSPH, et leur environnement, les intégrines sont des éléments importants de la régulation extrinsèque des CSH.

Il s'agit d'hétérodimères composés de l'association non covalente de sous-unités alpha et beta. Chez les vertébrés, la famille des intégrines est composée de 18 sous-unités α et 8 sous-unités ß, à l'origine de 24 hétérodimères (figure 7). Ces intégrines peuvent être classées en fonction de leurs ligands potentiels ou en fonction des sous-unités les composant (tableau 3). De façon schématique, nous pouvons retenir que la sous-unité α détermine la spécificité de ligand de l'hétérodimère, alors que si la sous-unité ß peut participer à la fixation du ligand, elle est essentiellement impliquée, par son domaine intra-cytoplasmique, dans la connexion au cytosquelette et la transmission des signaux (*Barczyk et al. 2010*).

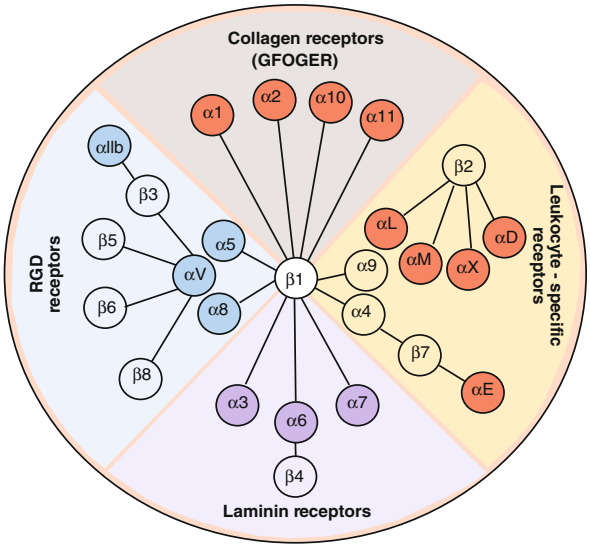
Elles ont été initialement décrites comme un lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette via une connexion à l'actine. Il apparaît que ce lien n'est pas seulement mécanique et passif, car les intégrines peuvent transmettre des signaux en fonction de leur « tension », jouant le rôle de mécano-senseurs (*Hynes 2002*).

Une autre fonction, extrêmement complexe, est la transmission de signaux, avec la particularité de pouvoir transmettre ceux-ci de façon bidirectionnelle : « inside-out signaling » et « outside-in signaling ». Le « inside-out signaling » sert essentiellement à faire passer les intégrines en conformation active. Ce signal est initié principalement par trois voies : la voie des protéines G, la voie de la phosphatidylinositol phosphate kinase et la voie de la calpaïne (*Anthis and Campbell 2011*). Ces voies aboutissent à l'activation d'une protéine clef de la fonction des intégrines : la taline. Cette dernière existe dans une conformation auto-inhibée et va subir un clivage protéolytique permettant son activation et sa fixation à la queue intra-cytoplasmique de la sous-unité ß. Il va s'en suivre un changement conformationnel de l'hétérodimère qui devient actif et particulièrement efficace pour transmettre l' « outside-in signalling ». Ce signal, ligand dépendant, implique un grand nombre d'enzymes et protéines, notamment la *focal adhesion kinase*, la famille des Src-kinases, l'*integrin linked kinase*, la paxiline et la vinculine, et constitue « l' adhésome » (*Humphries et al. 2006*). Cette

signalisation régule, en fonction des types cellulaires, de nombreux mécanismes dont la survie, la prolifération, la différenciation, l'état transcriptionnel, la motilité, l'organisation du cytosquelette (*Hynes 2002*).

Les deux principales intégrines impliquées dans la régulation des CSPH sont VLA-4 et VLA-5. Les ligands de VLA-4 sont essentiellement VCAM-1 et la fibronectine, permettant ainsi une adhésion à la fois avec les cellules des niches hématopoïétiques et la matrice extracellulaire. Le ligand principal de VLA-5 est la fibronectine.

En culture sur des CSM, VLA-4 et VLA-5 sont extrêmement importantes pour promouvoir l'adhésion au stroma et le maintien de PH immatures et quiescents (*Teixido et al. 1992; Jing et al. 2010*). *In vivo*, l'administration hebdomadaire d'anticorps neutralisant VLA-4 à des souris a des effets délétères à la fois sur la lymphopoïèse et la myélopoïèse (*Miyake et al. 1991*), mais VLA-4 paraît surtout impliqué dans les processus de homing et d'adhésion aux niches hématopoïétiques (*Papayannopoulou et al. 1995; Scott et al. 2003*). L'activation de VLA-4 dans les CSPH peut résulter de signaux de transduction activés notamment par SCF, IL-3, GM-CSF (*Oostendorp and Dormer 1997*), CXCL12 (*Verfaillie et al. 1994*) et CD44 (*Sackstein 2011*).



Chez les vertébrés, la famille des intégrines comprend 24 hétérodimères. Elle peuvent grossièrement être divisées en récepteurs à la laminine, récepteurs au collagène, récepteurs reconnaissant la séquence de peptides RGD présente notamment sur la fibronectine, le fibrinogène, la vitronectine, enfin les intégrines spécifiques des leucocytes. Notons que VLA-5 reconnaît la séquence RGD de la fibronectine alors que VLA-4 reconnaît les séquences LDV de VCAM-1 et de la fibronectine. Adapté de *(Barczyk et al. 2010)*

Figure 7 : Représentation de la famille des intégrines

Integrin	Human α chain characteristics	Prototypic ligands/ recognition sequences	Additional ligands
α1β1 (CD49a, VLA1)	1151 aa	collagens (collagen IV > collagen I (GFOGER); collagen IX)	semaphorin 7A
α2β1 (CD49b, VLA2)	1181 aa	collagens (collagen I >collagen IV (GFOGER); collagen IX)	E-cadherin, endorepellin
α3β1 (CD49c, VLA3)	1051 aa, splice variants α3 A and α3B	laminins (LN-511>LN-332>LN-211)	
α4β1 (CD49d, VLA4)	1038 aa	fibronectin VCAM-1	
α5β1 (CD49e, VLA5)	1049 aa	fibronectin (RGD)	endostatin
α6β1 (CD49f, VLA6)	1073 aa, splice variants α6A and α6B	laminins (LN-511>LN-332>LN-111>LN-411)	
α7β1	1137 aa, splice variants X1, X2, α7A, α7B	α7X1β1:laminins (LN-511>LN-211>LN-411>LN-111) α7X2β1:laminins (LN-111>LN-211>LN-511)	
α8β1	1025 aa	fibronectin, vitronectin, nephronectin (RGD)	
α9β1	1035 aa	tenascin-C, VEGF-C, VEGF-D	
α10β1	1167 aa	collagens (collagen IV> collagen VI >collagen II (GFOGER); collagen IX)	
α11β1	1188 aa, inserted domain 21 aa	collagens (collagen I>collagen IV (GFOGER); collagen IX)	
αLβ2 (CD11a)	1170 aa	ICAM-1, -2, -3, -5	
αMβ2 (CD11b)	1153 aa	iC3b, fibrinogen + more	
αXβ2 (CD11c)	1163 aa	iC3b, fibrinogen + more	
αDβ2 (CD11d)	1162 aa	ICAM-3, VCAM-1	
αIIBβ3 (CD41, GpIIb)	1039 aa	fibrinogen, fibronectin (RGD)	
α6β4		laminins (LN-332, LN-511)	
αvβ1 (CD51)	1048 aa	fibronectin, vitronectin (RGD)	
αvβ3		vitronectin, fibronectin, fibrinogen (RGD)	tumstatin
αvβ5		vitronectin (RGD)	
αvβ6		fibronectin, TGF-β-LAP (RGD)	
αvβ8		vitronectin, TGF-β-LAP (RGD)	
αEβ7 (CD103, HML-1)	1178 aa	E-cadherin	
α4β7		MadCAM-1, fibronectin, VCAM-1	

Tableau 3 : Les intégrines et leurs ligands

Adapté de Barczyk et al.(Barczyk et al. 2010)

III.4.4. Un point sur le CD44

Le CD44 est une glycoprotéine ubiquitaire qui connaît une grande hétérogénéité de part de nombreuses modifications post transcriptionnelles et surtout post traductionnelles. Il s'agit d'une molécule d'adhésion qui permet des interactions intercellulaires et cellules/matrice extracellulaire. Exprimé sur les CSPH, c'est un des éléments essentiels de leur interaction avec les niches hématopoïétiques médullaires, mais aussi de leur « homing » intra-médullaire.

Le gène du CD44, situé sur le bras court du chromosome 11 est hautement conservé et comporte 20 exons. Dix exons sont dits « standards » et sont présents sur toutes les isoformes du CD44. Les autres exons sont dits « variants » et sont la cible d'un épissage alternatif, à l'origine des nombreuses isoformes du CD44. En plus de ce polymorphisme lié aux différentes isoformes de protéines, la diversité du (des) CD44 est également engendrée par de multiples modifications post traductionnelles secondaires à la liaison covalente de glycosaminoglycanes (GAG) comme la chondroitine sulfate, le dermatane sulfate et l'héparane sulfate. Les CD44 liés aux GAGs appartiennent par définition à la classe des protéoglycanes (*Ghaffari et al. 1999*).

Le principal ligand du CD44 est l'acide hyaluronique, et son affinité pour ce dernier varie en fonction du degré et du type de glycosylation. Les modifications post traductionnelles par les GAGs ont également un impact sur la spécificité de ligand du (des) CD44 ; par exemple les héparanes sulfates permettent au CD44 de présenter des facteurs de croissance, les chondroitine sulfate et dermatane sulfate permettent l'adhésion au fibrinogène et à la fibrine, le chondroitine sulfate permet l'adhésion à de nombreuses molécules de la matrice extracellulaire (fibronectine, laminine, collagène…). Parmi les autres ligands décrits, citons l'ostéopontine (*Sackstein 2011*).

A l'instar des intégrines, le CD44 n'est pas seulement une molécule d'adhésion. Après son engagement, il peut être à l'origine de l'activation de nombreuses voies de signalisation impliquant la migration cellulaire, la survie, la prolifération, la production de cytokines… Il joue également le rôle de mécano-senseur par la liaison de sa portion intracytoplasmique avec des protéines du cytosquelette, particulièrement l'ankyrine (*Ponta et al. 2003*).

Au sein du système hématopoïétique, plusieurs rôles ont été attribués au CD44. De part sa capacité d'adhésion à l'acide hyaluronique et sa capacité d'interaction avec VLA-4, il permet l'adhésion des CSPH au stroma médullaire (*Verfaillie et al. 1994; Wagner et al. 2008*) et participe à la régulation de la prolifération des CSPH et au maintien de ces derniers en

culture à long terme (*Miyake et al. 1990*). Il participe également à la présentation des facteurs de croissance aux CSPH (*Ghaffari et al. 1999*). Il a été impliqué dans le homing des CSPH comme le montrent les traitements par anticorps anti-CD44 qui diminuent la prise de greffe chez les rats (*Khaldoyanidi et al. 1997*). Enfin, une forme particulière du CD44, contenant des lactosamines sialofucosylées, dénommée HCELL (*hematopoietic cell E-/L- selectin ligand*) est capable de lier les E et L sélectines et de promouvoir le homing médullaire des CSPH ; elle peut également activer VLA-4 indépendamment du CXCR4 (*Dimitroff et al. 2000; Dimitroff et al. 2001; Sackstein 2011*) (cf. le chapitre sur la mobilisation).

IV. LA CIRCULATION DES CSPH

La capacité des CSH à circuler dans le sang périphérique a été découverte grâce à des expériences de greffes chez la souris (*Becker et al. 1963*). Si les CSH sont physiologiquement localisées dans la moelle osseuse, elles sont capables de la quitter pour circuler dans le sang (mobilisation) ou de la rejoindre lorsqu'elles sont injectées par voie intra-veineuse («*homing* »/domiciliation/nichage). Ces processus de mobilisation/homing ont été démontrés sur des modèles murins parabiotiques ayant une circulation sanguine partagée (*Wright et al. 2001; Abkowitz et al. 2003*) ; ils existent en conditions physiologiques et sont augmentés en cas de stress (chimiothérapie, hémorragies et infections importantes, effort…) (*Barrett et al. 1978; To et al. 1984*). Chez l'adulte, environ 0,06% de CSPH $CD34^+$ circulent dans le sang en conditions physiologiques (*Korbling and Anderlini 2001*). Ces cellules recolonisent la moelle osseuse de façon continue, tout en étant parallèlement remplacées par d'autres CSPH mobilisés depuis la moelle osseuse ; cette circulation continue des CSPH est nécessaire à l'homéostasie du système hématopoïétique (*Wright et al. 2001*). Ces propriétés sont largement utilisées en clinique, qu'il s'agisse du « homing » lors de greffe de moelle, ou de la mobilisation et du « homing » lors de greffes de cellules souches périphériques (CSP). Ces greffes de CSP reposent sur la capacité à mobiliser les CSPH par chimiothérapie et/ou par des molécules capables d'interagir sur les interactions entre les CSH et leurs niches médullaires (G-CSF, AMD 3100…).

Ces deux processus de mobilisation/homing sont contrôlés par des mécanismes moléculaires distincts, mais qui se recoupent, au premier rang desquels figure le couple CXCR4/CXCL12 (*Peled et al. 1999; Petit et al. 2002*).

IV.1. Le homing des CSPH

Pour pénétrer dans la moelle osseuse, les CSPH doivent être capables de « reconnaître » les cellules endothéliales des sinusoïdes médullaires et d'y adhérer en résistant au courant permanant produit par le flux sanguin. Ces évènements sont possibles grâce aux molécules d'adhérence et récepteurs de chimiokines exprimés par les CSPH ainsi qu'à leurs partenaires spécifiques au niveau de l'endothélium médullaire. Le processus de recrutement extravasculaire des cellules hématopoïétiques, CSPH inclus, est bien décrit et implique la succession de trois étapes d'adhésion vasculaire avant que les cellules puissent rejoindre leur

tissus cible (*Ley et al. 2007*). La première étape d'adhésion met en œuvre des molécules d'adhérence primaires capables d'engager rapidement leurs ligands pendant une durée très courte, à l'origine d'un ralentissement et d'un « roulement » des cellules au contact de l'endothélium. Pour adhérer de façon « solide », les cellules doivent recevoir des signaux d'activation provenant le plus souvent de chimiokines membranaires (à la surface des cellules endothéliales) ou solubles. Cette activation est à l'origine d'un changement de conformation des intégrines de surface, qui permet l'adhésion « forte » des cellules hématopoïétiques à des ligands endothéliaux de la superfamille des immunoglobulines. La troisième étape est la migration trans-endothéliale des cellules adhérentes vers les tissus cibles.

Les techniques de microscopie intra-vitale ont permis de préciser les mécanismes moléculaires à l'origine des interactions entre les sinusoïdes médullaires et les CSPH à chacune de ces trois étapes. Les sinusoïdes médullaires expriment naturellement les E- et P-sélectines ainsi que VCAM-1 (*Mazo et al. 2002*), alors que ces molécules d'adhérence ne sont exprimées qu'en condition de stress inflammatoire dans les autres compartiments vasculaires de l'organisme (*Mazo and von Andrian 1999*). La phase de roulement initiale se fait grâce à l'interaction des sélectines endothéliales et de VCAM-1 avec leurs récepteurs à la surface des CSPH : PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) et l'intégrine α4ß1/VLA-4 de faible affinité. La phase d'adhésion forte repose sur VLA-4 activée, dont l'affinité est nettement augmentée (*Mazo et al. 1998*). La chimiokine CXCL12 joue un rôle clef dans les deuxièmes et troisièmes étapes. En effet, les CSPH « roulant » au contact de l'endothélium des sinusoïdes médullaires sont exposés au gradient de CXCL12, libéré par l'endothélium. L'activation du CXCR4, principal récepteur de CXCL12, couplé aux protéines G, présent à la surface des CSPH active VLA-4 et assure ainsi une adhésion forte à l'endothélium (*Peled et al. 1999*). Après cette phase d'adhésion, CXCL12 induit une transmigration endothéliale intégrine-dépendante (diapédèse), qui implique notamment des molécules d'adhérence comme PECAM-1 (*Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*) (*Yong et al. 1998*) et CD99/MIC2 (*Imbert et al. 2006*).

D'autres molécules d'adhérence comme les intégrines VLA-5 et LFA-1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen 1*) interviennent au stade d'adhésion/migration trans-endothéliale mais leur rôle est moins bien défini que celui de VLA-4 (*Peled et al. 2000*). Le rôle du CD44 dans les deux premières phases a été récemment décrit. Il est notamment impliqué dans la phase initiale de roulement, et est par ailleurs capable d'activer directement VLA-4, par la voie des protéines G sans nécessiter l'intermédiaire du couple CXCL12/CXCR4 (*Thankamony and Sackstein 2011*). Il existerait donc une possibilité

d'initiation du homing des CSPH, indépendamment du couple CXCL12/CXCR4, passant par l'isoforme HCELL, aussi appelée « *bone homing receptor* » (*Sackstein 2011*).
Une fois la diapédèse effectuée, la migration intra-médullaire des CSPH se fait suivant un gradient de CXCL12 produit par les cellules des niches médullaires et fait également intervenir l'interaction du CD44 avec ses ligand matriciels, l'acide hyaluronique et l'ostéopontine (*Avigdor et al. 2004*).

Les CSPH se localisent ensuite au niveau des niches hématopoïétiques médullaires, où interviennent différents mécanismes d'adhésion et/ou de chimiotactisme, dont certains ont déjà été évoqués dans le chapitre précédent. Revenons sur les principales molécules:
- Le CXCL12 est produit par les cellules des niches pour favoriser la migration et le maintien des CSPH à leur niveau (*Jung et al. 2006; Sugiyama et al. 2006*).
- Le couple SCF/c-KIT est impliqué *via* son effet chimiotactique (*Okumura et al. 1996*) et sa capacité à favoriser l'adhésion des CSPH aux cellules des niches en activant les intégrines béta-1 (*Kovach et al. 1995*). La forme membranaire du SCF permet également une interaction stable entre les cellules stromales/ostéoblastes et les CSPH c-KIT^{+}, favorisant par là même leur adhésion au stroma (*Toksoz et al. 1992*).
- Le couple VCAM-1/VLA-4 est un élément majeur de l'adhésion des CSPH aux niches. Les études sur des modèles murins conditionnellement invalidés pour l'une ou l'autre de ces molécules (*Scott et al. 2003; Ulyanova et al. 2005*) et l'administration d'anticorps neutralisant VLA-4 (*Papayannopoulou and Nakamoto 1993*) ont montré la survenue d'une augmentation rapide du nombre de PH circulants après inhibition de ce couple, en faveur de son rôle dans la rétention des CSPH au sein des niches médullaires.
- Le récepteur sensible au calcium (CaR) exprimé sur les CSPH, en augmentant l'affinité de CXCR4 vis-à-vis de CXCL12, favorise leur localisation au niveau des zones endostéales, riches en calcium sous l'effet de l'activité ostéoclastique (*Lam et al. 2011*).
- Le CD44 permet l'adhésion des CSPH à la matrice par l'acide hyaluronique et l'ostéopontine (*Wilson and Trumpp 2006*), son blocage s'accompagne de leur mobilisation (*Vermeulen et al. 1998*).
- D'autres molécules sont impliquées dans l'adhésion aux niches médullaires, comme l'intégrine $\alpha 5ß1$ (interaction avec la fibronectine matricielle) (*Wilson and Trumpp 2006*), les intégrines-ß2 $CD11_{a/b}$/CD18 (interaction avec ICAM-1 « *intercellular adhesion molecule-1* » des cellules des niches) (*Velders et al. 2002*), NCAD (interaction homotypique avec NCAD endostéal) (*Zhang et al. 2003*).
La figure 8 résume les étapes du homing des CSPH.

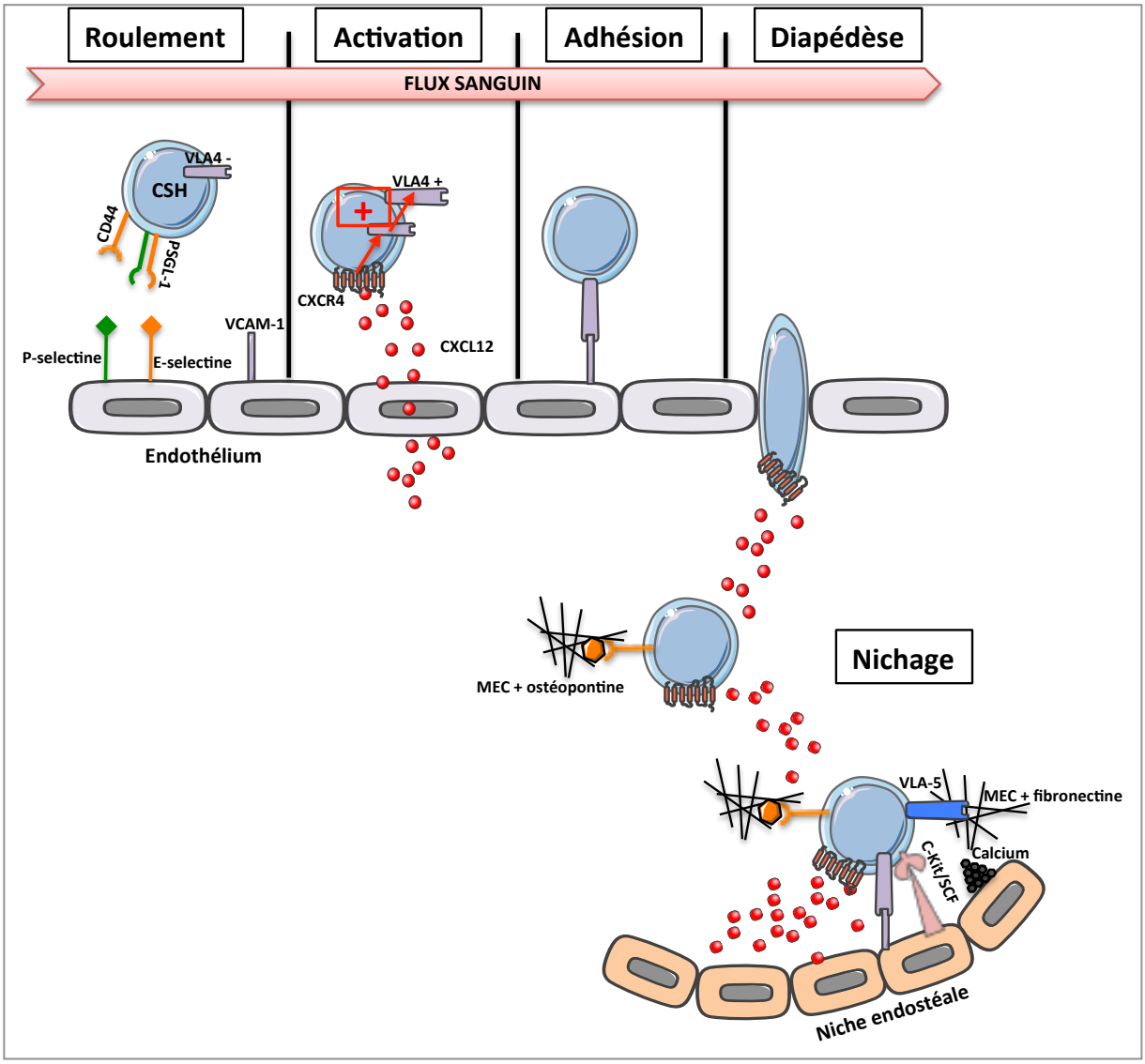


Figure 8 : Schéma récapitulatif du « homing » des CSPH,

Au contact des E et P-sélectines de l'endothélium des sinusoïdes médullaires, les CSH, par l'intermédiaire du CD44 et de PSGL-1, ralentissent en initiant une phase de roulement à proximité de l'endothélium. Cette phase de roulement permet leur exposition au CXCL12, libéré depuis la moelle osseuse dans la circulation, qui permet l'activation de VLA-4 via le CXCR4 et une signalisation par les protéines G. VLA-4 activée permet une adhésion « forte » des CSH au VCAM-1 de l'endothélium médullaire et l'initiation d'une diapédèse suivant le gradient de CXCL12. Une fois dans la moelle les CSH suivent le gradient de CXCL12, et de calcium jusqu'aux niches médullaires grâce à leur motilité propre et à l'adhésion à la matrice extracellulaire. Une fois dans les niches, elles sont maintenues au contact du stroma médullaire par les gradients de chimiokines/ions (CXCL12, calcium…) les cytokines (SCF, TPO, Ang1…) et les molécules d'adhésion (CD44, VLA-4, VLA-5…).
Notons que l'engagement de CD44 par les E/P-sélectines pourrait directement activer VLA-4 par la voie des protéines G, indépendamment de CXCR4.

IV.2. La mobilisation des CSPH

Bien qu'existant de façon physiologique à des niveaux bas, la mobilisation a surtout été étudiée dans des conditions de stimulations pharmacologiques, particulièrement après stimulation par G-CSF, SCF, IL-8 ou après inhibition du couple CXCR4/CXCL12 (*de Revel et al. 1994; Laterveer et al. 1995; Broxmeyer et al. 2005*).

Les mécanismes qui induisent la mobilisation reposent sur l'inhibition des interactions clefs du homing/nichage et concernent de façon prédominante les couples CXCR4/CXCL12 et VLA-4/VCAM-1.

Lors des mobilisations pharmacologiques, particulièrement sous G-CSF, on peut observer une diminution des taux de CXCL12 médullaire, tant au niveau protéique (*Petit et al. 2002; Levesque et al. 2003*) qu'au niveau des ARNm (*Semerad et al. 2005*), conduisant à un gradient transitoire de CXCL12 vers le sang. Ce gradient de CXCL12 permet d'attirer les CSPH dans la circulation sanguine (*Hattori et al. 2001*), d'autant plus que ces derniers sur-expriment CXCR4 après stimulation par G-CSF (*Petit et al. 2002*). Des éléments indirects suggèrent par ailleurs l'altération du couple VCAM-1/VLA-4 lors de la mobilisation par G-CSF chez l'homme : les CSPH du sang mobilisé expriment moins VLA-4 que les CSPH médullaires (*Lichterfeld et al. 2000*) et le processus de mobilisation s'accompagne de la libération plasmatique de VCAM-1 soluble (*Sudhoff and Sohngen 2002*).

Un des mécanismes à l'origine de ces effets, longtemps considéré comme le plus important, est la libération d'enzymes protéolytiques par les éléments du micro-environnement médullaire et les polynucléaires neutrophiles d'une part (MMP-9 « *matrix metalloproteinase* », cathepsine K, cathepsine G, élastase, carboxypeptidase M…) (*Heissig et al. 2002; Kollet et al. 2006*), et par les CSPH eux mêmes d'autre part (dipeptidase CD26). La conséquence de ce processus est la dégradation des éléments moléculaires de la niche : CXCL12, SCF, VCAM-1 et CD44 notamment (*Lapid et al. 2008*).

Ce n'est que plus récemment que les progrès dans la compréhension de la régulation des niches hématopoïétiques médullaires ont fait apparaître le rôle majeur du système nerveux sympathique (SNS) et des macrophages médullaires dans la mobilisation des CSPH.

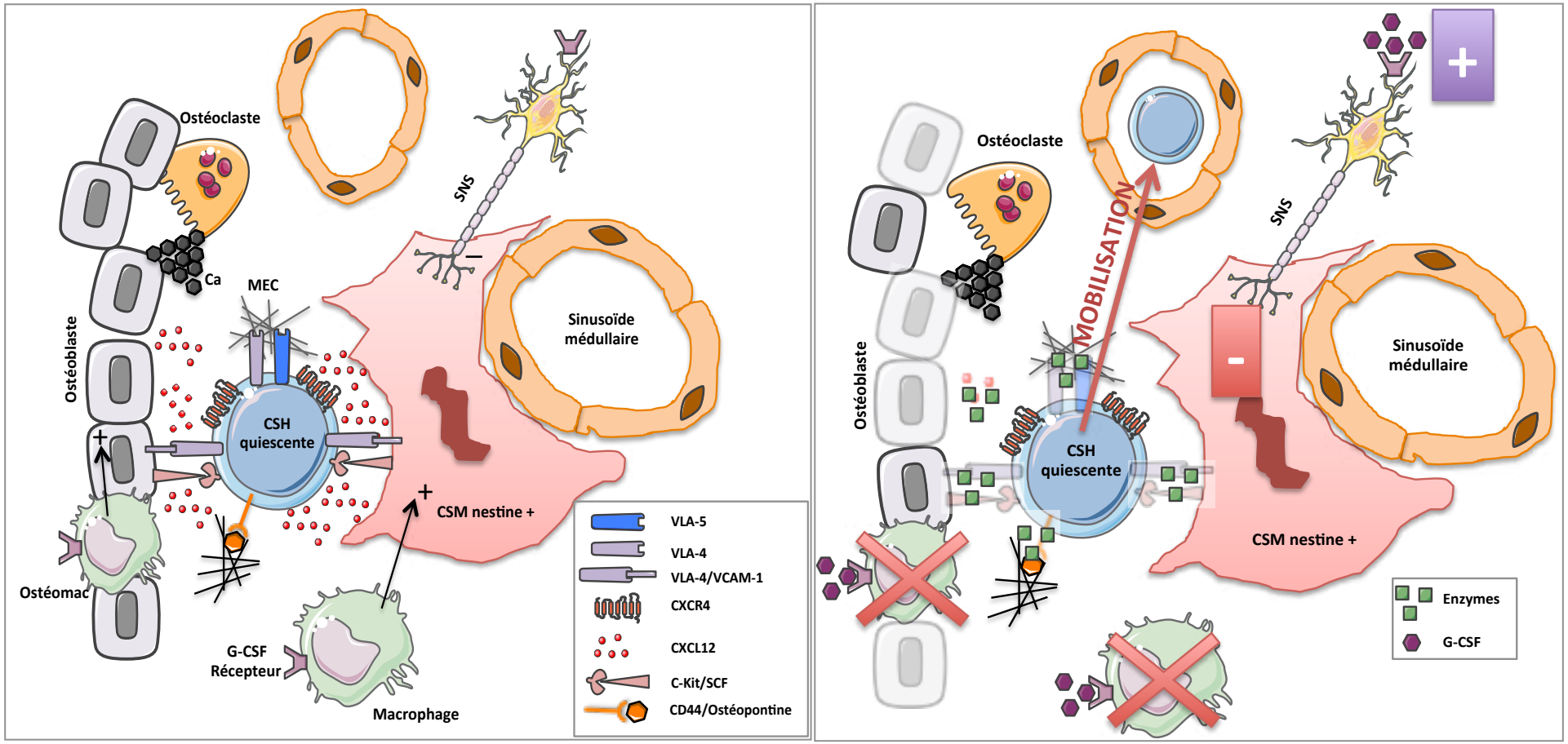
Le SNS est capable de diminuer le nombre d'ostéoblastes de l'endoste par un effet ß2 adrénergique et d'inhiber la sécrétion de CXCL12 par les CSM nestine$^+$ *via* les récepteurs ß3 adrénergiques, réduisant ainsi la production de CXCL12 et favorisant la mobilisation des CSPH, selon un rythme circadien physiologique, ou en réponse au G-CSF (*Katayama et al. 2006; Mendez-Ferrer et al. 2008; Mendez-Ferrer et al. 2010; Mendez-Ferrer et al. 2010*).

Comme nous l'avons précisé dans le chapitre précédent, les monocytes/macrophages médullaires sont des éléments majeurs promouvant le maintien des ostéoblastes de la niche endostéale et des CSM nestine$^+$ de la niche périvasculaire. Leur déplétion s'accompagne d'une réduction du nombre d'ostéoblastes et de CSM nestine$^+$ médullaires et d'une diminution de la sécrétion de CXCL12 (*Chow et al. 2010; Winkler et al. 2010*). Christopher *et al.*, ont montré que le G-CSF induisait une déplétion des monocytes/macrophages médullaires et des ostéoblastes de l'endoste, confirmant le rôle de ces cellules dans la mobilisation (*Christopher et al. 2011*).

Enfin, le système du complément a été récemment impliqué dans la mobilisation des CSPH, aussi bien après G-CSF qu'après AMD 3100. Les éléments de la cascade du complément sont capables de moduler le couple CXCR4/CXCL12 en faveur d'une mobilisation, directement (*Jalili et al. 2010*), ou indirectement en induisant la libération de protéases (*Ratajczak et al. 2004; Lee et al. 2010*). Le complément pourrait également favoriser la mobilisation des CSPH de façon plus directe, après stimulation par G-CSF, en augmentant du taux plasmatique de sphingosine-1-phosphate, puissant chimio-attractant des CSPH (*Ratajczak et al. 2010*).

La figure 9 résume les mécanismes de mobilisation des CSPH.

Figure 9 : Schéma récapitulatif de la mobilisation des CSPH



En situation « physiologique », les CSH sont maintenues dans les niches hématopoïétiques médullaires d'une part par un gradient de chimiokines (principalement CXCL12) et de calcium, d'autre part par des molécules d'adhésion aux cellules de la niche ou à la matrice extracellulaire (VLA-4, VLA-5, CD44…). Les macrophages/ostéomacs promeuvent le maintien des ostéoblastes et des CSM nestine$^+$. Le tonus sympathique, en régulant la libération de CXCL12 par les CSM nestine$^+$ assure une « mobilisation » physiologique des CSH selon un rythme circadien.

Le traitement par G-CSF :
- renforce le tonus sympathique qui inhibe la libération de CXCL12 par les CSM nestine$^+$
- entraine une déplétion en macrophages médullaires et ostéomacs avec pour conséquence une déplétion en ostéoblastes et CSM nestine$^+$
- entraine une libération d'enzymes (cathepsine G, MMPs, dipeptidase CD26…) par les cellules du microenvironement médullaire, les polynucléaires neutrophiles et même les CSH, avec pour conséquence une lyse du CXCL12 et des molécules d'adhésion
Il en résulte une inversion du gradient de CXCL12 et un défaut d'adhésion des CSH qui conduisent à une mise en cycle et une mobilisation des CSH.

V. LES CELLULES SP

V.1. Les cellules hématopoïétiques SP murines.

Goodell *et al.* ont été les premiers à décrire les cellules SP murines (*Goodell et al. 1996*). Le Hoechst 33342 est un colorant fluorescent qui se fixe à l'ADN des cellules vivantes, utilisé habituellement comme marqueur du cycle cellulaire car il est corrélé à la quantité d'ADN cellulaire. Goodell *et al.* ont décrit un profil de fluorescence spécifique lorsque les cellules médullaires sont marquées au Hoechst 33342 et que l'émission de fluorescence est analysée par cytométrie en flux sur deux longueurs d'onde différentes (dans le rouge et dans le bleu). Ils ont pu ainsi décrire une « Side Population » (SP) correspondant à des cellules vivantes retenant faiblement le Hoechst, à l'opposé de la « Main Population » (MP). En présence de vérapamil, un inhibiteur des pompes de type « multidrug resistance» (MDR), la population SP disparaît, évoquant un mécanisme d'efflux actif du colorant par des pompes MDR (Figure10). Cette population de cellules SP correspond à environ 0,1% des cellules médullaires et est essentiellement Sca-1^+ Lin^-. Elle représente en effet 10% des cellules Sca-1^+ Lin^- qui représentent 1% des cellules médullaires. Des expériences de greffes ont montré que les cellules SP représentent une population enrichie en CSH par rapport à la moelle totale, et sont capable de reconstituer les compartiments lymphoïdes et myéloïdes. Elles sont par ailleurs majoritairement quiescentes avec moins de 3% de cellules en phases S-G2M (*Goodell et al. 1996*).

Zhou *et al.* ont ensuite étudié les ABC transporteurs à l'origine de la fonctionnalité SP et montré que si d'autres gènes d'ABC transporteurs étaient exprimés dans les cellules SP (Mrp1, Mrp3, Mrp4), ABCG2 était le seul impliqué dans la genèse du phénotype SP (*Zhou et al. 2001*).

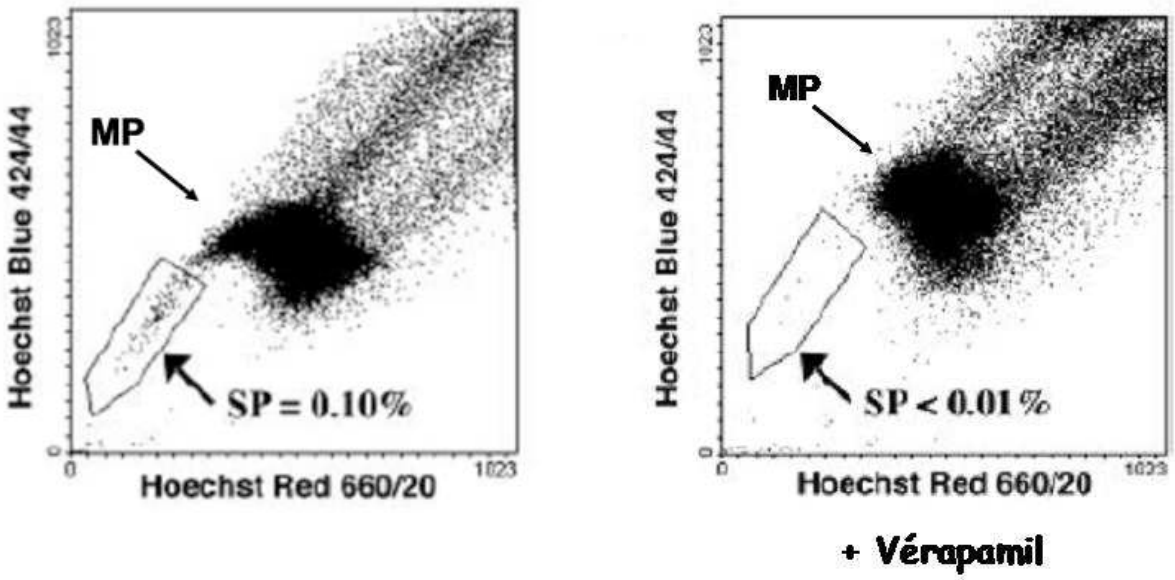


Figure 10 : Les cellules SP hématopoïétiques murines

Niveaux d'expression de la fluorescence du Hoechst 33342 par des cellules médullaires murines en présence/absence de vérapamil.
L'expression de la fluorescence sur les axes de longueur d'onde bleu et rouge permet de définir une population dite Side Population (SP) qui efflue le Hoechst et dont le niveau de fluorescence décroit progressivement, à l'opposé d'une Main Population (MP) qui incorpore le Hoechst de façon homogène. Si l'incubation se fait en présence de vérapamil, la population SP disparaît, traduisant l'implication d'un efflux actif dans l'acquisition de cette fonction.
(d'après Challen et al.(Challen and Little 2006))

V.2. La famille des ABC transporteurs et ABCG2

La famille des ABC transporteurs est composée de protéines membranaires impliquées dans le transport d'une grande variété de substrats au travers de membranes intra et extra-cellulaires, notamment des drogues, toxines, peptides, lipides endogènes, nucléotides et stérols. Ces protéines enchâssées dans la membrane cellulaire sont capables, par un mécanisme d'efflux actif ATP-dépendant, de limiter la concentration intra-cellulaire de ces substrats. Retrouvées dans de multiples types cellulaires et tissus, elles jouent un rôle capital dans la détoxification et la protection contre les substances xénobiotiques.

A ce jour, 49 ABC transporteurs ont été décrits chez l'homme, divisés en 7 sous-familles (de ABCA à ABCG) (Tableau 4).

Tableau 4 : Les 7 familles d'ABC transporteurs

adapté de Vasiliou et al.(Vasiliou et al. 2009)

Gene	Chromosome location	Function
ABCA1	9q31.1	Cholesterol efflux onto HDL
ABCA2	9q34	Drug resistance
ABCA3	16p13.3	Multidrug resistance
ABCA4	1p22	*N*-retinylidene-phosphatidylethanolamine (PE) efflux
ABCA5	17q24.3	Urinary diagnostic marker for prostatic intraepithelial neoplasia (PIN)
ABCA6	17q24.3	Multidrug resistance
ABCA7	19p13.3	Cholesterol efflux
ABCA8	17q24	Transports certain lipophilic drugs
ABCA9	17q24.2	Might play a role in monocyte differentiation and macrophage lipid homeostasis
ABCA10	17q24	Cholesterol-responsive gene
ABCA12	2q34	Has implications for prenatal diagnosis
ABCA13	7p12.3	Inherited disorder affecting the pancreas
ABCB1	7q21.1	Multidrug resistance
ABCB2 (*TAP1*)	6p21.3	Peptide transport
ABCB3 (*TAP2*)	6p21.3	Peptide transport
ABCB4	7q21.1	Phosphatidylcholine (PC) transport
ABCB5	7p15.3	Melanogenesis
ABCB6	2q36	Iron transport
ABCB7	Xq12-q13	Fe/S cluster transport
ABCB8	7q36	Intracellular peptide trafficking across membranes
ABCB9	12q24	Located in lysosomes
ABCB10	1q42.13	Export of peptides derived from proteolysis of inner-membrane proteins
ABCB11	2q24	Bile salt transport
ABCC1	16p13.1	Drug resistance
ABCC2	10q24	Organic anion efflux
ABCC3	17q22	Drug resistance
ABCC4	13q32	Nucleoside transport
ABCC5	3q27	Nucleoside transport
ABCC6	16p13.1	Expressed primarily in liver and kidney
ABCC7 (*CFTR*)	7q31.2	Chloride ion channel (same as *CFTR* ge in cystic fibrosis)
ABCC8	11p15.1	Sulfonylurea receptor
ABCC9	12p12.1	Encodes the regulatory SUR2A subunit the cardiac K^+(ATP) channel
ABCC10	6p21.1	Multidrug resistance
ABCC11	16q12.1	Drug resistance in breast cancer
ABCC12	16q12.1	Multidrug resistance
ABCC13	21q11.2	Encodes a polypeptide of unknown function
ABCD1	Xq28	Very-long-chain fatty acid (VLCFA) transport
ABCD2	12q11–q12	Major modifier locus for clinical diversi in X-linked ALD (X-ALD)
ABCD3	1p22–p21	Involved in import of fatty acids and/or fatty acyl-coenzyme As into the peroxisome
ABCD4	14q24	May modify the ALD phenotype
ABCE1	4q31	Oligoadenylate-binding protein
ABCF1	6p21.33	Susceptibility to autoimmune pancreati
ABCF2	7q36	Tumour suppression at metastatic sites in endocrine pathway for breast cancer drug resistance
ABCF3	3q27.1	Also present in promastigotes (one of forms in the life cycle of trypanosomes
ABCG1	21q22.3	Cholesterol transport
ABCG2	4q22	Toxicant efflux, drug resistance
ABCG4	11q23.3	Found in macrophage, eye, brain and spleen
ABCG5	2p21	Sterol transport
ABCG8	2p21	Sterol transport

V.2.1. Structure des ABC transporteurs

Chez les mammifères, les protéines ABC fonctionnellement actives sont composées de quatre domaines : deux domaines transmembranaires et deux domaines cytoplasmiques de fixation des nucléotides, dont la molécule d'ATP. Ces quatre domaines peuvent être regroupés en une chaine polypeptidique (protéine entière), ou être représentés par deux protéines séparées (demi-transporteurs). Dans ce dernier cas, les transporteurs ABC deviennent fonctionnellement actifs après dimérisation. Ils contiennent ainsi deux régions symétriques, séparées par un bras flexible, les domaines transmembranaires jouant un rôle structural clef dans la fonction de ces transporteurs. Ils contiennent des chaines polypeptidiques pouvant traverser la membrane plasmique plusieurs fois, formant six hélices α transmembranaires par domaine. Cette structure représente un total de douze hélices par transporteur, formant une structure en forme de pores à travers la membrane plasmique. Par cette organisation structurale, les ABC transporteurs peuvent effluer un grand nombre de molécules au travers de la membrane plasmique des cellules qui les expriment ; ils sont également étroitement dépendants de changements de conformation allostériques, qui régulent l'ouverture et la fermeture des pores membranaires. Après fixation de nucléotides au niveau des domaines cytoplasmiques, appelés « domaines Walker A/B », les protéines ABC peuvent utiliser l'énergie dérivée de l'hydrolyse de l'ATP, pour induire le passage actif de leurs substrats au travers des membranes plasmiques (*Linton 2007*) (figure 11).

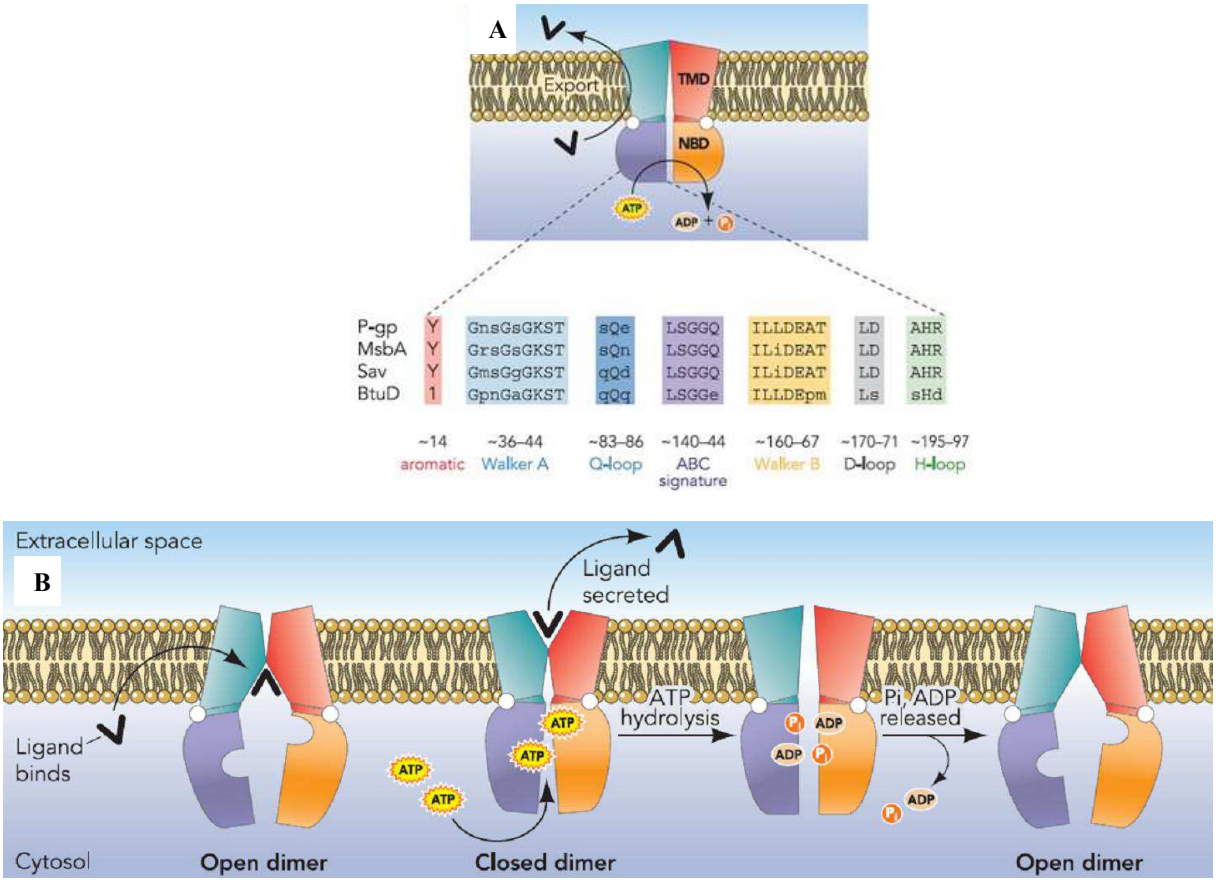


Figure 11 : Structure et fonction des ABC transporteurs

A : *Les ABC transporteurs fonctionnels sont composés de deux domaines transmembranaires (TMD) et de deux domaines de fixation des nucléotides (NBD). Les deux domaines transmembranaires ne sont pas homologues entre les différentes sous familles, alors que les domaines de fixation des nucléotides le sont, chacun d'entre eux ayant 7 motifs hautement conservés.*
B : *La fixation du ligand au niveau du domaine transmembranaire induit un changement de conformation au niveau du site de fixation nucléotidique qui augmente son affinité pour l'ATP. Deux molécules d'ATP se fixent sur le site de fixation nucléotidique qui passe en conformation fermée, ce qui induit un changement de conformation du domaine transmembranaire à l'origine de la translocation du ligand. L'hydrolyse de l'ATP par le dimère nucléotidique « fermé » induit sa réouverture, de nouveaux changements de conformation du domaine transmembranaire, la libération d'ADP et de phosphate et le retour de l'ABC transporteur à sa conformation initiale, prêt pour un nouveau cycle d'efflux.*
(d'après Linton (Linton 2007))

V.2.2. Le transporteur ABCG2

ABCG2 est un des ABC transporteurs humains impliqué dans le phénomène de « multidrug resistance » en oncologie, les principaux étant ABCB1 (correspondant à la p-glycoprotéine ou MDR1), ABCC1 (correspondant à *multidrug resistance associated protein 1* ou MRP1) et ABCG2 (correspondant à *breast cancer resistant protein* ou BCRP) (*Schinkel and Jonker 2003*). ABCG2 a été mis en évidence suite à l'étude de lignées cellulaires résistant à la mitoxantrone ne sur-exprimant ni ABCB1, ni ABCC1 (*Ross et al. 1999*).

V.2.2.1. Structure d'ABCG2

ABCG2 est un demi-transporteur comportant un domaine transmembranaire et un domaine cytosolique de fixation nucléotidique. Il doit donc former un homodimère pour être fonctionnel. En pratique, plusieurs homodimères sont habituellement associés en tétramères, octamères ou dodécamères par des ponts di-sulfites à la surface des cellules (*Mo and Zhang 2012*).

V.2.2.2. Le gène ABCG2

Le gène ABCG2 humain est localisé sur le chromosome 4, en 4q22. Il est composé de 16 exons et 15 introns (figure 12). Les mécanismes moléculaires de régulation de l'expression d'ABCG2 sont imparfaitement connus. Ce gène possède un promoteur de type « TATA-less » avec divers sites SP1, AP1, AP2 et une boite CCAAT en aval d'un possible îlot CpG. Le promoteur ABCG2 possède des éléments cis régulateurs de réponse aux hormones et à l'hypoxie (*Kenneth and Rocha 2008*). En effet, le gène ABCG2 est surexprimé dans des conditions hypoxiques (*Krishnamurthy et al. 2004; Krishnamurthy and Schuetz 2005*), mettant en évidence le rôle de la molécule HIF-1 dans la régulation d'ABCG2 en se fixant sur des séquences de type HRE (« hypoxia responsive element » (*Semenza 2001*). Il a été également démontré une régulation épigénétique du gène ABCG2, par hypométhylation (*To et al. 2006*) ou acétylation des histones (*To et al. 2008*). Enfin, à la différence des autres ABC transporteurs, ABCG2 possède un polymorphisme génique et un grand nombre de variants protéiques qui pourraient présenter des propriétés fonctionnelles différentes (*Staud and Pavek 2005*).

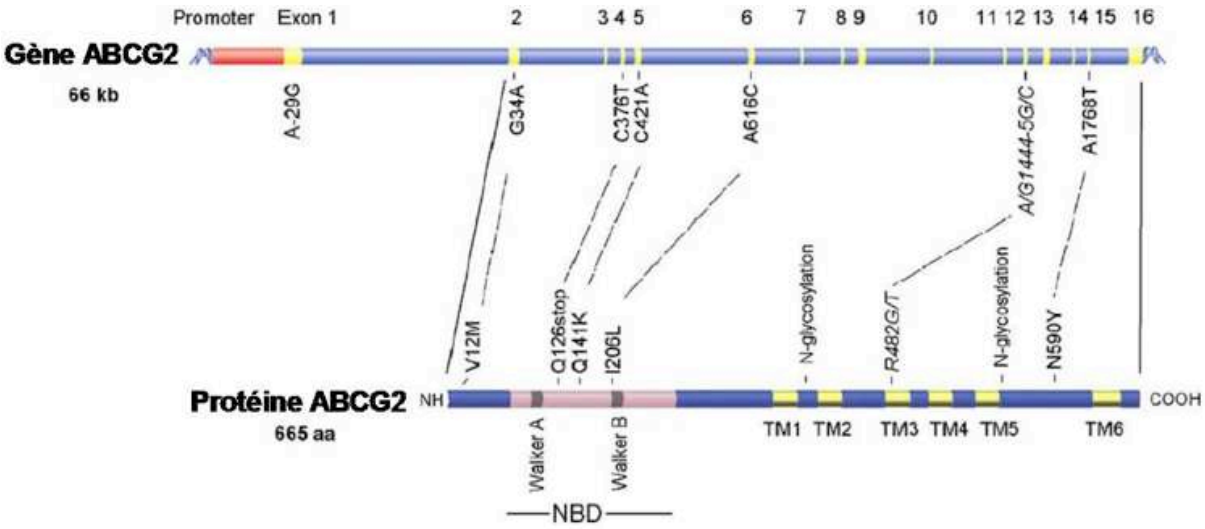


Figure 12 : Du gène à la protéine ABCG2

Le promoteur d'ABCG2, situé en amont de l'exon 1, contient des séquences régulatrices de la transcription. Sur le gène, les exons sont numérotés de 1 à 16 et indiqués par des boites jaunes. Les introns sont indiqués en bleu. A l'extrémité N-terminale de la séquence protéique sont représentés les motifs Walker A et B permettant la fixation et l'hydrolyse de l'ATP. La protéine ABCG2 contient six domaines transmembranaires (TM1-6) et peut se dimériser pour former ABCG2 fonctionnel. Les sites de polymorphisme nucléotidique sont indiqués.
(d'après Staud *et al.*(*Staud and Pavek 2005*))

V.2.2.3. Les rôles physiologiques d'ABCG2

ABCG2 est exprimé dans de nombreux tissus : tissus hématopoïétique, placenta, épithéliums de l'intestin grêle et du colon, canaux biliaires, glande mammaire (*Maliepaard et al. 2001*), épithélium de la vésicule biliaire (*Aust et al. 2004*), cerveau, pneumocytes alvéolaires, glandes sébacées, cellules interstitielles testiculaires, épithélium prostatique, cellules endo-cervicales utérines, ilôts pancréatiques, glandes surrénales, tubules rénaux, hépatocytes (*Fetsch et al. 2006; Huls et al. 2008*).

Au niveau du tube digestif, il est physiologiquement exprimé au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales avec une expression décroissante du duodénum au rectum. On le retrouve également au niveau des canalicules biliaires, ce qui fait évoquer son rôle pour à la fois limiter l'absorption des xénobiotiques et augmenter l'excrétion des toxiques : l'administration d'un inhibiteur d'ABCG2 est à l'origine d'une accumulation de topotecan administré oralement. Cette accumulation est secondaire à une augmentation de l'absorption intestinale et un défaut d'élimination biliaire et urinaire (*Kruijtzer et al. 2002*).

Au niveau de la barrière hémato-encéphalique, à la surface endothéliale des micro-vaisseaux, il coopère avec ABCB1 pour bloquer l'accès aux toxiques (*Zhang et al. 2003*).

Au niveau du placenta, il joue un rôle majeur dans la protection du fœtus contre des drogues et toxiques (*Jonker et al. 2000*).

Nous reviendrons ultérieurement sur son rôle dans la biologie des CSPH.

V.2.2.4. Les substrats d'ABCG2

Les substrats d'ABCG2 actuellement décrits sont très nombreux, notamment des cytotoxiques anticancéreux (inhibiteurs de topo-isomérase, anthracyclines, antimétabolites), des inhibiteurs de tyrosine kinase, des dérivés sulfatés ou glucurono-conjugués de xénobiotiques, des photosensibilisants, des colorants fluorescents et de nombreux autres molécules dont des vitamines (B2, K3, B9), des antibiotiques (quinolones, érythromycine), des antiviraux (zidovudine, lamivudine, ganciclovir), des anti-inflammatoires (sulfasalazine, diclofenac) (Tableau 5).

Topoisomerase inhibitors
- Mitoxantrone (topoisomerase II inhibitor)
- Bisantrene (topoisomerase II inhibitor)
- Etoposide (topoisomeriase II inihibitor)
- Becatecarin (topoisomerase II inhibitor)
- NB-506, J-107088 (topoisomerase I inhibitors)

Anthracyclines (Topoisomerase II inhibitors)
- Daunorubicin
- Doxobucincin
- Epirubicin
- Pirarubicin

Camptothecin analogs (Topoisomerase I inhibitors)
- Topotecan
- SN-38
- CPT-11
- 9-aminocamptothecin
- NX211
- DX-8951f
- Homocamptothecins
- BN80915 (diflomotecan)
- Gimatecan
- Belotecan

Tyrosine kinase inhibitors
- Gefitinib
- Dasatinib
- Erlotinib
- Vandetanib
- Nilotinib
- Sorafenib
- Tandutinib
- CI1033 (Pan-HER TKI)
- CP-724,714 (HER2 TKI)
- Symadex (fms-like tyrosine kinase 3 inhibitor)

Antimetabolites
- MTX, MTX diglutamate, MTX triglutamate (antifolate)
- GW1843, Tomudex (antifolates)
- Trimetrexatte, piritrexim, metoprine, pyrimethamine
- 5-fluorouracil (pyrimidine analog)
- CdAMP (nucleotide), cladribine (nucleoside)

Other anticancer drugs
- Flavopiridol (cyclin-dependent kinase inhibitor)
- JNJ-7706621 (CDK and aurora kinases inhibitor)
- Bicalutamide (non-steroidal anti-androgen)
- NSC73306
- Phenethyl isothiocyanate (PEITC)
- TH-337 (indazole-based tubulin inhibitors)

Sufate and glucuronide conjugates of xenobiotics
- Estrone 3-sulfate (E1S)
- 17beta-estradiol sulfate
- DHEAS
- 4[35S]-methylumbelliferone sulfate
- E3040 sulfate
- Troglitazone sulfate
- 3-O-sulfate conjugate of 17alpha-ethinylestradiol
- SN-38-glucuronide
- [3H]17beta-estradiol-17beta-D-glucuronide
- [14C]4-methylumbelliferone glucuronide
- BP-3-sulfate and BP-3-glucuronide
- Phenolic MPA glucuronide

Photosensitizers
- Pheophorbide a
- Pyropheophorbide a methyl ester
- Chlorine E6
- 5-aminolevulinic acid
- Phytoporphyrin
- HPPH

Natural compounds and toxins
- Folic acid
- Urate
- Genistein
- Riboflavin (vitamin B2)
- Vitamin K3, plumbagin
- Glutathione (GSH)
- Sphingosine 1-phosphate
- PhIP (carcinogen)
- PPIX (heme precursor)

Fluorescent dyes
- Rhodamine 123
- Hoechst 33342
- Lysotracker green
- BODIPY-prazosin
- D-luciferin (firefly luciferase substrate)
- Cholyl-L-lysyl-fluorescein (fluorescent bile salt derivative)
- BODIPY-FL-dihydropyridine

Others
- [(125)I]Iodoarylazidoprazosin (IAAP), [(3)H]azidopine
- Sulfasalazine (anti-inflammatory)
- Erythromycin (macrolide antibiotic)
- Ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin,enrofloxacin, grepafloxacin, ulifloxacin antibiotics)
- Nitrofurantoin (urinary tract antibiotic)
- Moxidectin (parasiticide)
- Albendazole suloxide and oxfendazole (anthelmintics)
- Ganciclovir (antiviral drug)
- Zidovudine (NRTI)
- Lamivudine (NRTI)
- Leflunomide and A771726 (antirheumatic drugs)
- Diclofenac (analgesic and anti-inflammatory drug)
- Cimetidine (histamine H2-receptor antagonist)
- ME3277 (hydrophilic glycoprotein IIb/IIIa antagonist)
- Pitavastatin (HMG-CoA reductase inhibitor)
- Rosuvastatin (HMG-CoA reductase inhibitor)
- Dipyridamole (thromboxane synthase inhibitor)
- Glyburide (hypoglycemic agent)
- Nicardipine, nifedipine, nitrendipine (Ca^{2+} channel blocker)
- Olmesartan medoxomil (angiotensin II AT1-R antagonist)
- Befloxatone (selective monoamine oxidase inhibitor)
- Prazosin (alpha-1-adrenergic receptor antagonist)
- Riluzole (Na^{+} channels blocker)
- Amyloid-beta
- Zoledronic acid (osteotropic compound)
- Hesperetin conjugates (flavonoid)
- Kaempferol (flavonoid)

Tableau 5 : Substrats d'ABCG2

d'après Mo *et al.*(*Mo and Zhang 2012*)

V.3. La fonctionnalité SP : un marqueur des cellules souches hématopoïétiques ?

V.3.1. Fonction SP et CSPH murins

V.3.1.1. Les cellules SP: un compartiment cellulaire enrichi en CSH ?

Les travaux initiaux de Goodell *et al.* ont permis de montrer que les PH murins exprimant la fonctionnalité SP étaient fortement enrichis en PH Lin^- $Sca\text{-}1^+$, avaient une capacité de greffe augmentée, reconstituaient les lignées myéloïdes et lymphoïdes et correspondaient majoritairement à des LT-CSH (*Goodell et al. 1996*).

Sur le plan phénotypique, les CSPH exprimant la fonctionnalité SP sont essentiellement Lin^-, Kit^+, $Sca\text{-}1^+$, $CD34^{-/faible}$, $Thy\text{-}1^+$ (*Goodell et al. 1997*). Les PH/CSH SP^{KLS} sont également $Flt3^-$(*Camargo et al. 2006*), $CD48^-$ (*Weksberg et al. 2008*), $CD135^-$ (*Pearce et al. 2004*), $CD201^+$ (*Challen et al. 2009*).

Ces données phénotypiques associées à des études de repopulation à long terme *in vivo* (*Goodell et al. 1996; Goodell et al. 1997; Matsuzaki et al. 2004; Pearce et al. 2004; Robinson et al. 2005; Camargo et al. 2006; Challen et al. 2010*) témoignent du caractère primitif des cellules SP. Bien que certains groupes décrivent des résultats contradictoires (*Morita et al. 2006*), la fonctionnalité SP apparaît donc comme un des marqueurs les plus puissants pour sélectionner les CSH médullaires murines. Au sein de la fraction SP, peuvent être identifiées des sous-populations en fonction de leur capacité à exclure le Hoechst 33342. Les populations qui excluent le plus fortement le Hoechst 33342 (SP^{bas}) ont une plus grande capacité de greffe et de reconstitution à long terme que celles qui l'effluent moins (SP^{haut}) (*Goodell et al. 1997; Matsuzaki et al. 2004; Robinson et al. 2005; Camargo et al. 2006*) traduisant un gradient de capacité « souche » selon la capacité d'exclusion (figure 13).

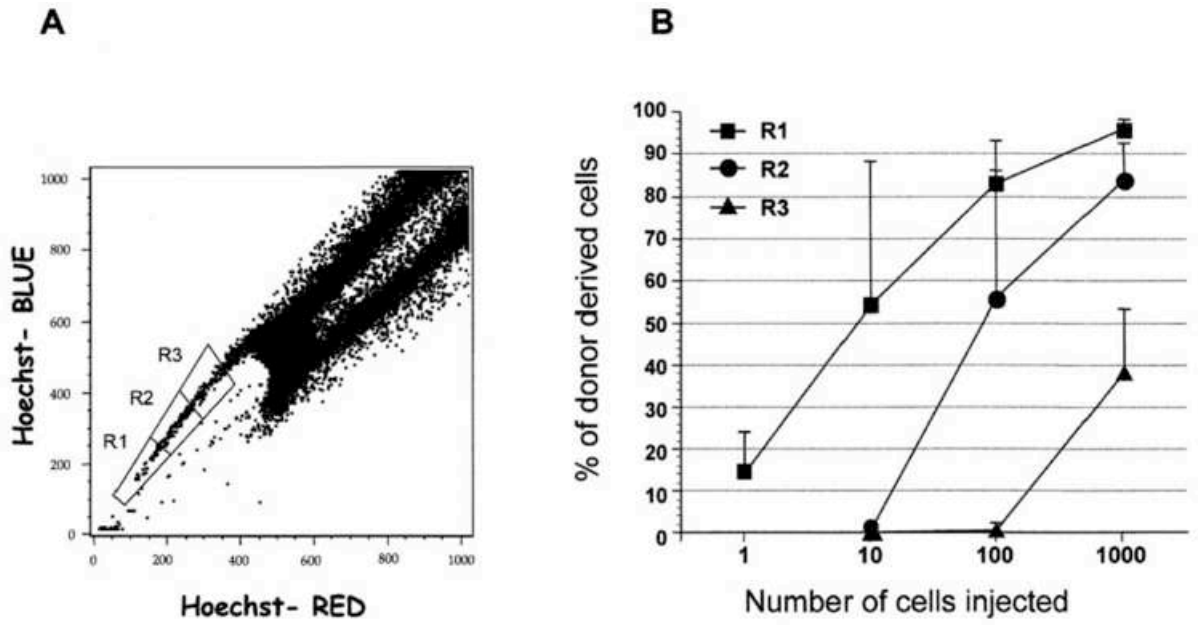


Figure 13 : La capacité « souche » des cellules SP est corrélée au gradient d'exclusion du Hoechst 3342

A : *Les cellules SP médullaires sont divisées en 3 fractions (R1, R2, R3) en fonction de leur capacité à exclure le Hoechst 33342.*

B : *Evaluation de la capacité de greffe des cellules SP : des tests de CRU ont été réalisés avec des dilutions progressives des 3 fractions de cellules SP. Evaluation du pourcentage de chimérisme dans le sang des souris à 12 semaines après greffe.*
D'après Matsuzaki *et al.*(*Matsuzaki et al. 2004*)

V.3.1.2. La capacité d'efflux du Hoechst 33342 ; un moyen permettant de distinguer les CSH « myéloïdes » des CSH « lymphoïdes » ?

Bien que la CSH reste définie par sa capacité d'auto-renouvellement et son potentiel de différenciation multilignée, des travaux récents ont montré que des CSH pouvaient avoir des prédispositions de différenciation vers l'une ou l'autre des lignées lymphoïde ou myéloïde (*Dykstra et al. 2007; Papathanasiou et al. 2009; Challen et al. 2010; Morita et al. 2010*).
L'antigène CD150 a été utilisé pour distinguer ces sous-populations de CSH : les CSH $CD150^{+}$ ont une prédisposition myéloïde alors que leur contrepartie $CD150^{-}$ a une prédisposition lymphoïde (*Morita et al. 2010*). La fonctionnalité SP a également été utilisée dans ce but, les cellules SP^{bas} ayant une prédisposition myéloïde à l'opposé des cellules SP^{haut} qui ont une prédisposition lymphoïde (*Challen et al. 2010*). La moitié des cellules SP exprimant le CD150 (*Weksberg et al. 2008; Challen et al. 2010*), la combinaison des deux techniques permet, en fonction du gradient d'exclusion du Hoechst 33342, de mieux définir les sous population de CSH à prédisposition lymphoïde ou myéloïde (Figure 14). Les CSH à prédisposition myéloïde ont toutefois une plus grande capacité de greffe et de différenciation multilignée que celles à prédisposition lymphoïde, traduisant une probable plus grande immaturité (*Challen et al. 2010*).

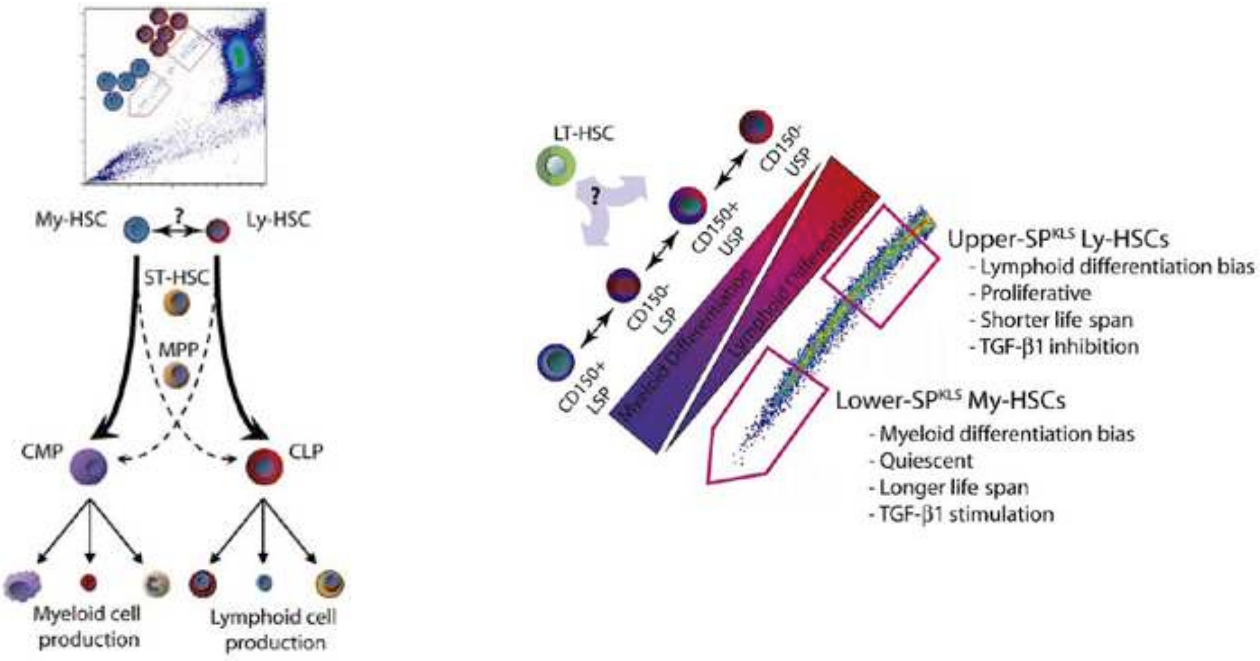


Figure 14 : Le gradient d'exclusion du Hoechst 33342 combiné au marqueur CD150 permet de distinguer des sous types de CSH

Les CSH SP^{bas} sont plus quiescentes, ont une prédisposition myéloïde, prolifèrent en présence de faibles doses de TGF-β1, caractéristiques d'autant plus marquées qu'elles sont CD150^{+}.
Les CSH SP^{haut} sont moins quiescentes, ont une prédisposition lymphoïde et sont inhibées par de faibles doses de TGF-β1, caractéristiques d'autant plus marquées qu'elles sont CD150^{-}.
Ce modèle est en faveur de la théorie de diversité clonale des CSH.
D'après Challen *et al.*(*Challen et al. 2010*).

V.3.1.3. Régulation de la quiescence et du phénotype SP

Peu de données existent sur les mécanismes qui régissent l'acquisition/perte du phénotype SP par les CSPH (figure 15).

Les travaux d'Arai *et al.* ont fait apparaître le rôle du couple Tie2/Ang1 (*Arai et al. 2004*). Dans leur modèle, les CSH qui expriment Tie2 sont quiescentes, adhèrent fortement à la niche endostéale et sont pour la plupart des cellules SP. Le phénotype SP de ces CSH est associé à leur quiescence provoquée par l'activation de Tie2 par Ang1 au niveau de l'endoste. Cette activation favorise l'adhésion aux ostéoblastes de la niche par l'induction d'une hyperexpression des intégrines β1 et NCAD. L'invalidation de Tie2 s'accompagne d'une perte du phénotype SP. A la différence de leur contrepartie MP-Tie2$^-$, les cellules SP-Tie2$^+$ sont protégées des stress cytotoxiques (5-FU), et participent par leur mobilisation et leur mise en cycle à la reconstitution hématopoïétique secondaire. Cette mobilisation s'accompagne d'une perte du phénotype SP.

La même équipe, sur des modèles expérimentaux proches, a également mis en évidence le rôle du couple Tpo/Mpl dans la régulation de la quiescence et de l'acquisition du phénotype SP des CSH au niveau de la niche endostéale (*Yoshihara et al. 2007*). Ils ont montré que les CSH Mpl$^+$ adhèrent à la niche endostéale, sont quiescentes et expriment un phénotype SP. La signalisation par Tpo/Mpl permet l'acquisition du phénotype SP en sur-exprimant les intégrines β1 et Tie2 et en activant ainsi leur adhésion et leur quiescence. L'inhibition de cette signalisation par des anticorps anti-Mpl s'accompagne d'une perte du phénotype SP et d'une mobilisation des CSH. Une autre équipe, sur un modèle murin Mpl$^{-/-}$ a confirmé le lien entre la signalisation Tpo/Mpl et l'acquisition du phénotype SP par les CSPH médullaires (*Qian et al. 2007*).

La famille des protéines roundabout (Robo) correspond à des récepteurs de type immunoglobuline exprimés préférentiellement dans le système nerveux, dont les ligands font partie de la famille slit composée de 3 membres (slit 1-3) (*Wong et al. 2002*). Robo4 est un membre de cette famille exprimé dans le système hématopoïétique, de façon plus importante dans les LT-CSH que dans les ST-CSH (*Forsberg et al. 2005*). Shibata *et al.* ont montré que Robo4 est exprimé dans les CSH et les PH immatures et que son ligand, Slit2, est exprimé

spécifiquement dans les cellules stromales médullaires et les ostéoblastes après un stress myélosuppresseur (5-FU). Ils ont ensuite montré que l'augmentation de signal Slit2-Robo4 s'accompagne d'une transition des CSH du compartiment SP vers MP (*Shibata et al. 2009*). Cette voie de signalisation pourrait donc être impliquée dans la régulation du compartiment SP au niveau des niches hématopoïétiques médullaires.

L'intégrine β3 (CD61) est potentiellement impliquée dans l'acquisition du phénotype SP au sein des niches. Cette intégrine, associée à α5, est fortement exprimée dans les cellules SP médullaires et son niveau d'expression est corrélé à l'intensité d'exclusion du Hoechst 33342. Les cellules SP Lin^- $\beta3^+$ sont quiescentes et ont une capacité de repopulation à long terme équivalente aux cellules SP^{KLS} (*Umemoto et al. 2006*). Ces éléments font évoquer le rôle d'αvβ3 dans la régulation de la quiescence et du phénotype SP des CSH au niveau des niches hématopoïétiques, d'autant plus que cet hétérodimère a été récemment impliqué dans la régulation de la signalisation Tpo/Mpl au niveau des CSH (*Umemoto et al. 2012*).

NCAD est également impliqué dans le maintien du phénotype SP des CSH au niveau de la niche endostéale. Hosokawa *et al.* ont montré que la perte de l'expression de la NCAD à la surface des CSH s'accompagnait d'une perte du phénotype SP et de leur entrée en cycle (*Hosokawa et al. 2007*).

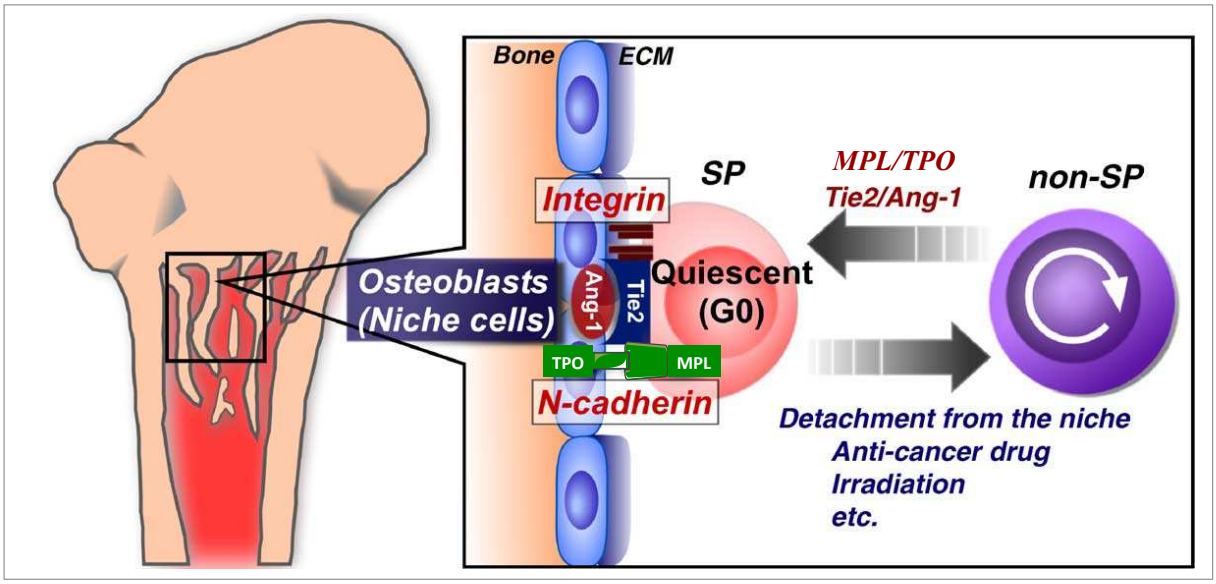


Figure 15 : Régulation de la quiescence et du phénotype SP au contact de la niche endostéale

Les CSH Tie2^{+} sont spécifiquement localisées dans la niche hématopoïétique et adhèrent aux ostéoblastes Ang1^{+} dans la moelle osseuse adulte. L'Ang-1 produite par les ostéoblastes active Tie2 sur les CSH et promeut une adhésion forte des CSH à la niche, à l'origine de leur quiescence. Le couple TPO/MPL jouerait un rôle semblable en favorisant la sur-expression de Tie2 par les CSH et leur quiescence. L'adhésion, dans ce modèle, est associée à une sur-expression des intégrines β1.
D'après Arai *et al.*(*Arai et al. 2005*)

V.3.1.4. ABCG2 et CSPH murins

Nous avons vu que Zhou *et al.*, à partir d'un modèle murin Mdr1a/1b$^{-/-}$ ont montré qu'ABCG2 était le déterminant principal du phénotype SP (*Zhou et al. 2001*). Ils ont confirmé ces résultats à partir d'un modèle murin ABCG2$^{-/-}$ en montrant que la moelle osseuse de ces souris était quasi dépourvue de cellules SP, que le peu de cellules SP retrouvées étaient Lin^{+} Kit^{-} Sca-1^{-}, n'avaient pas d'activité de greffe et ne correspondaient donc pas à des CSH (*Zhou et al. 2002*). Malgré ce déficit en cellules SP, ces souris avaient un nombre « normal » de cellules KLS, et leur hématopoïèse paraissait normale (*Zhou et al. 2002*). Toutefois lorsque ces souris étaient traitées par la mitoxantrone, elles présentaient une toxicité hématopoïétique majeure à la différence des souris « sauvages » (*Zhou et al. 2002*). ABCG2 pourrait donc protéger les CSH vis-à-vis de stress cytotoxiques. Secondairement, Krishnamurthy *et al.* ont montré qu'ABCG2 était sur-exprimé en hypoxie, sous le contrôle d'HIF-1, et servait à protéger les CSPH en effluant l'hème et les porphyrines (*Krishnamurthy et al. 2004*). Outre HIF-1, la régulation de l'expression d'ABCG2 au sein des CSPH murins pourrait être sous le contrôle d'Akt (*Mogi et al. 2003*).

L'expression d'ABCG2 n'est toutefois pas une exclusivité des CSH, Yamamoto *et al.* ont en effet montré que ce gène est fortement exprimé dans les érythroblastes, bien que ceux-ci ne présentent pas de fonctionnalité SP (*Yamamoto et al. 2007*).

V.3.2. Cellules SP dans les différents compartiments hématopoïétiques humains

Forts de leur expérience sur les modèles murins, Goodell et *al.* ont été les premiers à évaluer la fonctionnalité SP des CSPH humains (*Goodell et al. 1997*). Ils ont montré que les CSPH SP représentaient environ 0,05% des cellules médullaires et 0,1% des cellules de sang placentaire. Les PH SP médullaires étaient négatifs pour les marqueurs de différenciation de lignée, traduisant leur immaturité, mais également négatifs ou très faiblement positifs pour le CD34. Ils ont étudié parallèlement les PH SP médullaires de macaque Rhésus et ont montré que leurs PH SP médullaires, également $CD34^-$ Lin^-, avaient une capacité de différenciation multi-lignée et une activité LTC-IC 9 fois supérieure aux PH $CD34^+CD38^-$ et 900 fois supérieure à celle de PH de moelle brute. De plus, en culture sur stroma, ces PH SP $CD34^-$ étaient à l'origine de PH $CD34^+$. Ils en ont déduit que, chez le macaque Rhésus, les PH SP correspondaient à une population souche « antérieure » à la population $CD34^+$. Ils ont subodoré une hypothèse similaire chez l'homme sans toutefois pouvoir la démontrer (*Goodell et al. 1997*).

V.3.2.1. Fonctionnalité SP et CSPH de foie fœtal

Uchida *et al.* ont étudié les PH SP de foie fœtal au deuxième trimestre de grossesse (*Uchida et al. 2001*). Après déplétion Lin^-, la fonctionnalité SP permet un enrichissement majeur en PH $CD34^+$ et $CD34^+$ $CD38^-$. De plus, la fraction SP contient tous les PH $CD34^+$ $CD38^-$ doués d'activité LT-SRC et capables de soutenir des greffes sériées. L'utilisation de la fonctionnalité SP permet donc d'enrichir en CSH la population $CD34^+CD38^-$. Par contre, aucune capacité de greffe n'est présente dans la population $CD34^-$ $CD38^-$, qu'elle soit ou non sélectionnée par sa fonctionnalité SP. Curieusement, ces données *in vivo* sont discordantes des données *in vitro* puis que les auteurs ne retrouvent pas de différence en activité LTC-IC entre les fractions SP^+ et SP^- au sein de la population $CD34^+$ $CD38^-$. En étudiant les PH de foie fœtal triées simplement par gradient de densité, la fraction SP est très hétérogène, essentiellement $CD34^-$ (80%), composée de progéniteurs/précurseurs érythroblastiques et lymphocytaires (*Uchida et al. 2001*).

V.3.2.2. Fonctionnalité SP et CSPH de sang placentaire

Storms *et al.* ont montré que, dans le sang placentaire non fractionné, la fonctionnalité SP permettait un enrichissement en PH $CD34^+$, ces derniers représentant environ 1,8% des cellules totales et 12% de la fraction SP. Ainsi, 88% des cellules SP étaient $CD34^-$, et ces cellules SP $CD34^-$ correspondaient essentiellement à des lymphocytes T/NK matures. Sur le plan fonctionnel, en réalisant des LTC-IC, ils ont trouvé que les PH $CD34^+$ SP^+ étaient enrichis en PH clonogéniques par rapport aux PH $CD34^+$, mais que les PH $CD34^-$ SP^+ n'avaient quasiment pas de potentiel clonogénique. Pour limiter l'effet de la contamination de la population SP par les cellules matures, ils ont évalué la fonctionnalité des PH de sang placentaire après déplétion Lin^-. Les PH Lin^- SP^+ contiennent des proportions à peu prés équivalentes de cellules $CD34^+$ et $CD34^-$ et l'activité LTC-IC n'est retrouvée que dans la fraction $CD34^+$. De plus l'activité LTC-IC des PH Lin^- $CD34^+$ SP^+ n'est pas supérieure à celles des PH Lin^- totaux. En étudiant la fraction Lin^- $CD34^-$ SP^+, ils ont pu montrer qu'elle contenait des progéniteurs lymphoïdes NK (*Storms et al. 2000*).

Pearce *et al.* ont décrit des résultats assez similaires : la fraction SP est enrichie en PH $CD34^+$ et $CD34^+CD38^-$ mais ces sous-populations sont minoritaires par rapport aux cellules $CD34^-$ qui correspondent pour la plupart à des cellules différenciées. Alors que l'activité ALDH le permettait, la fonctionnalité SP ne leur a pas permis de détecter de cellules pouvant correspondre à des CSH au sein de la population Lin^- $CD34^-$ (*Pearce and Bonnet 2007*).
Les seules données *in vivo* proviennent de Eaker *et al*. qui ont décrit une activité LT-SRC de la fraction SP $CD34^+$, sans plus de précisions (*Eaker et al. 2004*).

V.3.2.3. Fonctionnalité SP et CSPH médullaires

Feuring-Buske *et al.*, en étudiant la fraction SP au sein des PH médullaires de patients atteints de leucémie aiguë myéloblastique ont constaté que, le plus souvent, la fraction SP^+ $CD34^+CD38^-$ n'était pas incluse dans le clone tumoral et correspondait à des CSPH capables d'activité LTC-IC et LT-SRC « normales ». Inversement, les fractions SP^+ $CD34^-$ et SP^- $CD34^+CD38^-$ comprenaient essentiellement des cellules tumorales et ne présentaient pas d'activités LTC-IC et LT-SRC « normales » (*Feuring-Buske and Hogge 2001*). Ces données, bien que provenant de patients porteurs d'hémopathie maligne, suggèrent que la capacité d'efflux du Höechst 33342 permet d'enrichir en CSH le compartiment $CD34^+$ $CD38^-$ mais, à la différence des modèles murins/macaques Rhésus, ne permet pas de détecter de CSH en dehors de ce compartiment.

Notre équipe a également montré que l'utilisation de la fonctionnalité SP combinée à la fonctionnalité ALDH permettait d'enrichir en LT-SRC et PH immatures des populations médullaires déjà hautement purifiées (Lin^- $CD34^+$ $CD38^-$ $ALDH^{fort}$) (*Pierre-Louis et al. 2009*).

Récemment, Josefsen *et al.* ont montré que, si au sein des cellules mononucléées médullaires la fraction SP correspond surtout à des cellules différenciées $CD3^+$, les PH $CD34^+$ SP^+ avaient une plus grande activité LTC-IC que leur contrepartie SP^- (*Josefsen et al. 2011*).

V.3.2.4. Fonctionnalité SP et CSPH de sang mobilisé

Des cellules SP peuvent être identifiées dans le sang mobilisé de patients traités pour hémopathies malignes ou de donneurs de CSH allogéniques (*Naylor et al. 2005; Fischer et al. 2006; Josefsen et al. 2011*). En l'absence d'enrichissement préalable en PH immatures, l'essentiel des cellules SP est constitué de cellules différenciées $CD3^+$ (*Naylor et al. 2005; Josefsen et al. 2011*). Toutefois, au sein des cellules $CD34^+$, la fraction SP permet d'identifier les PH doués d'une forte activité LTC-IC (*Josefsen et al. 2011*). Les données *in vivo* sont discordantes car les ST-SRC ne sont pas retrouvées dans la fraction SP (*Fischer et al. 2006*) et la prise de greffe à court et moyen terme ne parait pas corrélée au nombre de PH avec fonctionnalité SP injectés (*Josefsen et al. 2011*).

V.3.2.5. Fonctionnalité SP et sang périphérique

Les données sur les cellules SP du sang périphérique sont discordantes. Preffer *et al.* ont les premiers décrit l'existence de cellules SP dans ce compartiment (*Preffer et al. 2002*). Dans les cellules du sang périphérique purifié par gradient de densité puis déplétion lin^-, ils ont montré l'existence d'une fraction SP $CD34^-$, exprimant des molécules d'adhérence, quiescente, dénuée d'activité LTC-IC ou CAFC significatives, et incapable de greffer chez la souris NOD-SCID. En milieu approprié, ces cellules pouvaient se différencier en lymphocytes T, NK et cellules dendritiques. Naylor *et al.* et d'autres groupes, ont également décrit, à partir de sang purifié par gradient de densité, une population SP correspondant majoritairement à des cellules différenciées dont des lymphocytes T (*Naylor et al. 2005; Wardyn et al. 2008; Brusnahan et al. 2010*). La fraction SP circulante augmenterait après exercice (*Wardyn et al. 2008*) et diminuerait avec l'âge (*Brusnahan et al. 2010*).

V.3.2.6. Fonctionnalité SP et hématopoïèse humaine ; synthèse

Chez l'homme, à la différence de la souris, la valeur de cette technique pour sélectionner les CSPH est encore sujette à débat. En effet, les cellules exprimant la fonctionnalité SP contiennent également des cellules différenciées : lymphocytes T, NK, érythroblastes. L'analyse de la fonctionnalité SP dans le cadre de l'évaluation de la « fonction souche » nécessite donc un enrichissement préalable en PH immatures, soit par déplétion lin^-, soit par purification CD34. Il faut ici noter la discordance entre la publication initiale de Goodell *et al.* qui ne retrouvait pas de marqueurs de lignée dans les PH SP médullaires (*Goodell et al. 1997*) et les travaux plus récents que nous avons décrit (*Storms et al. 2000; Uchida et al. 2001; Naylor et al. 2005; Pearce and Bonnet 2007; Josefsen et al. 2011*). Sur des populations enrichies en PH immatures ($CD34^+$, $CD34^+$ $CD38^-$), l'étude de la fonctionnalité SP permet de sélectionner des cellules à haut potentiel clonogénique à long terme (*Goodell et al. 1997; Storms et al. 2000; Feuring-Buske and Hogge 2001; Josefsen et al. 2011*) et avec une forte capacité de greffe (*Goodell et al. 1997; Feuring-Buske and Hogge 2001; Uchida et al. 2001*). Ces PH immatures exprimant la fonctionnalité SP avec capacité LTC-IC et LT-SRC ont à ce jour été décrits dans le foie fœtal, le sang placentaire et la moelle osseuse. Ils n'ont pas été retrouvés dans le sang périphérique, et seule la capacité LTC-IC a été décrite pour les CSPH du sang mobilisé.

La fonctionnalité SP est donc utile à l'étude des CSPH chez l'homme, mais ne permet pas de s'affranchir des techniques immunologiques de présélection des PH les plus immatures. De plus, à la différence de ce qu'a montré l'équipe d'Arai chez la souris, nous ne disposons pas chez l'homme d'éléments sur la régulation par les niches hématopoïétiques de ce phénotype dans les CSPH.

V.3.2.7. ABCG2 et fonctionnalité SP des CSPH humains

L'expression forcée d'ABCG2 humain s'accompagne de l'acquisition de la fonctionnalité SP par les PH (*Ahmed et al. 2008*) ou les cellules d'autres tissus (*Scharenberg et al. 2002*). Scharenberg *et al* ont montré que l'expression physiologique d'ABCG2 est importante dans les CSPH immatures (SP, $CD34^+$ $CD38^-$ ou $CD34^+$ KDR^+), disparaît dans les PH engagés ($CD34^+$ $CD33^+$, $CD34^+$ $CD10^+$, $CD34^+$ $CD38^+$) et réapparait de façon significative dans les cellules NK et les érythroblastes (*Scharenberg et al. 2002*). Ils ont également confirmé que, dans les CSPH SP^+ médullaires, ABCG2 était l'ABC transporteur principal déterminant cette fonctionnalité (*Scharenberg et al. 2002*). Naylor *et al.*, à partir de sang mobilisé, a également montré que l'expression d'ABCG2 était corrélée au phénotype SP des cellules lin^-, à la différence des cellules Lin^+ dont la fraction SP pourrait être dépendante d'un autre transporteur (*Naylor et al. 2005*). Des résultats discordants ont été retrouvés par Alt*et al.* à partir du sang placentaire : en étudiant l'expression d'ABCG2 en cytométrie de flux et en RT-PCR, ils n'ont pas trouvé de corrélation entre l'expression d'ABCG2 et la fonctionnalité SP (*Alt et al. 2009*).

Sur un plan fonctionnel, le rôle d'ABCG2 dans l'hématopoïèse humaine a été exploré par Ahmed *et al.*. Ils ont montré que la transfection d'ABCG2 dans des CSPH de sang placentaire s'accompagnait *in vitro* d'une plus grande capacité CFC sans augmentation de la capacité LTC-IC, d'une inhibition de la différenciation lymphoïde B, et *in vivo* d'une augmentation des PH $CD34^+$, d'une plus grande capacité CRU, d'une inversion de la balance de différenciation lymphoïde/myéloïde en faveur de la lignée myéloïde (*Ahmed et al. 2008*). L'ensemble de ces données traduit une implication d'ABCG2 dans l'hématopoïèse précoce.

V.3.3. Fonction SP et hémopathies malignes

Des cellules SP ont été également décrites dans de nombreux cancers, particulièrement dans des gliomes, médulloblastomes, hépatocarcinomes, cancers du sein, de la thyroide, de la prostate, des ovaires (*Wu and Alman 2008*). Dans la plupart de ces tumeurs, les cellules SP sont plus chimio-résistantes, plus clonogéniques et tumorogéniques que le reste du contingent cellulaire tumoral, et semblent contenir les cellules souches cancéreuses (*Moserle et al. 2010*). L'étude la fonctionnalité SP pourrait donc être d'intérêt dans les hémopathies pour identifier/cibler les cellules souches tumorales.

V.3.3.1. Leucémies aiguës myéloblastiques

Les travaux de Lapidot *et al.* (*Lapidot et al. 1994*) puis de Bonnet *et al.*(*Bonnet and Dick 1997*) ont été à l'origine du concept de cellule souche leucémique (CSL) dans les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM). Ils ont montré qu'une sous-population de blastes était capable de reproduire la pathologie humaine dans des modèles de greffes de souris NOD/SCID. Ces blastes avaient un phénotype $CD34^+CD38^-$, semblable à celui des CSH, et la greffe de blastes triés Lin^- $CD34^+$ $CD38^-$ était capable de reproduire l'ensemble du phénotype tumoral dans les modèles murins. Le concept SL-IC (SCID leukemia-initiating cell) est né de ces travaux et est en faveur de l'existence d'une hiérarchie au sein des cellules de LAM semblable à celle de l'hématopoïèse. La CSL, quiescente et chimio-résistante, constitue le socle de la maladie résiduelle et est à l'origine des rechutes de LAM. Son identification et son « ciblage » thérapeutique sont donc des objectifs majeurs pour améliorer la prise en charge des patients. Plusieurs études ont donc évalué des marqueurs de cytométrie permettant de différencier CSL et CSH au sein des populations $CD34^+CD38^-$. Ces travaux, comme les travaux originaux, se sont basés sur la capacité de sous-populations définies de blastes à avoir une activité SL-IC. Les principaux marqueurs ainsi proposés ont été le récepteur de l'IL-3 (CD123) (*Jordan et al. 2000*), le CD96 (*Hosen et al. 2007*), le CLL-1 (*C-type lectin-like molecule-1*) (*van Rhenen et al. 2007*), le CD44 (*Jin et al. 2006*) et le CD47 (*Majeti et al. 2009*). Des travaux récents du groupe de Bonnet. ont mis à mal ces modèles définissant les CSL comme appartenant à la population $CD34^+CD38^-$ (*Taussig et al. 2010*). A partir d'échantillons de LAM avec mutation du gène de la nucléophosmine (caractérisées par leur phénotype essentiellement $CD34^-$), ils ont pu montrer que l'activité CSL, avec une variabilité

inter et intra échantillon, pouvait être retrouvée dans les quatre fractions définies par le CD34 et le CD38, particulièrement la fraction $CD34^-$. Ces résultats ont depuis été confirmés par d'autres groupes, confirmant l'hétérogénéité phénotypique des CSL de LAM (*Eppert et al. 2011; Sarry et al. 2011*). Cette différence par rapport aux anciens modèles est au moins en partie liée à l'utilisation de modèles murins plus immunodéprimés que les NOD/SCID, et donc plus adaptés aux expériences de xénogreffes (*Pearce et al. 2006; Taussig et al. 2008*).

Le phénotype de surface n'étant qu'imparfaitement efficace pour isoler les CSL, la fonctionnalité SP, théoriquement associée à la quiescence et à la résistance aux cytotoxiques, le permet-elle ? Quatre études ont évalué ce concept.

L'équipe de Goodell a la première étudié la fonctionnalité SP de CSPH de patients atteints de LAM (*Wulf et al. 2001*) : Wulf *et al.* ont montré qu'une population SP était retrouvée dans la moelle de 80% des patients étudiés, que cette population SP était majoritairement $CD34^{-/faible}$, appartenait au clone tumoral et effluait la daunorubicine et la mitoxantrone. Dans leurs expériences, 3 des 28 souris NOD/SCID greffées avec ces cellules SP ont développé une LAM, alors que la moitié des souris restantes ont développé une « maladie résiduelle » détectable en cytométrie ou en PCR. Ces éléments de xénogreffe suggèrent que la fonctionnalité SP pourrait être un outil de dépistage des CSL, mais sont à tempérer par le fait que la fraction MP était également capable de produire des résultats proches en greffant plus de cellules.

Feuring-Buske *et al.* ont étudié la fonctionnalité SP, en la couplant à un double marquage CD34 CD38, dans le sang et la moelle de 16 patients atteints de LAM. Ils n'ont pas décrit d'activité CSL au sein de la population SP. Si des cellules tumorales étaient retrouvées dans la fraction SP^+ $CD34^-$, seule la fraction SP^- $CD34^+$ $CD38^-$ contenait des SL-IC (*Feuring-Buske and Hogge 2001*).

Moshaver *et al.* ont proposé l'association de la fonctionnalité SP à des marqueurs aberrants de lignée (CD19, CD7, CD56) et CLL-1 pour détecter les CSL au sein d'échantillons de sang et de moelle de 48 patients atteints de LAM. Ils n'ont toutefois pas validé leur hypothèse par des tests *in vivo* (*Moshaver et al. 2008*).

Roshal *et al.* ont montré que la plupart des blastes médullaires de 22 patients exprimaient la fonctionnalité SP (1,48% de cellules SP en moyenne), que cette fraction SP contenait les anomalies cytogénétiques caractéristiques de la leucémie et qu'elle était capable de greffer des souris immunodéprimées. Cependant l'importance de la fraction SP au diagnostic, à la différence de l'importance de la population blastique $CD34^+CD38^{-/faible}$, n'était pas corrélée au pronostic des patients (*Roshal et al. 2013*).

Les données de ces quatre études ne permettent actuellement pas de définir précisément l'intérêt de la fonctionnalité SP pour cibler la population de CSL dans les LAM.

V.3.3.2. Myélome multiple

Dans cette pathologie, plusieurs travaux sont en faveur de l'existence d'une cellule souche myélomateuse appartenant à une population de cellules B clonales post germinatives $CD138^-$, clonogéniques, capables de reproduire des myélomes *in vitro* et *in vivo* (*Matsui et al. 2004; Kukreja et al. 2006*). Plusieurs études ont permis d'identifier des cellules avec fonctionnalité SP au sein de lignées de cellules myélomateuses ou d'échantillons de prélèvements de patients (*Loh et al. 2008; Matsui et al. 2008; Jakubikova et al. 2011*). Ces cellules SP sont plus clonogéniques, plus résistantes aux traitements et sont capables de reproduire un myélome dans des modèles murins de xénogreffe (*Matsui et al. 2008; Jakubikova et al. 2011*). Matsui *et al.* ont caractérisé les cellules souches myélomateuses clonales comme étant $CD19^+CD27^+CD138^-$ et ont montré que la fonctionnalité SP permettait de sélectionner ces cellules dans le sang des patients (*Matsui et al. 2008*).

Il semble donc que dans cette pathologie la fonctionnalité SP soit une bonne méthode pour identifier les cellules souches cancéreuses. Il existe toutefois des discordances sur le phénotype des cellules SP dans le myélome, essentiellement $CD138^{-/faible}$ pour certains (*Loh et al. 2008; Matsui et al. 2008*), partagées entre $CD138^+$ et $CD138^-$ pour d'autres (*Jakubikova et al. 2011*).

V.3.3.3. Lymphomes

Le lymphome folliculaire représente 25% des lymphomes non hodgkiniens et est caractérisé par une chimio-sensibilité initiale et des rechutes systématiques, pouvant être tardives. Il peut donc correspondre à un modèle tumoral dans lequel une cellule souche cancéreuse persiste pendant un délai de rémission plus ou moins long avant d'être à l'origine de rechutes. Récemment, Lee *et al.* ont montré qu'il existait une fraction de cellules SP au sein de lignées de lymphome folliculaire et de cellules d'un patient, que cette fraction augmentait après chimiothérapie, était plus quiescente, plus clonogénique que les autres cellules tumorales et qu'elle était capable de reconstituer des tumeurs dans des modèles de xénogreffes murines (*Lee et al. 2012*). Il est intéressant de noter que la réussite de ces greffes

nécessitait la co-injection de cellules folliculaires dendritiques qui semblent promouvoir la survie de ces cellules par l'intermédiaire du couple CXCR4/CXCL12, illustrant le concept de niche tumorale.

Dans le lymphome de Hodgkin, sur des lignées cellulaires, il a été montré qu'il existe une fraction de cellules SP, cytologiquement monomorphes, mononucléées, de petite taille, $CD30^+$, résistantes à la doxorubicine, capable de donner en culture des cellules MP de grande taille, mono ou multinucléées, correspondant à des cellules de Hodgkin ou de Reed-Sternberg (*Nakashima et al. 2010*). L'existence de cellules SP $CD30^+$, résistantes à la gemcitabine a également été montrée sur des échantillons de biopsies de patients (*Shafer et al. 2010*). Ces données sont toutefois insuffisantes pour juger de la capacité de la fonctionnalité SP à identifier des cellules souches cancéreuses dans cette hémopathie.

Dans un modèle de lymphome du manteau murin, Vega *et al.* ont décrit l'existence d'une fraction SP assez importante (3,5% en moyenne) exprimant plus les gènes anti-apoptotiques et d'auto-renouvellement, étant plus clonogénique et ayant une plus grande capacité de reconstitution de la tumeur lors de greffes (*Vega et al. 2010*). Nous n'avons pas de données chez l'homme concernant la fraction SP dans cette hémopathie.

Enfin, une population SP chimio-résistante existe dans la leucémie lymphoïde chronique, mais nous n'avons pas plus de données sur le plan fonctionnel (*Foster et al. 2010; Gross et al. 2010*).

VI. MICRO-ENVIRONNEMENT MEDULLAIRE ET HEMOPATHIES MALIGNES

La régulation de l'hématopoïèse, comme nous l'avons vu, est très influencée par l'interaction des CSPH avec le micro-environnement médullaire. De plus en plus de travaux montrent que les hémopathies malignes dont le développement est intra-médullaire, particulièrement les leucémies aiguës, sont influencées par le micro-environnement médullaire. Ce micro-environnement peut ainsi promouvoir ou influencer la leucémogénèse, mais également favoriser la survie des cellules tumorales et les protéger des effets des chimiothérapies.

VI.1. Le micro-environnement peut promouvoir / influencer la leucémogénèse

Le rôle du micro-environnement dans le développement des leucémies a été suspecté très tôt, dès la constatation de leucémies aigües post-allogreffe de moelle, développées à partir des cellules du donneur (*Fialkow et al. 1971*). Ces leucémies, difficilement caractérisables dans les années 1980-1990, sont depuis mieux diagnostiquées avec les progrès des techniques d'étude du chimérisme hématopoïétique. Elles compliquent environ 0,1 à 5% des allogreffes et sont caractérisées par certaines anomalies cytogénétiques récurrentes (*Flynn and Kaufman 2007; Wiseman 2011*). La survenue de ces hémopathies peut bien sur être secondaire à l'existence de lésions génétiques pro-oncogènes des cellules du donneur préexistantes à la greffe, et/ou être favorisée par l'immunosuppression post greffe. Cependant, le fait que les donneurs ne développent pas de leucémie et qu'il semble exister des anomalies cytogénétiques récurrentes dans ces leucémies est plutôt en faveur d'un rôle de « l'environnement » du receveur.

Plusieurs travaux expérimentaux récents réalisés chez la souris confirment l'hypothèse d'un rôle actif du stroma médullaire dans le développement d'hémopathies malignes. Walkley *et al.* ont utilisé un modèle de souris invalidées pour le récepteur γ de l'acide rétinoïque (RARγ). Ces souris RARγ$^{-/-}$ développent un syndrome myéloprolifératif. La greffe

des CSPH de ces souris à des souris sauvages ne reconstitue pas l'hémopathie, alors que lorsque des CSPH sauvages sont greffées aux souris RARγ$^{-/-}$ un syndrome myéloprolifératif apparaît. Ces données montrent donc qu'un micro-environnement RARγ$^{-/-}$ est capable de promouvoir une hémopathie, indépendamment d'anomalies des CSPH (*Walkley et al. 2007*). Il en est de même pour un environnement invalidé pour le gène du rétinoblastome (Rb) (*Walkley et al. 2007*). Raaijmakers *et al.* ont montré chez la souris, que l'invalidation spécifique de Dicer1 au sein des progéniteurs ostéoblastiques était à l'origine d'une perturbation sévère de l'hématopoïèse, conduisant à une myélodysplasie pouvant évoluer vers une leucémie aiguë. Lorsque les CSPH « myélodysplasiques » des souris mutantes étaient greffés dans des souris sauvages, ils restauraient un phénotype normal. A l'inverse, la greffe de CSPH « normaux » dans les souris mutantes conduisait à une myélodysplasie (*Raaijmakers et al. 2010*). Les résultats de cette étude sont donc également en faveur d'un rôle majeur des éléments du micro-environnement médullaire dans la genèse d'hémopathies malignes. Maes *et al*. ont montré que l'induction de l'hyper-expression du VEGF au sein des progéniteurs ostéo-chondraux s'accompagnait d'une augmentation de la masse osseuse, de la vascularisation médullaire et d'une myélofibrose ; l'ensemble reproduisant le phénotype de la myélofibrose primitive (*Maes et al. 2010*). Ces trois études montrent le rôle d'un micro-environnement médullaire pathologique comme « inducteur » d'hémopathie à partir de CSPH normaux. Le micro-environnement peut également influencer le devenir d'hémopathies après l'événement oncogénétique fondateur. A ce titre, les éléments les plus marquants nous viennent des modèles murins de leucémies aiguës induites par le gène de fusion MLL-AF9 : la greffe de souris immunodéprimées par des PH CD34^{+} humains transduits avec cet oncogène peut être à l'origine de leucémies aiguës myéloblastiques, lymphoblastiques ou biphénotypiques selon la souche de souris ou l'environnement cytokinique utilisé (*Wei et al. 2008*), traduisant bien l'influence de l'environnement sur le phénotype d'une hémopathie maligne. Notons également que Les CSM médullaires de patients pris en charge pour LAM présentent des anomalies cytogénétiques propres, différentes de celles du clone leucémique et non retrouvées chez les sujets sains (*Blau et al. 2011*). Tous ces travaux confirment donc l'hypothèse « seed and soil » développée par Paget au XIX^{ème} siècle au sujet des cancers et du développement des métastases, suggérant que pour se développer, une cellule cancéreuse (« seed ») devait bénéficier d'un environnement favorable (« soil ») (*Paget 1889*). Comment le micro-environnement pathologique peut-il induire des altérations génétiques au sein des CSPH et induire une hémopathie ? plusieurs scenarii ont été proposés par Raaijmakers : (i) la dérégulation des signaux extrinsèques peut favoriser la prolifération et perturber la

différenciation des CSPH, augmentant le nombre de cellules potentiellement cibles d'un événement oncogénétique, (ii) le micro-environnement pathologique peut favoriser les évènements oncogénétiques par dérégulation des stress environnementaux qu'il est sensé réguler (niveaux de ROS, d'hypoxie…), (iii) enfin, un micro-environnement pathologique peut promouvoir l'expansion d'un clone pathologique apparu de façon stochastique et qui ne se serait pas développé dans un environnement « normal » (*Raaijmakers 2011*).

Le micro-environnement peut être primitivement pathologique et induire/influencer la leucémogénèse, comme nous l'avons vu ci-dessus, mais, les cellules leucémiques elles mêmes sont capables de modifier le micro-environnement pour privilégier leur survie et leur développement au détriment des CSPH normaux : Colmone *et al.*ont montré que les cellules leucémiques, en inhibant la sécrétion de CXCL12 des niches hématopoïétiques physiologiques, sont capable de détourner ces dernières à leur profit et de diriger les CSPH normaux vers des « niches tumorales » à l'origine d'une inhibition de l'hématopoïèse normale résiduelle (*Colmone et al. 2008*). Cette interaction bidirectionnelle entre cellules tumorales et stroma est particulièrement significative dans la myélofibrose primitive, pathologie dans laquelle CSPH et stroma sont pathologiques (*Lataillade et al. 2008; Le Bousse-Kerdiles 2012*).

VI.2. Le micro-environnement protège les cellules leucémiques

Les interactions entre stroma et cellules leucémiques peuvent protéger ces dernières des chimiothérapies par des mécanismes essentiellement liés à l'adhésion et qualifiés de « cell adhesion mediated-drug resistance » (CAM-DR). Les principaux effets de CAM-DR reposent sur une promotion de la quiescence, la survie et l'auto-renouvellement des cellules tumorales et ce phénomène est considéré comme un mécanisme clef du maintien de la maladie résiduelle et des rechutes d'hémopathies malignes (*Meads et al. 2009*). Ishikawa *et al*. ont montré, grâce à des xénogreffes de souris immunodéprimées, que les SL-IC humaines se localisaient dans la moelle au niveau de l'endoste, où elles étaient protégées de l'apoptose chimio-induite (*Ishikawa et al. 2007*). Ces SL-IC localisées au niveau de l'endoste survivaient aux chimiothérapies grâce à leur quiescence, et leur chimio-sensibilité pouvait être restaurée par une entrée en cycle induite par le G-CSF (*Saito et al. 2010*).

Dans les LAM, les principaux médiateurs de la CAM-DR sont le CXCR4, VLA-4 et le CD44. L'expression du CXCR4 par les blastes de LAM confère un pronostic défavorable (*Spoo et al. 2007*). L'axe CXCL12/CXCR4 est particulièrement important pour le développement et le maintien de LAM lors de xénogreffes de souris immunodéprimées (*Tavor et al. 2004*) et son inhibition pharmacologique sensibilise les cellules leucémiques aux chimiothérapies (*Nervi et al. 2009; Zeng et al. 2009*). Les blastes de LAM sont également capable d'influencer la sécrétion de CXCL12 des cellules stromales du micro-environnement médullaire pour détourner les niches hématopoïétiques à leur profit (*Colmone et al. 2008*). *In vitro*, l'adhésion à la fibronectine via les ß1-intégrines inhibe l'apoptose induite par la Mitoxantrone et le VP16, (*Hazlehurst et al. 2001*). Matsunaga *et al.* ont les premiers montré *in vivo* que l'interaction VLA-4/fibronectine augmentait la chimio-résistance de blastes de LAM et permettait de maintenir une maladie résiduelle à l'origine des rechutes. Cet effet était lié à un effet anti-apoptotique secondaire à une activation de la voie PI3K/AKT/Bcl-2 par VLA-4 (*Matsunaga et al. 2003*). Inversement, l'inhibition de l'adhésion VLA-4 dépendante restaure la chimio-sensibilité (*Matsunaga et al. 2003; Matsunaga et al. 2008*). Les principaux mécanismes permettant cette résistance sont liées à l'activation de voies inhibant l'apoptose (*Matsunaga et al. 2003; Hazlehurst et al. 2007*) ou promouvant la survie et l'auto-renouvellement, notamment les voies Wnt et AKT (*Konopleva et al. 2002; De Toni et al. 2006; Tabe et al. 2007*). Les travaux de Jing *et al.* ont montré que le CD44 était impliqué dans le homing des cellules leucémiques et dans le maintien de l'immaturité des cellules souches de LAM (*Jin et al. 2006*). De plus, l'activation du CD44 inhibe l'apoptose de blastes de LAM5 en induisant la protéine anti-apoptotique Mcl1 (*Sansonetti et al. 2012*).

Outre les LAM, la plupart des hémopathies malignes sont soumises à une régulation stroma-dépendante de type CAM-DR. Citons le myélome multiple (*Damiano et al. 1999; Hazlehurst et al. 2000*), particulièrement concerné par ce type de régulation, les leucémies aiguës lymphoblastiques (*Hsieh et al. 2013*), la leucémie myéloïde chronique (*Zhang et al. 2013*) et la leucémie lymphoïde chronique (*de la Fuente et al. 2003; Lutzny et al. 2013*).

BUT DU TRAVAIL

Nous avons vu que l'étude de la fonctionnalité SP chez la souris, est l'une des meilleures techniques pour sélectionner des PH lin^- à forte « capacité souche ». Dans l'hématopoïèse humaine, l'application de la fonctionnalité SP à l'étude des CSPH est plus limitée ; d'une part parce que des cellules hématopoïétiques différenciées peuvent exprimer le phénotype SP, d'autre part en raison de l'existence de l'antigène CD34 qui est un excellent marqueur des CSPH humains. Malgré ces handicaps, le phénotype SP permet de purifier les CSPH humains les plus immatures au sein de populations déjà pré-enrichies en ces derniers comme par exemple au sein de la population $CD34^+CD38^-$ (*Feuring-Buske and Hogge 2001; Uchida et al. 2001; Pierre-Louis et al. 2009*).

Le phénotype SP, caractérisé comme une capacité d'efflux de nombreux substrats, joue un rôle majeur dans la protection des cellules souches contre les toxiques, les drogues et divers xénobiotiques. Les travaux de l'équipe d'Arai ont montré que le phénotype SP des CSPH murins était fortement associé à la quiescence et à l'adhésion à la niche endostéale (*Arai et al. 2004; Yoshihara et al. 2007*). En conditions physiologiques, les cellules SP sont essentiellement retrouvées dans la moelle osseuse et sont absentes de la circulation. Ces éléments suggèrent que cette fonctionnalité peut être liée aux interactions avec le stroma médullaire. Cependant, les mécanismes régulant ce phénotype n'ont jusqu'à présent jamais été étudiés chez l'homme.

La compréhension de cette régulation serait un apport majeur, à la fois en physiologie pour appréhender au mieux les mécanismes de régulation et de protection des cellules souches au sein de leur niche et éventuellement les influencer, mais aussi en pathologie tumorale pour contrer les phénomènes de « *multidrugresistance* » et ainsi sensibiliser les cellules souches cancéreuses aux chimiothérapies.

Des expériences préliminaires de notre équipe ont mis en évidence que des PH lin^- de sang périphérique non mobilisé co-cultivés avec des cellules stromales mésenchymateuses acquéraient le phénotype SP. Devant ces résultats, le travail de thèse qui m'a été confié a été d'étudier les mécanismes de régulation du phénotype SP des PH humains par le stroma médullaire.

Plusieurs questions ont guidé mon travail de thèse :

1- Les niches hématopoïétiques ostéoblastiques/mésenchymateuses régulent-elles la fonctionnalité SP de CSPH circulants chez l'homme?
2- Les cellules hématopoïétiques circulantes capables d'exprimer une fonctionnalité SP après interactions avec le stroma contiennent-elles des CSPH ?
3- Par quels mécanismes le stroma médullaire régule-t-il la fonctionnalité SP ?
4- Existe-t-il une régulation similaire de la fonctionnalité SP au sein des blastes de patients atteints de leucémies?

MATERIELS ET METHODES

La mise en évidence de la fonctionnalité SP présente un certain nombre de difficultés techniques qui explique que son utilisation est souvent sujette à caution. Nous détaillerons ici les principaux points techniques à maîtriser afin de s'assurer de la qualité des résultats obtenus.

Le protocole définit par Goodell *et al.* pour des cellules médullaires murines reste le protocole de référence pour l'étude de la fonctionnalité SP des cellules hématopoïétiques (*Goodell et al. 1997*): les cellules d'intérêt, en suspension homogène, unicellulaire, sans agrégats, doivent être incubées à une concentration de 1.10^6 cellules /ml, 90 minutes à 37°C, à l'abri de la lumière, dans un milieu d'incubation contenant 5µg/ml de Hoechst 33342. La suspension doit être « agitée » toutes les 30 minutes pendant l'incubation. A l'issue de cette incubation, toutes les manipulations des cellules (lavages, centrifugations, marquages) doivent être réalisées à froid (pour limiter au maximum l'activité des pompes d'efflux) et à l'abri de la lumière. L'utilisation d'un contrôle en présence d'inhibiteur d'ABC transporteur (verapamil, reserpine, fumitremorgine C…) est systématique et indispensable. Pour l'étude en cytométrie de flux, un marqueur de viabilité doit être utilisé pour n'étudier que les cellules vivantes (7-AAD dans notre cas), et la position de la fenêtre SP doit être calculée en fonction des résultats fournis par le contrôle (inhibiteur d'ABC transporteur) afin de ne prendre en compte que les « vraies » cellules SP.

Bien que d'apparence assez simple, l'ensemble des étapes de ce protocole peut subir des variations qui pourraient sembler mineures mais à l'origine d'une variabilité du nombre de cellules SP obtenues lors de l'analyse finale. L'homogénéité de la suspension cellulaire, sans agrégat, est très importante pour permettre une incorporation homogène du Hoechst au sein de toutes les cellules nucléées, l'existence d'agrégats pouvant ainsi être à l'origine d'une modification du profil SP (*Montanaro et al. 2004*). La concentration cellulaire doit être parfaitement calculée et ajustée afin d'être sûr d'avoir 5µg de Hoechst pour 10^6 cellules. Ce calcul de la concentration cellulaire est un élément clef. En effet, la concentration finale de Hoechst sera différente selon que le calcul ne prend en compte que les cellules vivantes ou l'ensemble des cellules, vivantes, altérées et mortes. Les cellules altérées et mortes contiennent en effet de l'ADN et peuvent, au moins partiellement, fixer le Hoechst. Ne pas les prendre en compte pourrait aboutir à une sous concentration en Hoechst, avec pour conséquence une surestimation du nombre de cellules exprimant la fonctionnalité SP (*Montanaro et al. 2004*). Dans notre expérience, la prise en compte des cellules

mortes/altérées, voire des gros débris cellulaires est nécessaire à un marquage de qualité. De plus, la qualité de la numération cellulaire joue sur le calcul de la densité cellulaire à laquelle se fait l'incubation. Cette densité cellulaire est importante car elle influe sur l'incorporation du Hoechst, la proportion de cellules SP augmentant avec la densité cellulaire (*Mo et al. 2011*).

La durée d'incubation est également très importante, le Hoechst est en effet incorporé de façon continue pendant l'incubation, les différentes cellules entrant progressivement dans la « fenêtre MP » en fonction de la quantité de pompes d'efflux dont elles disposent. Une incubation trop courte peut donc majorer le nombre de cellules SP, alors qu'une incubation trop longue fait progressivement disparaître la population SP, probablement par « épuisement » des pompes (*Ibrahim et al. 2007*).

Il semble également que la fréquence des agitations pendant l'incubation influence l'incorporation du Hoechst, puisque augmenter cette fréquence à tous les quarts d'heures diminue fortement la proportion de cellules SP alors que l'absence d'agitation l'augmente (*Mo et al. 2011*).

Lors de l'étape d'analyse par cytométrie, il est indispensable d'utiliser un marqueur de viabilité, ce que ne font pas toutes les équipes, afin d'exclure les cellules mortes, ces dernières pouvant se situer dans la fenêtre SP lors de l'analyse (*Golebiewska et al. 2011*).

Enfin, s'il est recommandé de positionner la fenêtre SP en fonction des résultats du contrôle avec inhibiteur d'ABC transporteur, cette étape est parfois difficile à réaliser, d'une part car les inhibiteurs ne suppriment pas toujours complètement la population SP, d'autre part car ils modifient parfois le positionnement du « noyau » de cellules MP par rapport aux cellules incubées sans inhibiteur, ce qui rend le positionnement de la fenêtre SP inadapté.

L'ensemble de ces données montrent que la technique de mise en évidence de la fonctionnalité SP est très sensible et doit être réalisée avec une grande rigueur. Le respect strict de toutes les recommandations précitées est indispensable pour garantir la véracité des résultats et leur reproductibilité.

RESULTATS

I. RESUME DES RESULTATS

Au cours de ma thèse, j'ai étudié la régulation du phénotype SP des CSPH par le stroma médullaire. J'ai montré que, après purification par déplétion immuno-magnétique des cellules exprimant des marqueurs de lignée (déplétion lin^-), une population de cellules SP pouvait être mise en évidence au sein des cellules lin^- médullaires et représentait 1 à 2% de ces dernières. Cette population SP était maintenue en co-culture sur des CSM, mais disparaissait lorsque les CSPH étaient cultivées en l'absence de stroma. J'ai ensuite étudié les cellules du sang périphérique non mobilisé enrichies en PH immatures par déplétion lin^-. Ce compartiment circulant ne contient pas, ou extrêmement peu, de cellules SP. Par contre, lorsque ces PH lin^- de sang non mobilisé sont cultivés sur des CSM, une fraction de cellules SP de l'ordre de 2-3% des PH lin^- est détectée par cytométrie en flux. Ces résultats ne sont pas reproduits en l'absence de stroma ou lorsque les CSM sont différenciées en ostéoblastes matures. En effet, la capacité des CSM à promouvoir l'acquisition du phénotype SP par les PH de sang circulant disparaît progressivement lors de leur différenciation en ostéoblastes *in vitro*. La véracité des cellules SP révélées est authentifiée d'une part, par leur disparition en présence d'inhibiteurs d'ABC transporteurs (vérapamil, fumitrémorgine C, Ko143) et d'autre part, par leur capacité d'efflux de la Mitoxantrone, un agent anticancéreux. Nos résultats suggèrent que cette fraction SP serait plutôt induite *de novo* puisque elle apparait précocemment et son nombre augmente 40 fois en 4 jours alors que le nombre de cellules totales et de cellules $CD34^+$ diminue de 2 à 4 fois. De plus ces cellules sont majoritairement quiescentes.

Ces résultats assez surprenants m'ont incité à concentrer ensuite mon travail sur l'étude des mécanismes de régulation du phénotype SP des PH lin^- de sang non mobilisé par les CSM. Des expériences réalisées en chambre de Boyden et après inactivation métabolique des CSM à la glutaraldéhyde montrent que l'acquisition de ce phénotype nécessite à la fois un contact avec les CSM et leur sécrétion de facteurs diffusibles. Le contact entre les cellules hématopoïétiques et les cellules stromales doit être étroit car seule la fraction la plus adhérente (« nichée ») des PH lin^- est capable d'acquérir la fonctionnalité SP. Par rapport aux cellules qui n'acquièrent pas la fonctionnalité SP (cellules MP), les cellules SP expriment un phénotype plus immature comme le montre l'étude de l'expression de l'antigène CD34 et de différents marqueurs de différenciation et elles sont plus en quiescence, un tiers d'entre elles étant en G_0. Elles présentent également une plus grande capacité de prolifération en culture

secondaire en milieu liquide ainsi qu'un plus grand pouvoir clonogénique que leur contrepartie MP. Les études de biologie moléculaire et les expériences de migration en réponse au SDF-1/CXCL12 montrent que les cellules SP expriment plus son récepteur CXCR4 et migrent 7 fois plus que les cellules MP. De plus, elles sur-expriment certains gènes codant des molécules du « nichage » (ß1-intégrine, Tie2) et des gènes dits de « souchitude » (Oct-4, Runx-1, Robo-4). Enfin, des greffes réalisées chez la souris immunodéprimée NSG montrent que les cellules Lin^- SP provenant de sang périphérique cultivé sur CSM sont douées d'activité LT-SRC. De façon intéressante, leur capacité de greffe est supérieure à celle des cellules MP, et surtout à celle de PH $CD34^+$ de moelle osseuse non cultivés. Ces différents critères phénotypiques et fonctionnels *in vitro* et *in vivo* sont en faveur de la présence de CSPH parmi les cellules SP et en plus grand nombre que dans la fraction MP. De façon surprenante, nous montrons l'existence, au sein de la population de cellules SP, d'une sous population $CD34^+CD44^{-/faible}$ qui apparaît après la co-culture de cellules lin^- de sang sur CSM mais qui n'existe ni dans la population lin^- avant co-culture ni dans la fraction de cellules qui n'exprime pas la fonctionnalité SP après co-culture. Cette sous-population, qui représente environ un tiers des cellules SP $CD34^+$, est caractérisée par une grande capacité d'efflux du Hoechst 33342, une augmentation de l'expression des intégrines $\alpha 4$ et $\alpha 5$ et une importante fraction en G_0 (ratio $G_0/G_1 = 0,6$). Tous ces éléments indirects sont en faveur d'une plus grande immaturité de cette sous-population au sein des cellules SP ; compte tenu de sa rareté, je n'ai toutefois pas pu mieux la caractériser sur le plan fonctionnel (cultures secondaires, tests clonogéniques, greffes *in vivo*…).

L'étude des mécanismes contrôlant l'acquisition du phénotype SP par les PH lin^- de sang circulant montre que le VLA-4 et le CD44 sont les molécules clefs de ce processus. Cependant, contrairement à ce qui avait été suggéré chez la souris, d'autres acteurs potentiellement importants comme CXCR4, Tie2 et Mpl ne semblent pas jouer de rôle majeur dans notre système expérimental. L'efficacité de la toxine pertussique à bloquer l'acquisition de la fonctionnalité SP suggère l'implication de protéines G. L'hypothèse d'une coopération entre CD44 et VLA-4 avec une activation de VLA-4 par CD44 *via* les protéines G reste à confirmer. Les Src-kinases semblent également impliquées dans la transmission du signal comme le montrent l'effet de leur inhibition ainsi que l'augmentation de phospho-Src intracellulaire dans les cellules SP.

La fonctionnalité SP repose sur un mécanisme d'efflux actif de xénobiotiques et notamment de cytotoxiques comme les anthracyclines et leurs dérivés. Les anthracyclines faisant partie des drogues majeures du traitement de nombreuses hémopathies malignes, particulièrement

les LAM, j'ai ensuite étudié l'effet du stroma médullaire sur la fonctionnalité SP des blastes circulants de patients atteints de LAM. Une étude préliminaire réalisée sur six patients montre que les CSM de moelle osseuse de sujets sains sont capables de révéler ou de maintenir une fonctionnalité SP au sein des blastes circulants. L'activation de cette fonctionnalité est ß1-intégrine dépendante et promeut une capacité d'efflux de la Mitoxantrone. Ces éléments sont donc en faveur d'une capacité du stroma médullaire à moduler l'activité « *multidrugresistance* » de cellules leucémiques, mécanisme de CAM-DR encore jamais décrit.

II. ARTICLE

« SP/drug efflux functionality of hematopoietic progenitors is controlled by mesenchymal niche through VLA-4/CD44 axis »

Par : Jean-Valère Malfuson, Laetitia Boutin, Denis Clay, Cédric Thépenier, Christophe Desterke, Frédéric Torossian, Bernadette Guerton, Adrienne Anginot, Thierry de Revel, Jean-Jacques Lataillade* and Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès*

Manuscrit soumis

SP/drug efflux functionality of hematopoietic progenitors is controlled by mesenchymal niche through VLA-4/CD44 axis

Jean-Valère Malfuson[1,2], Laetitia Boutin[2], Denis Clay[3,4], Cédric Thépenier[2], Christophe Desterke[3,5], Frédéric Torossian[3,5], Bernadette Guerton[3,5], Adrienne Anginot[3,5], Thierry de Revel[1,6], Jean-Jacques Lataillade[2,6*] and Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès[3,4,5*]

[1] Service d'hématologie, HIA Percy, Clamart, F-92140, France
[2]CTS des Armées, Clamart, F-92140, France
[3]Inserm U972, Villejuif, F-94807, France
[4]IFR89, Univ Paris-Sud, Institut André Lwoff, Villejuif, F-94807, France
[5]Univ Paris-Sud, Institut André Lwoff, Villejuif, F-94807, France
[6]Ecole du Val de Grâce, 75230 Paris Cedex 05, France
[*] Theses authors have equally coordinated the work

Correspondance
Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès
Inserm, U972, 14 Av. Paul-Vaillant Couturier, Villejuif, F-94807, France
e-mail: caroline.le-bousse-kerdiles@inserm.fr
Tel: 33-1-45-59-53-03; Fax: 33-1-47-26-03-19
Jean-Jacques Lataillade
Département Recherche et Thérapies Cellulaires
Centre de Transfusion Sanguine des Armées ; BP 410, Clamart cedex, F-92141, France
e-mail: jjlataillade@gmail.com
Tel: 33 1 41 46 72 60; Fax: 33 1 41 46 72 81

Running Title: MSCs and SP functionality

Article character count: 4569 words
Abstract word count: 195words

The manuscript contains 6 figures, 3 supplementary tables, 3 supplementary figures and 53 references.

ABSTRACT

Hematopoiesis is orchestrated by interactions between hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) and stromal cells within bone marrow (BM) niches. Side Population (SP) functionality is a major characteristic of HSPCs related to quiescence and resistance to drugs and environmental stresses. At steady state, SP cells are mainly present in the BM and are mostly absent from the circulation except in stress conditions, raising the hypothesis of the versatility of the SP functionality. However, the mechanism of SP phenotype regulation is unclear. Here we show for the first time that the SP functionality can be induced in lin^- cells from un-mobilized peripheral blood after nesting on mesenchymal stromal cells (MSC). This MSC-induced SP fraction contains HSPCs as demonstrated by their (i) $CD34^+$ cell percentage, (ii) quiescent status, (iii) in vitro proliferative and clonogenic potential, (iv) engraftment in NSG mice and (v) stemness gene expression profile. We demonstrate that SP phenotype acquisition/reactivation by circulating lin^- cells is dependent on interactions with MSCs through VLA-4/α4ß1-integrin and CD44. A similar integrin-dependent mechanism of SP phenotype acquisition in acute myeloid leukemia circulating blasts suggests an extrinsic regulation of ABC transporter activity that could be of importance for the understanding of adhesion-mediated chemo-resistance.

INTRODUCTION

Hematopoietic stem/progenitor cell (HSPC) fate must be tightly regulated to maintain lifelong hematopoiesis and adaptation to various stresses. Most HSPCs reside in bone marrow (BM) niches, but a small fraction circulates in blood. BM niches participate in HSPC regulation through interactions with stromal cells, extra-cellular matrix (ECM) and diffusible factors [1]. The osteoblastic niche is suggested to maintain HSPCs in quiescence whereas the vascular niche would correspond to a proliferative/differentiation compartment [1]. More recently, a third niche mainly composed of mesenchymal stromal cells (MSC) has been described as the missing link between osteoblastic and vascular niches [2,3]. Within the osteoblastic niche, HSPCs are in close contact with immature osteoblasts [4] participating in the regulation of HSPC quiescence through integrin up-regulation and diffusible factor production [5-8].

First described by Goodell *et al.* in mouse BM Side Population (SP) functionality is defined by the capability of cells to efflux Hoechst 33342, a substrate of ATP-binding cassette (ABC) transporters and especially of ABCG2 that is responsible for protecting HSPCs against drugs and environmental stresses[9-11]. At steady state, SP cells are found in several tissues including skeletal muscles, liver, brain, skin and testis, and are enriched in stem cell activity [12]. In murine BM, SP phenotype is suggested to be associated to osteoblastic niche through Tie2/angiopoietin-1[5], MPL/Thrombopoietin (TPO) [6], N-Cadherin/N-Cadherin [13] expression.

In human hematopoietic organs, SP cells have been described in fetal liver [14], BM and umbilical cord blood [15]. In circulation, SP cells are scarcely present in mobilized [16] and un-mobilized peripheral blood (PB) [17,18]. Whereas it is a characteristic of stem cells, some erythroblasts, T lymphocytes, NK and dendritic differentiated cells can express SP phenotype [14,17,19,20].

In cancer, drug efflux through ABC transporters associated with the presence of SP cells is a major intrinsic mechanism of cancer/leukemic cell chemo-resistance [21-23]. Another chemo-resistance mechanism is reported to relay on quiescence and apoptosis modulation through extrinsic leukemic cells/stroma interactions *via* CXCR4, CD44 and α4ß1-integrin (VLA-4)[24-29].

The versatility of SP phenotype in hematopoietic cells according to their BM or PB localization raises the concern of the SP functionality regulation by stroma and suggests that drug efflux phenotype can be modulated. In this study, we demonstrate that human lin^- cells from unmobilized PB can acquire/reactivate SP functionality after a short nesting on MSCs. These MSC-induced SP cells contain HSPCs as ascertained by their quiescence, *in vitro* proliferative/clonogenic potential, *in vivo* engraftment in NSG mice, and gene expression

profile. We demonstrate that the acquisition of SP phenotype by circulating cells is dependent on MSC interactions through VLA-4 and CD44. The presence of a similar integrin-dependent mechanism of SP functionality acquisition in circulating blasts from acute myeloid leukemia (AML) suggests that ABC transporter activity and therefore chemotherapy efflux could be extrinsically regulated by adhesion to stroma.

MATERIALS AND METHODS

Hematopoietic cell isolation

Cell samples were collected from healthy donors or patients at Percy Hospital (Clamart-France) after informed consent in accordance with declaration of Helsinki.

PB cells: Mononuclear cells (MNCs) were isolated on a Ficoll Hypaque gradient (1.077g/ml density, PAN Biotech/Dutscher,) from (i) leukoreduction filters resulting from 500mL un-mobilized peripheral blood (PB) donations or (ii) blood samples of AML patients. Lin^- cells were recovered from PB MNCs by immunomagnetic depletion according to manufacturer's instructions (Miltenyi-Biotec) after labeling with a cocktail of biotin-coupled antibodies raised against lineage-specific antigens: CD2/CD3/CD11b/CD14/CD15/CD16/CD19/CD56/ CD123/CD235a. Lin^-PB cells represented 0.5-1.5% of PB MNCs.

BM cells: BM MNCs from patients undergoing hip surgery were incubated overnight at 37°C to remove adherent cells. Lin^-BM cells were isolated as described above and $CD34^+$ cells were obtained using immunomagnetic positive selection by autoMACS system[30].

MSC isolation and osteoblastic differentiation

BM MSCs obtained from 3 donors were selected, expended in α-MEM/10%FCS (Dutscher) and frozen as previously described[31]. For each donor, MSC phenotype was ascertained by flow cytometry as $CD90^+CD105^+CD73^+CD45^-CD34^-HLADR^-$ cells (Figure S1) and by their *in vitro* adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation capability (data not shown).

Four days before co-culture, first or second passage MSCs were thawed and plated ($4X10^4$ MSCs/cm^2) in 24-well culture plates in α-MEM/10%FCS. For *In vitro* osteogenic differentiation, MSCs were plated ($2X10^4/cm^2$) for 4-15 days in 24-well culture plates in α-MEM/10%FCS supplemented with 0.1μM dexamethasone, 0.05mM L-ascorbic acid-2-phosphate, and 10mM ß-glycerophosphate (Sigma) as described[31]. Alkaline-phosphatase (ALP), Von Kossa assay and alizarin red staining were performed to confirm osteogenic differentiation[31].

Co-culture of Lin^- cells on MSCs or osteoblastic cells

Lin^- cells from PB or BM were suspended in SynH (Abcell-Bio) supplemented with low dose of cytokines promoting HSPC survival (10 ng/ml recombinant human (rh) SCF (PeproTech), rhFlt3L (R&DSystems), rhTPO (PeproTech)) and were plated ($1X10^5/cm^2$) for 4 days on a confluent MSC or osteoblast layer, or without stroma as controls. After culture, hematopoietic

cells were harvested by supernatant aspiration followed by extensive washing to collect adherent cells. In some experiments, (i) hematopoietic cells from the supernatant and adherent cells were treated separately to compare non-nested and nested cells, (ii) stromal cells were fixed with 2% Glutaraldehyde (Sigma-Aldrich)[32] and (iii) transwell inserts (0.4μm polycarbonate filters-Nunc) were used to separate stromal cells from lin^-PB cells. AML blasts were cultured in SynH/10%FCS/2mM L-glutamine/1X non-essential amino-acids (Gibco).

For neutralization experiments, hematopoietic cells were incubated in SynH with anti-MPL, anti-CD49d, anti-CD61, anti-Tie2, anti-SDF1, anti-CD29, anti-CD44 antibodies or their Ig controls (Table S1) or with AMD3100 and rhVCAM-1 for 1Hour before MSC co-culture. Pertussis toxin (100ng/ml, Sigma) and Src inhibitor-1 (50ng/ml, Sigma) were incubated 3Hours before co-culture.

CXCL12 and Ang1 were quantified using ELISA kits (R&DSystems).

Side-population cell detection, sorting and characterization

Hoechst staining was performed on $CD45^+$ hematopoietic cells according to the literature[9,33,34]. Briefly, 10^6cells/ml were suspended in pre-warmed DMEM/2%FCS/10mM HEPES/Hoechst33342 (final concentration of 5μg/10^6cells/ml) (all from Invitrogen) and were incubated at 37°C for 90 minutes. After incubation, cells were placed on ice and all other staining were made with cold buffers. Hoechst active efflux was confirmed by addition of 50μM verapamil to control samples before incubation. In some cases, 25μM Ko143 or fumitremorgin C (Sigma-Aldrich) were used instead of verapamil [35].

Mitoxantrone Efflux*:* Efflux studies were performed during Hoechst staining. Mitoxantrone (final concentration: 0.1μg/ml, Teva) was added 60 minutes after the start of Hoechst staining for 30mn, and removed by centrifugation in a 37°C pre-warmed centrifuge. Then, Hoechst incubation was performed for 15 minutes. Fluorescence emitted from mitoxantrone after excitation at 633nm was detected at 670/40nm.

Phenotypic analysis and SP detection*:* Co-staining was completed with fluorescence-conjugated antibodies listed in Table S2. 7-AAD positive dead cells were excluded using the PE-Cy5 channel. Flow cytometry was carried out using a FACSDiva (Becton-Dickinson) equipped with an Enterprise-IIC water-cooled laser (488/350nm; Innova-Technology) and a Spectra-Physics helium-neon laser (633nm; Spectra-Physics Lasers model-127) as described in *supplemental materials and methods.*

***Cell cycle analysis**:* Quiescent (G_0) and cycling (G_1 and $S+G_2/M$) cells were separated based on Hoechst/Pyronin Y fluorescence as previously described[36]. For that purpose, 170µM Pyronin-Y (50ng/ml; Sigma-Aldrich) was added for 30min at 37°C at the end of Hoechst incubation.

Src-kinase phosphorylation level determination: Post co-culture sorted SP and MP cells were fixed in PBS-formalin (2%) for 1 hour and in 70% ethanol overnight (4°C). Cells were washed in PBS-0.5%BSA-Triton0.25X and incubated first with either anti-phosphoSrc mAbs (Tyr527 antibodies-Cell Signaling), or rabbit IgG isotype (Rockland) for 45minutes (4°C) and then with a secondary anti-rabbit antibody-Alexa-Fluor 488nm (Invitrogen). A minimum of 10^3 gated events were analyzed by flow cytometry.

***Long-term liquid and semi-solid cultures**:* SP or MP cells obtained after co-culture on MSCs were sorted and secondary cultured in liquid medium using SynH supplemented with rhSCF+rhTPO+rhFlt3L (50ng/ml) and rhIL-3+rhIL-6+rhIL-11+rhG-CSF (10ng/ml; R&DSystems). The amplification rate of each subset was evaluated at day 21. Representative aliquots were taken weekly during culture (D0-D21) to assess their clonogenic hematopoietic progenitor content by colony-forming-unit assay as described [34].

In vitro migration assay: Transwell migration assay was carried out on post co-culture sorted SP and MP cells. Cells (800) were loaded in RPMI-0.5%BSA on the top chamber and rhCXCL12 (100ng/ml) was added or not to the bottom chamber. The percentage of migrating cells was calculated after quantification of live cells in top and bottom chambers after 2-hour incubation at 37°C.

Engraftment in NSG mice: NSG mice, housed at the Institut-Gustave-Roussy (France), were irradiated at 3.25Gy 24h prior intra-orbital injection of post co-culture sorted SP or MP cells (10000 cells/mouse, n=3). To obtain 30000 SP cells, 1.5-2X10^7 lin^-cells purified from 8 leukoreduction filters containing about 1.5-2X10^9 CMN were seeded on MSCs for a 4-day co-culture. Fresh human $CD34^+$BM cells (10000 and 350000 cells) were grafted in the same conditions as controls (n=3). Mice were sacrificed 12 weeks after injection and BM cells were analyzed by flow cytometry for the presence of $HuCD45^+$/$MoCD45^-$ cells. Experiments were performed in compliance with the French Ministry of Agriculture regulation procedures.

Molecular profile analysis: Reverse transcription of total RNA from post co-culture sorted SP or MP cells (2000-30000) was carried out using a multiscribe TaqMan RT kit (Applied-Biosystems) and specific primers as described in *supplemental materials and methods* and *Table S2,* respectively.

Statistical analysis

Data are expressed as mean+/-SEM. The significance ($p<0.05$) between each condition and its control was determined using the paired or unpaired *t*-test.

RESULTS

Co-culture with MSCs promotes acquisition of SP functionality in circulating Lin$^-$ hematopoietic cells

Figure 1A shows that very few SP cells were detected in lin$^-$ cells either freshly isolated from unmobilized PB (0.011+/-0.008%, n=5) or after control MSC-free cultures (0.018+/-0.005%, n=10). In contrast, a 4-day MSC co-culture revealed cells with SP functionality in lin$^-$PB cells (2.68%+/-0.67%, n=12), corresponding to a 240-fold increase in percentage. These SP cells were CD45$^+$, eliminating a potential contamination by MSCs and confirming their hematopoietic origin (Figure S3). Addition of Verapamil, an ABC-transporter inhibitor, abrogated the Hoechst efflux (Figure 1A). Similarly, the SP percentage dropped from 3.2%+/-0.7% to 1.1%+/-0.4% (n=6, $p<0.001$) and from 2.2%+/-0.2% to 1.6%+/-0.3% (n=4, $p<0.05$) after addition of Ko143 or fumitremorgin C, respectively (data not shown), demonstrating the participation of ABCG2 pump in the SP promotion[35].

Immature osteoblasts were reported to participate in SP phenotype within the endosteal niche[4,5]. Therefore, we studied the role of MSC-derived osteoblasts at different maturation degrees in this SP functionality acquisition. Figure 1B shows that it progressively dropped during osteoblastic differentiation and almost disappeared after 15 days of differentiation, corresponding to *in vitro* osteoblast maturation as illustrated by ALP expression, Von Kossa coloration and red alizarin staining (Figure S3).

We further analyzed the kinetics of SP functionality acquisition by lin$^-$PB cells after 2-6 days of co-culture with MSC and showed that SP cells could be detected since 2 days of co-culture (Figure 1C). The functionality of these MSC-induced SP cells was ascertained by their capability to efflux more mitoxantrone than MP cells (Figure 1D).

In contrast to PB, SP cells are initially present in fresh lin$^-$BM cells (1.9%+/-0.9%, n=5). Therefore, we tested whether SP cells were maintained/amplified after co-culture on MSCs. Figure 1E shows that whereas SP cells were maintained in co-culture with MSCs (1.5%+/-0.5%, n=5), they disappeared in control stroma-free cultures.

Altogether these data demonstrate that co-culture with MSCs promotes acquisition of the SP functionality in circulating lin$^-$ hematopoietic cells.

Figure 1: Co-culture with MSC promotes acquisition of the SP phenotype in circulating lin$^-$ hematopoietic cells

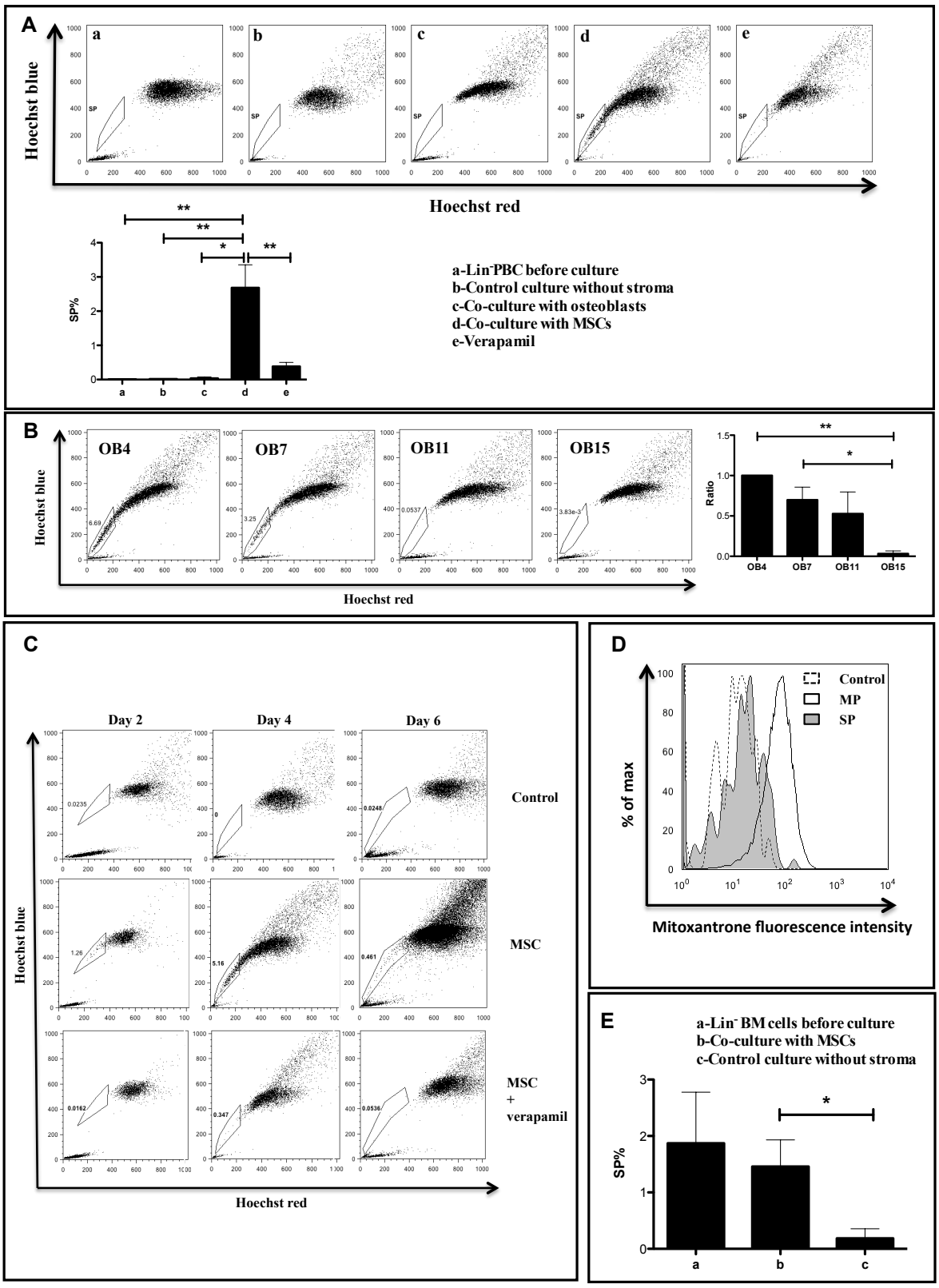


Figure 1 (Legend): Co-culture with MSC promotes acquisition of the SP phenotype in circulating Lin$^-$ hematopoietic cells

Cytograms A illustrate flow cytometry acquisition of SP cells in circulating lin$^-$ PB cells in different culture conditions. The histogram shows the mean percentage (+/-SEM) of SP cells obtained in:

a- freshly purified lin$^-$ PB cells without culture (0.011% +/- 0.008%, n=5)

b- lin$^-$ PB cells after 4 days of culture in cytokine supplemented medium without MSC layer (control) (0.018% +/- 0.005%, n=10)

c- lin$^-$PB cells after 4 days of co-culture on MSC-derived osteoblast (OB) layers in cytokine supplemented medium (0.04% +/- 0.04%, n=4)

d- lin$^-$ PB cells after 4 days of co-culture on MSC layers in cytokine supplemented medium (2.68% +/- 0.67%, n=12)

e- lin$^-$ PB cells after 4 days of co-culture on MSC layers in cytokine supplemented medium in the presence of 50µM verapamil (0.38% +/- 0.12%, n = 12)

Cytograms B illustrate the flow cytometry acquisition of SP cells in circulating lin$^-$ PB cells after co-culture on a MSC-derived osteoblast (OB) layer at different times of differentiation (4, 7, 11, 15 day). The histogram shows the *ratio* of [the percentage of SP cells after of co-culture on OB differentiated for 7 (OB7), 11 (OB11), 15 days (OB15) / the percentage of SP cells after 4 days of co-culture on OB differentiated for 4 days (OB4)]. Results are shown as mean of *ratio* from 3 independent experiments (OB4/OB4 *ratio* = 1, OB7/OB4 *ratio* = 0.7 +/- 0.16, OB11/OB4 *ratio* = 0.53 +/- 0.27, OB15/OB4 *ratio* = 0.03 +/- 0.03).

Cytograms C illustrate the flow cytometry acquisition of SP cells in circulating lin$^-$ PB cells after 2, 4, and 6 day of co-culture with (MSC and MSC + verapamil) or without (Control) MSCs in a cytokine supplemented medium; the percentage of SP cells was quantified at each time points.

Results from one representative experiment on the three independent performed are presented.

Cytogram D illustrates the mitoxantrone efflux capability of SP and MP cells evaluated by flow cytometry. Lin$^-$ cells were co-cultured 4 days with MSC and incubated in presence of Hoechst 33342 and mitoxantrone. The fluorescence emitted by the drug was plotted according 3 gated cell populations: SP cells (solid line, shaded), MP cells (solid line) and negative control (dashed line). One representative experiment on the three independent performed is represented showing that the mitoxantrone efflux by SP cells was significantly higher than those by MP cells (SP/MP mitoxantrone MFI *ratio* = 0.2+/-0.02; $p<0.001$; n=3). MFI = mean fluorescence intensity.

Histogram E shows the mean percentage (+/-SEM) of SP cells in bone marrow (BM) lin^- hematopoietic cells co-cultured or not on a MSC layer in different conditions:

a- without co-culture (1.9% +/- 0.9%, n=5)

b- after 4 days of co-culture on a MSC layer in a cytokine supplemented medium (1.5% +/-0.5%, n=5)

c- after 4 days of culture in a cytokine supplemented medium without MSC layer (0.2% +/- 0.2%, n=4)

** Indicates p-value < 0.01, * Indicates p-value < 0.05.

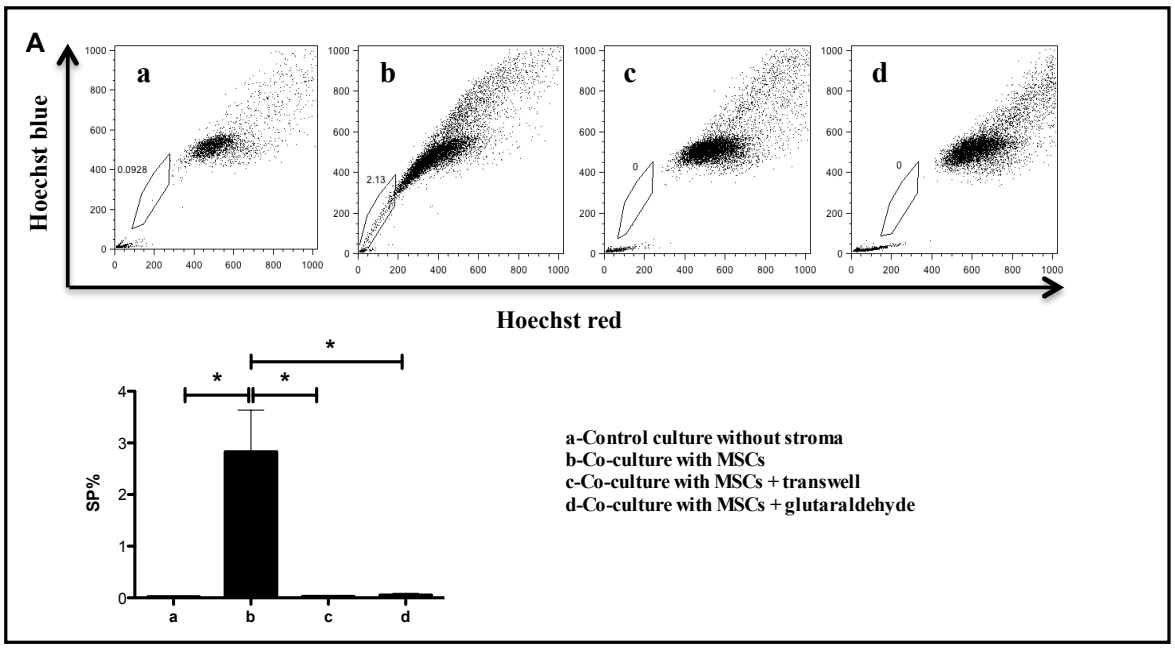
Nesting within MSCs and cytokine secretion are required to promote SP functionality in lin$^-$PB cells

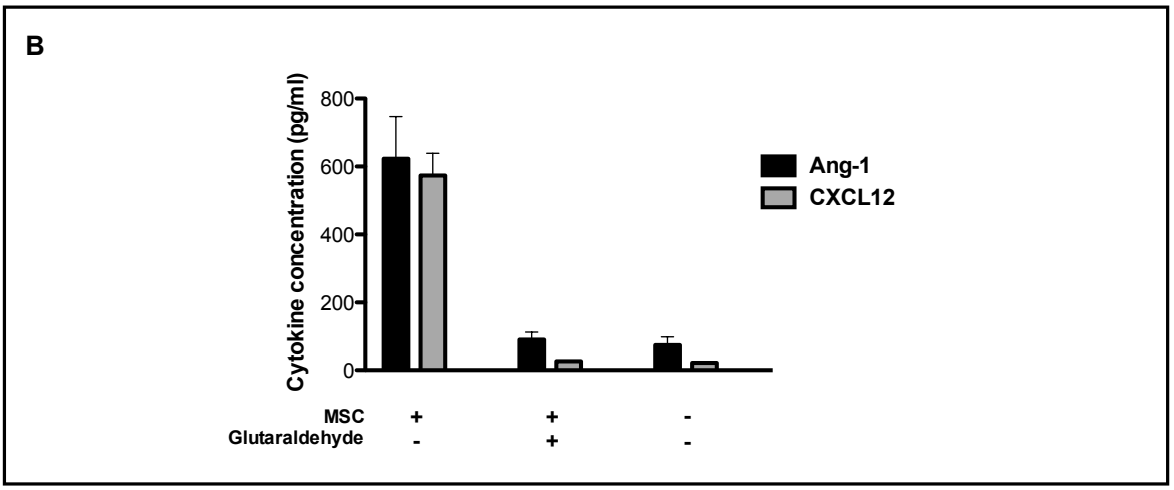
To analyze the role of cellular and humoral interactions in SP phenotype acquisition after MSC co-culture, we either separated MSCs and lin$^-$PB cells using a transwell insert or metabolically inactivated MSCs with glutaraldehyde[32] before co-culture. In comparison to MSC co-cultures, the proportion of SP cells was significantly reduced in transwell or glutaraldehyde conditions (Figure 2A). Figure 2B shows that CXCL12 and Ang-1 were highly secreted by MSCs and that their secretion was blocked by glutaraldehyde.

We further studied the proportion of SP cells in hematopoietic fractions nested or not within MSC layer. Figure 2C shows that SP cells were mainly present in the MSC-nested hematopoietic fraction as compared to the non-adherent one (4.8%+/-1% *vs.* 0.31%+/-0.2%; n=4, $p<0.05$). The nested fraction also included a higher proportion of CD34$^+$ cells as compared to the non-adherent one (70%+/-5% *vs.* 54%+/-5%; n=4, $p<0.01$; data not shown). As nested and non-adherent fractions comprised similar proportion of cells, the absolute number of SP cells was always higher in the nested fraction as compared to the non-adherent one (data not shown).

These data indicate that a tight adhesion/nesting to MSCs is required for acquisition of the SP functionality by circulating lin$^-$ cells and that cytokine secretion participates in this process.

Figure 2: Nesting within MSCs and cytokine secretion are required to promote SP cells in lin$^-$ PB cells





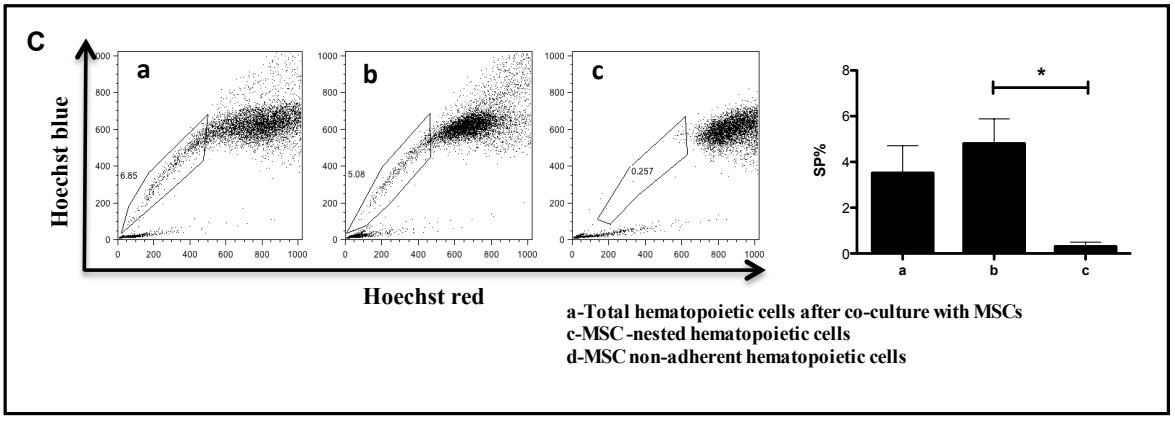


Figure 2 (Legend): Nesting within MSC layer and cytokine secretion are required to promote SP cells in lin$^-$ PB cells

(A) Percentage (mean+/-SEM) of SP cells detected by flow cytometry in lin$^-$ PB cells after 4 day culture in a cytokine-supplemented medium or after 4 day culture in different conditions:

a- without MSC layer (0.02% +/- 0.01%, n=7),

b- on a MSC layer (2.83% +/- 0.8%, n=7),

c- using a transwell device between MSCs and lin$^-$ PB cells (0.03% +/- 0.01%, n=5),

d- on a MSC layer previously treated by glutaraldehyde (0.06% +/- 0.03%, n=6).

Cytograms are from one representative experiment and histogram shows means (+/-SEM) of SP percentages obtained from 5 to 7 independent experiments.

(B) Ang-1 and CXCL12 were quantified by ELISA in the culture supernatant of lin$^-$PB without MSC (75 +/- 23 for Ang-1 and 22 +/- 0.3 for CXCL12) or with MSC (623 +/- 124 for Ang-1 and 574 +/- 65 for CXCL12) or in presence of glutaraldehyde pre-treated MSC (91 +/- 22 for Ang-1 and 26 +/- 1 for CXCL12). Results from two independent experiments are expressed as concentrations in pg/mL (mean+/-SEM).

(C) SP cells were detected by flow cytometry after 4 days of co-culture with MSC: (a) in total hematopoietic lin$^-$ PB cell population (mean percentage of SP cells +/-SEM = 3.5% +/- 1.2%), (b) in MSC-nested hematopoietic cell fraction (mean percentage of SP cells +/-SEM = 4.8% +/- 1%), (c) in MSC-non-adherent hematopoietic cell fraction (mean percentage of SP cells +/-SEM = 0.31% +/- 0.2%). Cytograms are from one representative experiment and histogram (+/-SEM) shows means of SP percentages obtained from 4 independent experiments.

* Indicates p-value < 0.05.

MSC-induced SP fraction from Lin$^-$PB contains HSPCs with SRC activity

Figure 3A illustrates that a 4-day MSC co-culture with low doses of survival cytokines increased the percentage of CD34$^+$ cells in SP fraction and the MP as compared to lin$^-$PB cells (66%+/-6% *and* 54%+/-7% *vs.* 24.7%+/-4% , n=6, p<0.001 and p<0.01, respectively). When calculated in absolute number, that of lin$^-$PB cells was 4-fold decreased (from 200000 seeded cells to 43700+/-3800; n=6, p<0.05) and that of CD34$^+$ cells was 2-fold decreased (from 49500+/-7500 to 24100+/-3700; n=6, p<0.05). In contrast, the total number of SP cells was 40-fold increased from 40+/-13 to 1650+/-440 (n=6, p<0.05).

We analyzed the expression of lineage differentiation markers on SP cells promoted by stroma co-culture and found that less than 15% of SP cells expressed CD3, CD10, CD19, CD56, CD15 or CD36 (data not shown, n=5). Together with the high percentage of CD34 cells in the SP fraction, our results demonstrate that MSC-induced SP cells mainly contain immature hematopoietic progenitors.

As SP cells were mainly present in the MSC-nested hematopoietic population, we analyzed the cell cycle status of CD34$^+$SP cells and showed that the G_0/G_1 ratio of MSC-induced CD34$^+$SP cells was two-fold higher than that of CD34$^+$MP cells (Figure 3B).

We further evaluated the proliferative and clonogenic potentials of SP and MP cells sorted after a 4-day MSC co-culture by a secondary MSC-free liquid culture for 21 days. Figure 3C shows that SP cell amplification rate was 3-fold higher than that of MP at day 21 (13+/-2 *vs.* 4+/-1; n=6, p<0.001), demonstrating that SP fraction was 3-fold more proliferative than the MP one. At day 0, the cloning efficiency (CE) of SP and MP cells was quite similar (2.35%+/-0.5% and 1.99%+/-0.5% respectively; n=5). However, while the CE of MP cells decreased since day 7, that of SP cells remained stable (2.12%+/-0.5% *vs.* 0.56%+/-0.1%; n=5, p<0.05) and only progressively decreased from day 14 (1.55%+/-0.4% *vs.* 0.69%+/-0.4%; n=6, p<0.05). Taking into account their amplification rate, the total number of clonogenic myeloid progenitors at day 21 was 5-fold higher in SP fraction than in the MP one (data not shown).

We also quantified gene expression of molecules implicated in “stemness” and “nesting” in both post co-culture sorted SP and MP fractions. Figure 3D shows that, in contrast to *CD44,* the mRNA level of *CXCR4, ß1-integrin, Tie*-2, *Oct-4, Runx-1, Robo*-4 was higher in SP cells than in MP cells, in favor of a better “nesting” and “stemness” potential of the formers. Lastly, we compared the CXCL12-dependent migration of post co-culture sorted SP and MP cells and tested their capability to engraft in NSG mice. Figure 3E shows that SP cells exhibited a significant higher migration capability than their MP counterparts (44%+/-13% *vs.*

7+/-2%; n=4, $p<0.05$). SP cells also retained a higher engraftment potential in NSG mouse as compared to MP cells. Actually, 12 weeks after IV injection of $1x10^4$ cells, the percentage of $huCD45^+$ cells was higher after injection of post co-cultured sorted PBSP cells (0.050%+/-0.007%, n=3) than of their MP counterparts (0.019%+/-0.007%; n=3, $p<0.05$) or of fresh $BMCD34^+$ cells (0.013%+/-0.004%; n=3, $p<0.05$) (Figure 3F). As a control, engraftment of $3.5x10^5$ $BMCD34^+$ cells gave rise to 4.8% $huCD45^+$ cell chimerism (data not shown).

These results demonstrate that the MSC-induced SP fraction in lin^-PB cells contains HSPCs in terms of phenotype, quiescence status, proliferation and clonogenic capabilities, and stemness/nesting gene expression. Moreover, MSC-induced SP cells exhibit a higher migration potential and a better mouse engraftment capacity than MP cells.

Figure 3: The MSC-induced SP fraction from Lin⁻ PB cells contains HSPCs with SRC activity

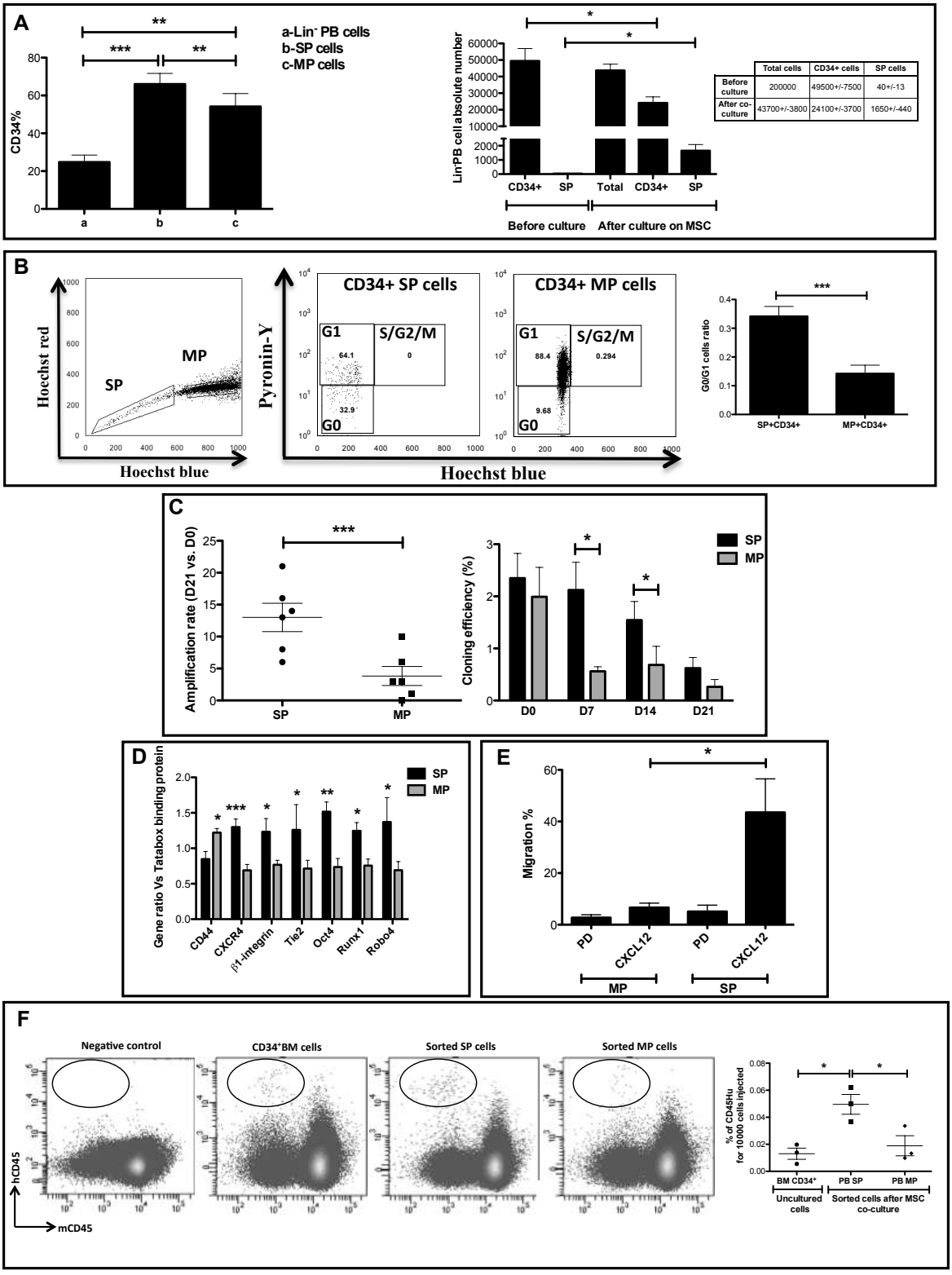


Figure 3 (Legend): The MSC-induced SP fraction in Lin$^-$ PB cells contains HSPCs with SRC activity

(A) The left histogram shows the mean percentage (+/-SEM) of CD34$^+$ cells calculated by flow cytometry in: (a) fresh lin$^-$ PB cells (24.7%+/-4%), (b) SP cells after co-culture on MSC (66%+/-6%), (c) MP cells after co-culture on MSC (54%+/-7%). The right histogram shows the absolute number (+/-SEM) of total hematopoietic cells, CD34$^+$ cells, SP cells obtained before and after MSC co-culture, for 200000 lin$^-$PB cells seeded. Results are from 6 independent experiments.

(B) The cell cycle status of hematopoietic cells was evaluated after 4 days of co-culture on MSCs by flow cytometry after Pyronin-Y/Hoescht blue dual staining. A representative flow cytometry cytogram showing a typical cell population profile of SP and MP cells obtained after this staining is presented. The percentages of CD34$^+$SP cells and CD34$^+$MP cells in G_0, G_1 and S/G_2M cell cycle phases are shown in representative flow cytometry cytograms from one experiment among 6.

The G_0/G_1 ratio in CD34$^+$SP cells and CD34$^+$MP cells are shown on the histogram. Results are expressed as mean +/- SEM (0.34+/-0.03 in CD34$^+$ SP cells and 0.14+/-0.03 in CD34$^+$ MP cells; n=6).

(C) Proliferative potential of sorted SP and MP cells obtained after 4 days of co-culture with MSCs was determined in liquid culture in presence of cytokines. The amplification rates of SP and MP fractions were determined at day 21 and are expressed in the histogram as mean+/-SEM. The myeloid cloning efficiency was quantified in semi-solid culture weekly from day 0 to day 21, and calculated as the percentage of the colonies obtained from 500 plated cells. Results are expressed as mean +/- SEM (n= 5 to 6 independent experiments).

(D) The expression profiles of genes involved in "stemness" or nesting were assessed by Q-RTPCR in SP and MP cells sorted from lin$^-$PB cells co-cultured with MSC. Results are normalized according to the *TATA Box binding protein* gene expression level and expressed as mean +/- SEM ratio (n= 5 independent experiments). Only differentially expressed genes are presented in the histogram. There was no statistically significant difference between SP and MP cells in gene expression of *NCAD, MPL, GATA-2, beta-3 integrin and Notch.*

(E) The migration capacity of sorted SP and MP cells according a CXCL12 gradient (100ng/ml) was tested in Boyden chamber. The mean percentages (+/-SEM) of migrated SP and MP cells in the presence (CXCL12) or the absence (PD = passive diffusion) of CXCL12 are shown in the histogram (n = 4 independent experiments).

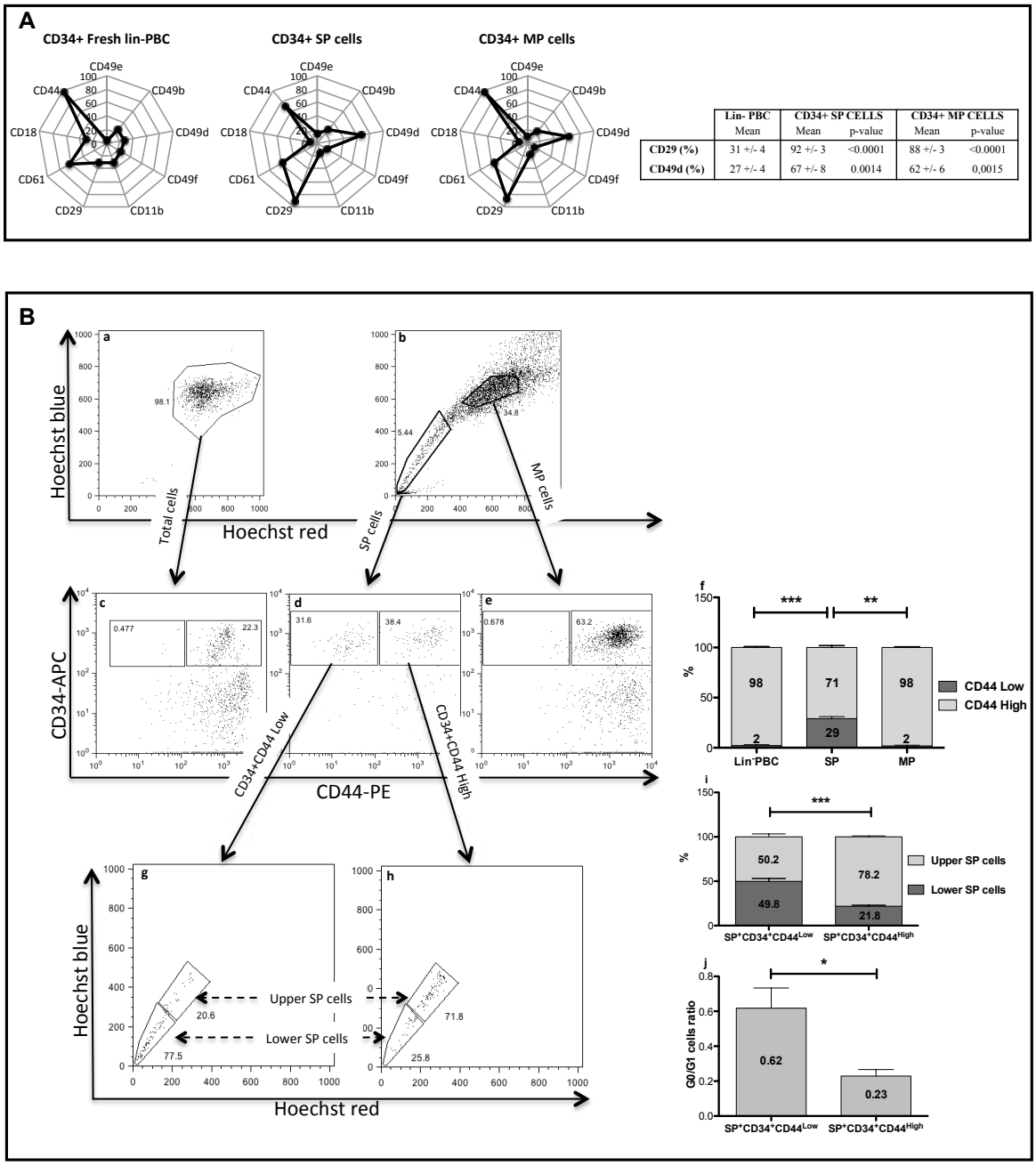
(F) The SRC capability of $CD34^+$BM, SP and MP cells was evaluated after intra orbital-injection (10.000 cells) in NSG mice. SP and MP cells were sorted from a 4 day co-culture of lin^-PB cells with MSC. Three mice were injected with each type of cells and BM chimerism was evaluated after 12 weeks by flow cytometry based on the percentage of human CD45+ cells for 10.000 injected cells. Representative flow cytometry cytograms of human chimerism evaluation and a scatter plot summarizing the engraftment are presented.
* indicates p-value < 0.05; ** indicates p-value < 0.01; *** indicates p-value < 0.001.

Interactions between lin$^-$PB cells and MSCs modulate VLA-4 and CD44 expression

Figure 4A shows that co-culture with MSCs up-regulated the percentage of CD29/ß1-integrin$^+$ and CD49d/α4-integrin$^+$ cells in both CD34$^+$SP and CD34$^+$MP fractions as compared to fresh CD34$^+$lin$^-$PB cells. MSC co-culture also revealed the presence of CD34$^+$SP$^+$CD44$^{-/low}$ cells that existed neither in fresh lin$^-$PB cells nor in CD34$^+$MP cells (Figure 4B). This population represented 29%+/-2% of the CD34$^+$SP$^+$ fraction and was characterized by a strong Hoechst efflux ability since a higher proportion of CD34$^+$SP$^+$CD44$^{-/low}$ cells were in lower SP compartment as compared to CD34$^+$SP$^+$CD44^{high} cells (49.8%+/-3% *vs.* 21.8%+/-1%, respectively; n=9, $p<0.001$). Furthermore, the CD34$^+$SP$^+$CD44$^{-/low}$ population expressed a higher proportion of cells in G_0 as compared to CD34$^+$SP$^+$CD44^{high} cells (G_0/G_1 ratio: 0.62+/-0.1 *vs.* 0.23+/-0.03, respectively; n=4, $p<0.05$) (Figure 4B). A higher percentage of CD34$^+$SP$^+$CD44$^{-/low}$ cells also expressed α4- and α5-integrins than their CD34$^+$SP$^+$CD44^{high} counterparts (73%+/-5% *vs.* 67%+/-6%; n=5, $p<0.01$ and 27%+/-6% *vs.* 7+/-2%; n=4, $p<0.05$) (data not shown).

These data suggest that co-culture on MSCs up-regulates α4- and ß1-integrins on CD34$^+$ lin$^-$ PB cells and that the MSC-induced SP$^+$CD34$^+$ fraction contains a quiescent CD44^{low} sub-population exhibiting a high Hoechst efflux.

Figure 4: Interaction between lin⁻ PB cells and MSC modulate α4 and ß1 integrins and CD44 expression



	Lin- PBC	CD34+ SP CELLS		CD34+ MP CELLS	
	Mean	Mean	p-value	Mean	p-value
CD29 (%)	31 +/- 4	92 +/- 3	<0.0001	88 +/- 3	<0.0001
CD49d (%)	27 +/- 4	67 +/- 8	0.0014	62 +/- 6	0,0015

Figure 4 (Legend): Interactions between lin$^-$ PB cells and MSC modulate α4 and ß1 integrin and CD44 expression.

(A) The expression of various adhesion markers by fresh CD34$^+$ PB cells, CD34$^+$SP and CD34$^+$MP fractions are shown on a twelve o'clock rays. Cells were harvested after 4 days of co-culture on MSCs and stained with specific antibodies before flow cytometry analysis. Analyses are gated on the CD34$^+$ subset of each population. Results from 5 independent experiments are presented as mean percentages of positive cells.

Table represents markers that are differentially expressed between CD34$^+$ fresh lin$^-$PB cells, CD34$^+$SP and CD34$^+$MP cells. Results are shown as mean percentage of expressing cells (+/- SEM). Only antigens with more than 10% expression in one of the three populations are shown on the figures; Tie2, MPL, CXCR4, CD11a and CD11c did not fulfil this criterion.

(B) The expression of CD44 by fresh lin$^-$PB cells, CD34$^+$SP and CD34$^+$MP fractions was evaluated by flow cytometry. SP and MP cells were obtained after 4 days co-culture with MSCs. Total Fresh lin$^-$PB cells (a), post co-culture SP cells or MP cells (b) were gated, and the co-expression of CD34 and CD44 was evaluated: Cytograms of a representative experiment are presented (c, d, and e) and histogram (f) shows the mean of 4 independent experiments. The proportion of lower (high Hoechst efflux) and upper (low Hoechst efflux) SP cells was evaluated in SP$^+$CD34$^+$CD44^{Low} and SP$^+$CD34$^+$CD44^{High} cells subsets: Cytograms of a representative experiment are presented (g and h) and histogram (i) shows the mean of 9 independent experiments. Histogram (j) shows the mean of 4 independent experiments evaluating the cell cycle status of SP$^+$CD34$^+$CD44^{Low} and SP$^+$ CD34$^+$CD44^{High} cells subsets.

* indicate p-value < 0.05; ** indicate p-value < 0.01; *** indicate p-value < 0.001.

VLA-4 and CD44 mediate the SP functionality promoting effect of MSCs through G-protein and Src-kinase signal transduction

To approach the mechanism underlying the SP functionality promoting effect of MSCs, we tested the inhibitory effect of neutralizing antibodies against molecules potentially modulated by MSC nesting. Addition of anti-CD61, anti-CXCL12, anti-CXCR4, anti-Tie2 or anti-MPL antibodies did not affect the SP functionality promoting effect of MSCs (Figure 5A). The absence of inhibitory effect of the CXCR4/CXCL12 axis blockade was confirmed by the use of AMD3100, a CXCR4 antagonist[37]. In contrast, SP promotion was significantly inhibited after CD29/ß1-integrin (SP *ratio* test/control=0.34+/-0.12; n=8, $p<0.001$), CD49d/α4-integrin (0.57+/-0.18; n=5, $p<0.05$) and CD44 (0.69+/-0.15; n=7, $p<0.05$) blockade. The inhibitory effect of α4ß1-integrin/VLA-4 was strengthened by our data showing that addition of soluble VCAM-1, as a VLA-4 decoy receptor, significantly reduced the SP functionality promoting effect of MSCs (SP *ratio* test/control=0.3+/-0.09; $p<0.01$, n=4).

VLA-4 can be activated by G-protein coupled receptors such as CXCR4 and CD44, and can transduce outside-in signaling through Src-kinases. Figure 5B shows that neutralization of G-proteins or of Src-kinases by addition of Pertussis toxin or of Src-Inhibitor1, respectively significantly reduced the proportion of SP cells compared to untreated cells. The participation of Src-kinases was strengthened by the increased proportion of phospho-Src expressing cells in SP cells compared to the MP one (Figure 5C).

Our results suggest that the SP promoting effect of MSCs involves VLA-4- and CD44-mediated adhesion and goes through G-protein and Src-kinase signal transduction.

Figure 5: α4β1-integrin/VLA-4 and CD44 mediate the SP promoting effect of MSC through G-protein and Src-kinase mediated signal transduction

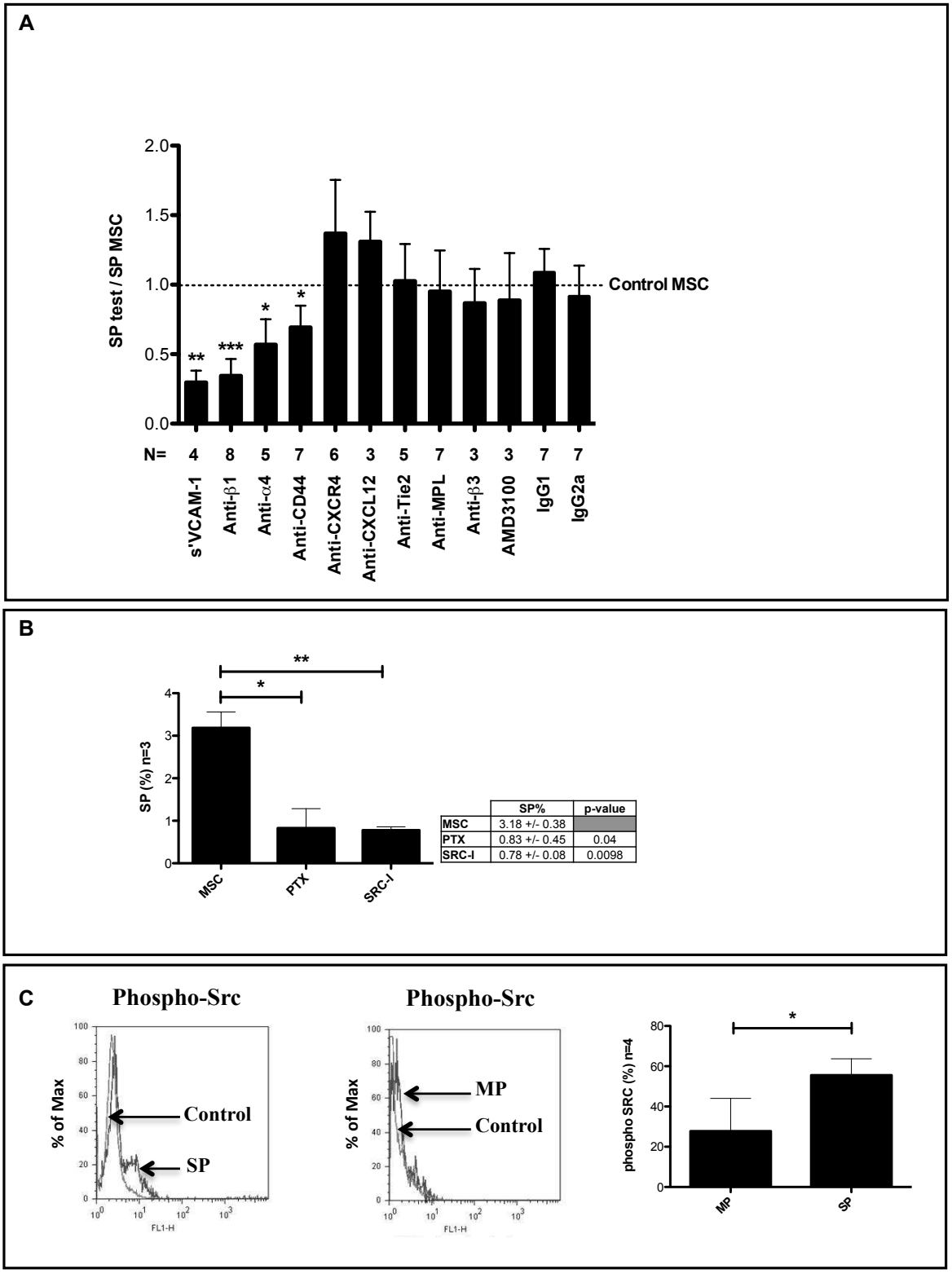


Figure 5: α4ß1-integrin/VLA-4 and CD44 mediate the SP promoting effect of MSC through G-protein and Src-kinase mediated signal transduction

(A) Ratios (mean +/-SEM) between percentages of SP cells obtained from co-cultures in presence of blocking antibodies (SP test) *vs.* controls MSC cultures (SP MSC). Before each test, freshly isolated lin^-PB cells were incubated 60min in presence of various blocking antibodies or their mouse IgG1 or rabbit IgG2a isotype controls (CD29 (ß1-integrin), CD44, CD49d (α4-integrin), CD61 (ß3-integrin), Tie2, MPL, CXCR4, CXCL12). AMD3100 was also used to block CXCR4 function and a soluble recombinant (s') VCAM-1 was used as decoy receptor.

The number of independent experiments for each co-culture test is indicated on the bottom of the figure.

(B) The effect of pertussis toxin (PTX) and Src Inhibitor-1 (SRC-I) was evaluated on the SP promoting effect of MSC. Before each co-culture, freshly isolated lin^-PB cells were incubated 3 hours in presence of PTX or SRC-I or on MSC alone (MSC). The Mean percentages of SP cells obtained from three independent experiments are shown in the histogram for MSC, PTX and SRC-I conditions.

(C) The intra-cellular phospho-Src expression was evaluated by flow cytometry in SP or MP sorted cells after 4 days of co-culture on MSC layer. Cytograms from one representative experiment give the expression level of phospho-Src in SP and MP cells. . Intracellular phospho-Src staining is shown in black and isotype control in grey. The histogram represents the mean of percentages of phospho-Src expressing SP and MP cells from 4 independent experiments (56%+/-8% vs. 28%+/-16%; $p<0.05$, n=4).

* indicates p-value<0.05, ** indicates p-value < 0.01, *** indicates p-value < 0.001.

Co-culture of AML cells on MSCs promotes SP phenotype acquisition in a ß1-integrin dependent manner

SP functionality is closely associated with chemo-resistance in leukemic cells. Therefore, we evaluated whether co-culture of circulating AML blasts on MSCs modulated their SP functionality, similarly to normal hematopoietic cells. Figure 6A shows that SP cells were initially detected in blasts from four on the six AML patients and that their proportion decreased in culture without stroma. In contrast, a 4-day co-culture on MSCs permitted to maintain, amplify or promote the proportion of blast cells with SP functionality.

We further focused on patient UPN15 to evaluate whether the SP promoting effect of MSCs was integrin dependent. Figure 6B shows that ß1-integrin blockade strongly inhibited the SP promoting effect of MSC on AML blasts. The presence of SP cells after MSC nesting was associated with an efficient drug efflux in AML blasts as demonstrated by the decreased mitoxantrone fluorescence intensity in SP fraction as compared to the MP one (Figure 6C).

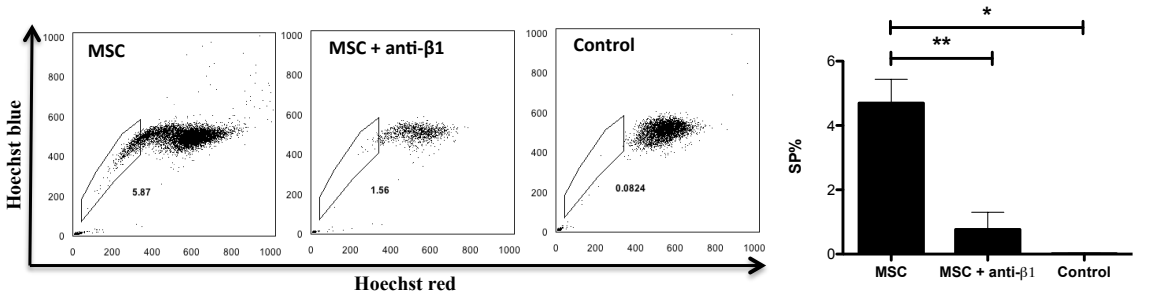
Altogether, these data demonstrate a similar SP functionality promoting effect of MSCs on PB AML blasts and that this ABC transporter activation goes through an integrin-mediated pathway.

Figure 6: Co-culture of AML cells on MSCs promotes SP phenotype acquisition in a β1-integrin dependent manner

A

UPN	AML Subtype	ELN Prognosis group	SP%		
			INI	MSC	Control
6	NK, NPM1+ FLT3 ITD -	Favorable	0.048	0.036	0
7	MK	Adverse	1.26	0.57	0.08
16	NK, NPM1+ FLT3 ITD -	Favorable	1.66	2.7	0.86
15	MK	Adverse	0	6.9	0
19	+8, FLT3 ITD+	Intermediate-II	0	0.09	0
26	NK, FLT3 ITD+	Intermediate-I	0.26	6	0

B



C

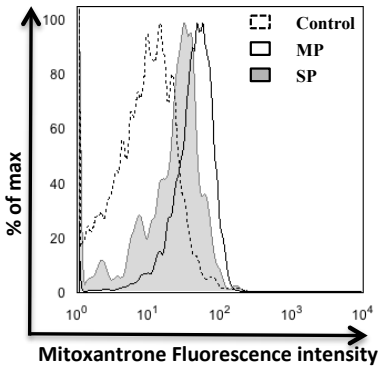


Figure 6: Co-culture of AML cells on MSCs promotes SP phenotype acquisition in a ß1-integrin dependent manner

(A) Flow cytometry quantification of SP fraction observed in PBMC from 6 AML patients, before culture (INI), after 4 days of co-culture with (MSC) or without (Control) MSC. Analyses were gated on blast cells based on $SSC^{Low}CD45^{Low}$ phenotype after dead cell exclusion. The AML cytogenetic and molecular characteristics are presented for each patient (NK = normal karyotype, MK = monosomal karyotype, UPN = unique patient number, ELN = European Leukemia Net, NPM1= Nucleophosmin1, ITD = Internal Tandem Duplication).

(B) Evaluation of SP cell percentage in gated AML blasts after co-culture of UPN15 PBMCs with MSC (4.7% +/- 0.7%), with MSC after incubation of blasts cells with an anti-ß1 antibody (0.8% +/- 0.5%) or without MSC as control (0.01% +/- 0.01%).

Cytograms are from one representative experiment and histogram shows the mean percentage of SP cells from 3 independent experiments.

(C) The Mitoxantrone efflux capability SP and MP fractions obtained after UPN15 blast co-culture with MSC was evaluated by flow cytometry. The Mitoxantrone fluorescence intensity is shown for blast SP cells, blast MP cells and control respectively in shaded solid line, solid line and dashed line.

* indicates p-value < 0.05; ** indicates p-value < 0.01.

DISCUSSION

Adult hematopoiesis is orchestrated by interactions between HSPCs and stromal cells within BM niches. SP functionality is a major characteristic of HSPCs and is related to their quiescence and resistance to drugs and environmental stresses. At steady state, SP cells mainly exist in BM but their presence in non-mobilized PB is controversial since differentiated circulating cells can also express SP phenotype[17,20,38,39]. This discrepancy between BM and PB suggests a specific regulation of SP functionality that could be stroma-mediated. Whereas the role of osteoblasts in maintaining HSPC quiescence related to SP phenotype has been demonstrated in mice[5,6], the dynamic effect of stroma in regulating SP functionality is still not understood.

Our present study in human demonstrates that the SP functionality could be induced in circulating lin^- cells after nesting on BM MSCs and that this stroma-inducible SP fraction contains HSPCs. The presence of SP cells in PBlin^- cells after co-culture on stroma likely results from an acquisition/reactivation of SP functionality rather than from the survival/expansion of pre-existing SP cells and is VLA-4 and CD44 dependent. A similar SP promoting effect of MSC nesting was also demonstrated in circulating blasts from AML patients suggesting that SP functionality, and therefore chemotherapy efflux, could be modulated by targeting stroma interactions.

Authenticity of SP cells evidenced in lin^-PB cells after MSCs co-culture was ascertained by abolition of the SP phenotype in response to ABC-transporter inhibitors and by their capability to efflux Mitoxantrone. These MSC-induced SP cells were not mature cells since they expressed low level of CD3/CD56/CD19/CD10/CD15/CD36 differentiation markers[14,17,19,20]. In contrast, MSC-induced SP cells exhibited phenotypic, molecular, and functional properties of HSPCs, suggesting that adhesion to stroma is capable to activate their SP functionality. When compared to MP cells, the SP fraction (i) contained a higher percentage of $CD34^+$ cells and of quiescent $CD34^+$ cells, (ii) exhibited a greater clonogenic and proliferative potential, a higher stemness gene expression and a better capacity to *in vitro* migrate according to a CXCL12 gradient and to *in vivo* engraft in mice. Whereas the percentage of huCD45 chimerism was low, all injected mice were engrafted 12 weeks after injection and the percentage of engraftment of sorted SP cells after MSC co-culture was higher than that of BM$CD34^+$ cells. The reason for this greater engraftment is not yet understood. It could be suggested that the increased expression of VLA-4 and CXCR4, two

key molecules involved in HSPC nesting[40,41], observed on MSC-induced SP cells, likely participate in this process. Recent studies have shown that quiescent HSCs exhibit higher engraftment potential when transplanted into recipient mice[42,43]. Our results, demonstrating that a higher proportion of MSC-nested SP cells are quiescent and capable of migrating in response to CXCL12 as compared to the MP fraction, are in agreement with those from Jing *et al.*[44] and suggest that this may participate in their better *in vivo* engraftment.

After a 4-day co-culture on stroma, the percentage of SP cells in lin^-PB cells was 240-fold increased. This could result from either a selection/amplification of rare preexisting SP cells after MSC nesting or an acquisition of SP functionality in a fraction of HSPCs. Our results showing that $CD34^+$SP cells are quiescent and that the total number of SP cells is 40-fold increased as compared to the 2-fold reduction of the $CD34^+$ cell number strongly suggest that SP functionality is *de novo* induced in HSPCs through interactions with stroma. These interactions require cell contacts since SP-promoting effect of MSCs is abolished in transwell assay; contacts must be tight since only nested cells acquire the SP phenotype. There is also a need for MSC secretions and especially of Ang-1 and CXCL12 as emphasized by our experiments showing that glutaraldehyde metabolic inactivation prevented SP functionality acquisition. Other cytokines such as hepatocyte growth factor, SCF, IL-6, IL-8, osteopontin and osteoprotegerin secreted in our MSC cultures (data not shown) could also participate in this process. Whereas a recent study of Brunet de la Grange *et al.*[18] showed that high concentrations of proliferative cytokines increased the number of SP cells in a 7-day stroma-free culture, our results demonstrated that a contact as short as 2 days with MSCs is sufficient to induce/reactivate the SP functionality of a fraction of circulating HSPCs.

The intimate mechanism of the SP functionality promoting effect of MSCs is still unknown. In contrast to Arai's studies in mouse, the MSC-induced SP phenotype acquisition we observed in our human model did not depend on Tie2/ang1 and MPL/Tpo axis[5,6]. Actually, Tie2 and MPL receptors are weakly expressed on $CD34^+lin^-$ cells and neutralizing anti-MPL or anti-Tie2 antibodies did not abrogate the SP functionality acquisition. Interactions between HSPCs and stromal cells are dependent of molecules including integrins such as VLA-4, VLA-5, VCAM-1, fibronectin and ECM[45]. Furthermore, VLA-4 and CD44 are known to cooperate in HSPC adhesion to ECM[46]. Our results demonstrating that (i) CD49d/α4 and CD29/ß1 expression was increased after MSC co-culture and (ii) addition of neutralizing antibodies against α4 and ß1-integrins, CD44, as well as of soluble VCAM-1 used as a

"decoy" receptor, reduced the number of SP cells, highlight their role as key actors in the MSC-induced SP functionality acquisition/reactivation. It has been reported that VLA-4 could be activated by G-protein coupled receptors such as CD44[47] or CXCR4[41] and could transduce outside-in signaling through Src-kinases[48]. In our study, as inhibition of CXCR4 does not block the SP promoting effect of MSCs, it is likely that CD44 plays a major role in this process. The inhibitory effect of the pertussis toxin on MSC-induced SP phenotype also strongly suggests the involvement of G-proteins. The downstream participation of the Src-kinase pathway was further demonstrated by the increased phosphorylation level of Src in SP cells as compared to MP cells and by our results showing that addition of Src-inhibitor1 abrogated the SP functionality promoting effect of MSCs. Therefore, it is likely that MSC nesting activates ABC-transporters through VLA-4 and CD44 cooperation. A direct role of CD44 in the stabilization of ABC-transporters at the membrane has been demonstrated in tumor cells[49]. In HSPCs, such a mechanism would also participate in ABC-transporter activation resulting in the (re)acquisition of SP functionality after CD44/stroma interactions.

Interestingly, a $CD34^{+}CD44^{-/low}$ population appeared in the SP fraction after MSC co-culture. These $SP^{+}CD34^{+}CD44^{-/low}$ cells expressed neither CD19 nor CD10 antigens; therefore, they likely did not correspond to the pre-apoptotic B lymphocyte described by Deguchi *et al.*[50]. This population exhibited more intense Hoechst efflux capability, contained a higher proportion of G_0 cells and expressed higher $\alpha4/\alpha5$ integrin levels than $SP^{+}CD34^{+}CD44^{high}$ or MP cells. Hoechst efflux intensity is a marker of quiescence and of stem cell properties[51], so it could be suggested that $SP^{+}CD34^{+}CD44^{-/low}$ cells corresponded to more immature SP population. CD44 exist in many isoforms with various glycosylation profiles[52]. So, we could not exclude that the antibody we used did not recognize the isoform revealed in this specific population. It is also possible that a down-regulation of CD44 occurred after stroma adhesion; our data showing that CD44 mRNA expression was decreased in SP cells as compared to MP cells support this hypothesis.

Regarding the role of ABC-transporters in leukemic cell chemo-resistance[53], we demonstrated that circulating AML blasts also could (re)acquire a SP phenotype after MSC nesting. This phenotype was associated with an increased mitoxantrone efflux that likely results in a higher chemo-resistance. Similarly to lin^{-}PB cells, this process is ß1-integrin dependent. Therefore in AML, adhesion to stroma could extrinsically regulate ABC-transporter activity in a integrin-dependent manner. Our results are in agreement with other showing that VLA-4 dependent

interactions with stroma protect leukemic cells from chemotherapy, and suggest that SP/drug efflux functionality induction could participate in these mechanisms[25,27].

In conclusion, we demonstrate here that SP functionality of human HSPCs is a dynamic and versatile phenomenon that could be regulated by BM MSC interactions through VLA-4 and CD44. Altogether our results highlight the role of stroma on normal and leukemic stem/progenitor cell drug efflux and open new lights on the possibility to interfere on their resistance to environmental stresses and drugs.

Acknowledgments

We are indebted to Dr Massard (Jean Julliard Army Blood Transfusion Center, Clamart, France) and to Dr Konopacki (Service of Hematology, HIA Percy, Clamart, France) for supplying blood and bone marrow samples from healthy donors and AML patients.

This work was supported by grants from LNCC (Ligue Nationale Contre le Cancer; N°EL2010.LNCC/MCLBK), NRB association (association Nouvelles Recherches Biomédicales) and DGA (Délégation Générale pour l'Armement).

Authors Contributions

Jean-Valère Malfuson: Provision of study material, Conception and design, Collection and/or assembly of data, Data analysis and interpretation, Manuscript writing, Final approval of manuscript.

Laetitia Boutin: Technical support for all experiments including SP determination and characterisation, Collection and/or assembly of data, Data analysis and interpretation.

Denis Clay: Collection and/or assembly of flow cytometry data including SP determination, Data analysis and interpretation.

Cédric Thépenier: Technical support for some experiments, participation to scientific discussions.

Christophe Desterke: Molecular data analysis and interpretation, Technical support for in vitro migration assay and Src-kinase phosphorylation level determination.

Frederic Torossian: In charge of NSG mice engraftment.

Adrienne Anginot: In charge of NSG mice engraftment; participation to gluteraldehyde experiments and to MSC-derived osteoblastic differentiation; participation to scientific discussions and final approval of manuscript.

Bernadette Guerton: Technical support for hematopoietic cell cultures.

Thierry de Revel: Provision of study material, participation to scientific discussions.

Jean-Jacques Lataillade: Conception and design, Data analysis and interpretation, Manuscript writing, Final approval of manuscript.

Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès: Conception and design, Data analysis and interpretation, Manuscript writing, Final approval of manuscript.

Author disclosure of interest

Authors do not declare any conflicting financial interest.

SUPPLEMENTAL

SUPPLEMENTAL MATERIALS AND METHODS

Phenotypic analysis and SP detection*:* Hoechst33342 was exited at 350nm, and fluorescence was measured with a 450DF20BP-filter (Hoechst-blue) and a 675DF20BP-filter (Hoechst-red). A 610SP dichroic mirror was used to separate the emission wavelengths. For phenotypic analyses, PE or Pyronin-Y was excited at 488nm and emission was detected at 575nm; APC was excited at 633nm and emission was detected at 670nm; FITC was excited at 488nm and emission was detected at 525nm. Cells were analyzed according to Hoechst-blue versus Hoechst-red fluorescence. A gate was placed to select low Hoechst SP-cells; the main population (MP) fraction was gated on non-SP cell fraction expressing high Hoechst fluorescence (Figure S2). SP and MP fractions were sorted and immunophenotyped using antibody combinations. Concomitant CD45 staining coupled with FSC-SSC gating allowed us to drive out a MSC contamination in the hematopoietic fraction (Figure S2). AML blast cells were gated using CD45/SSC combination.

Molecular profile analysis: Quantitative PCR was performed using an intercalating fluorescent substrate (Brillant-II-SYBR-Green QPCR-MasterMix, Agilent Technologies). Ten picomole of each specific primer and 2µl of cDNA were mixed to a final PCR reaction volume of 20µl. Amplification cycles (n=50) were performed on a Stratagene MXPRO-3005P (annealing temperature, 60°C). Data were normalized on the *TBP* (TATA Box binding protein) housekeeping gene by a relative quantification based on the 2ΔΔCT method.

SUPPLEMENTAL TABLES

Table S1: Neutralizing antibodies used

Antibody/Inhibitor	Manufacturer	Clone	Concentration (µg/ml)
Anti-CD44	Progen	DF1485	1
Anti-CD49d (α4)	R&DSystems	2B4	20
Anti-CD29 (β1)	BD Biosciences	Mab13	1
Anti-CD61 (β3)	R&DSystems	23C6	10
Anti-CXCR4	R&DSystems	12G5	10
Anti-CXCL12	R&DSystems	79014	20
Anti-Tie2	R&DSystems	Polyclonal/AF313	30
Anti-MPL	R&DSystems	Polyclonal/AF1016	10
Control IgG1	R&DSystems	11711	1
Control IgG2a	BD Biosciences	R-3595	1
AMD3100	Genzyme	NA	0.5
RhVCAM(*)	R&DSystems	NA	10

* RhVCAM was used as soluble "decoy" receptor

NA = Non Applicable

Table S2: Antibodies used for phenotypic analysis

Fluorochrome	Target of antibodies (clone)	Manufacturer
Fluorescein isothiocyanate	CD3 (UCHT1), CD10 (Alb2), CD11b (Bear1), CD15 (80H5), CD29 (K20), CD34 (581), CD36 (FA6.152), CD45 (J.33) CD49e (SAM1), CD61 (SZ21), CD90 (F15-42-1-5), IgG1 (679.1Mc7), HLADR (B8.12.2)	Beckman Coulter
	CD18 (6.7), CD44 (G44-26), CD49f (GoH3)	Becton Dickinson
	CXCR4 (12G5)	R&D systems
Phycoerythrin	CD11a (25.3), CD11c (BU15), CD19 (J3-119), CD45 (J.33), CD56 (N901), CD90 (F15-42-1-5), CD105 (1G2), IgG1 (679.1Mc7)	Beckman Coulter
	CD44 (G44-26), CD49d (12F1), CD73 (AD2), MPL (1.6.1), CXCR4 (12G5)	Becton Dickinson
	Tie-2 (83715), Alkaline Phosphatase (B4-78)	R&D systems
	MoCD45 (30F11)	BDPharmingen
Allophycocyanin	CD34 (581), CD49d (HP2/1)	Beckman Coulter
	CD44 (G44-26)	Becton Dickinson
APC-efluor780	HuCD45 (2D1)	Ebioscience

Table S3: Primers used for gene expression analyses

gene name	amplifiat size (mers)	NM sequence identifier	foward-reverse	position on sequence from 5'	length (mers)	sequence	Tm (°C)
CXCR4	133	NM_003467.2	foward	976	21	ACTgTTgTCTgAACCCCATCC	61,2
			reverse	1108	20	gAATgTCCACCTCgCTTTCC	61,94
MPL	131	NM_005373.2	foward	193	21	TgCTTCTgggATgAggAAgAg	61,81
			reverse	323	21	CACACgTATCgggTTCCAAAg	62,57
TIE2	150	NM_000459.3	foward	292	21	CTgCTTCTgTgCTgTTCCTTC	60,19
			reverse	441	21	CTTCCCCAAATCTCTCCATCC	62,04
ROBO4	127	NM_019055.5	foward	3625	21	AACTCTCTCCCAACCTCACCA	61,07
			reverse	3751	21	TACCTCCCTTCCTTCAgCATC	60,58
ITGB3	138	NM_000212.2	foward	3370	21	CTCATCCATAgCACCTCCACA	61,07
			reverse	3507	21	gCACTTATTCCCAgCCAACTC	61
ITGB1	91	NM_033668.2	foward	1340	21	CTCTgggCTTTACggAggAAg	62,44
			reverse	1430	21	CACTTgggACTTTCAgggATg	61,84
CDH2	98	NM_001792.3	foward	2512	20	TCgggTAATCCTCCCAAATC	61,01
			reverse	2609	20	CCCACAATCCTgTCCACATC	61,21
CD44	129	NM_001202555.1	foward	3316	23	TCAgACCACAAAgCAgAAAgAAg	60,94
			reverse	3444	21	gAgCAgAggCTgggAATAgTg	61,29
GATA2	145	NM_032638.4	foward	2135	21	AggACTTggAgACTTggTggT	60,02
			reverse	2279	21	TTTCAgAgAgggAAgCCAgAg	61,01
NOTCH1	136	NM_017617.3	foward	5695	20	AACAgCgAggAAgAggAggA	61,44
			reverse	5830	20	CggCATCAgAgCgTgAgTAg	62,09
POU5F1 (OCT4)	116	NM_001173531.1	foward	948	20	gTCACCACTCTgggCTCTCC	62,24
			reverse	1063	20	AAACCCTggCACAAACTCCA	62,77
RUNX1	86	NM_001122607.1	foward	625	21	AACTCCCAACAAACCAgAggA	60,9
			reverse	710	21	gggTTCTACAgCTCTCCCACA	61,59
TBP	158	NM_001172085.1	foward	1181	22	TggTgTTgTgAgAAgATggATg	62,63
			reverse	1338	22	CCAgATAgCAgCACggTATgAg	64,86

SUPPLEMENTAL FIGURES

Figure S1: Immunophenotypic confirmation of the MSCs preparations

The three MSC preparations used for the study were tested for their MSC surface phenotype. Monoparametric cytograms of a representative experiment among three show that MSCs were $CD45^-$, $CD34^-$, HLA-DR^-, $CD105^+$, $CD73^+$, $CD90^+$.

Figure S1: Immunophenotypic confirmation of the MSCs preparations

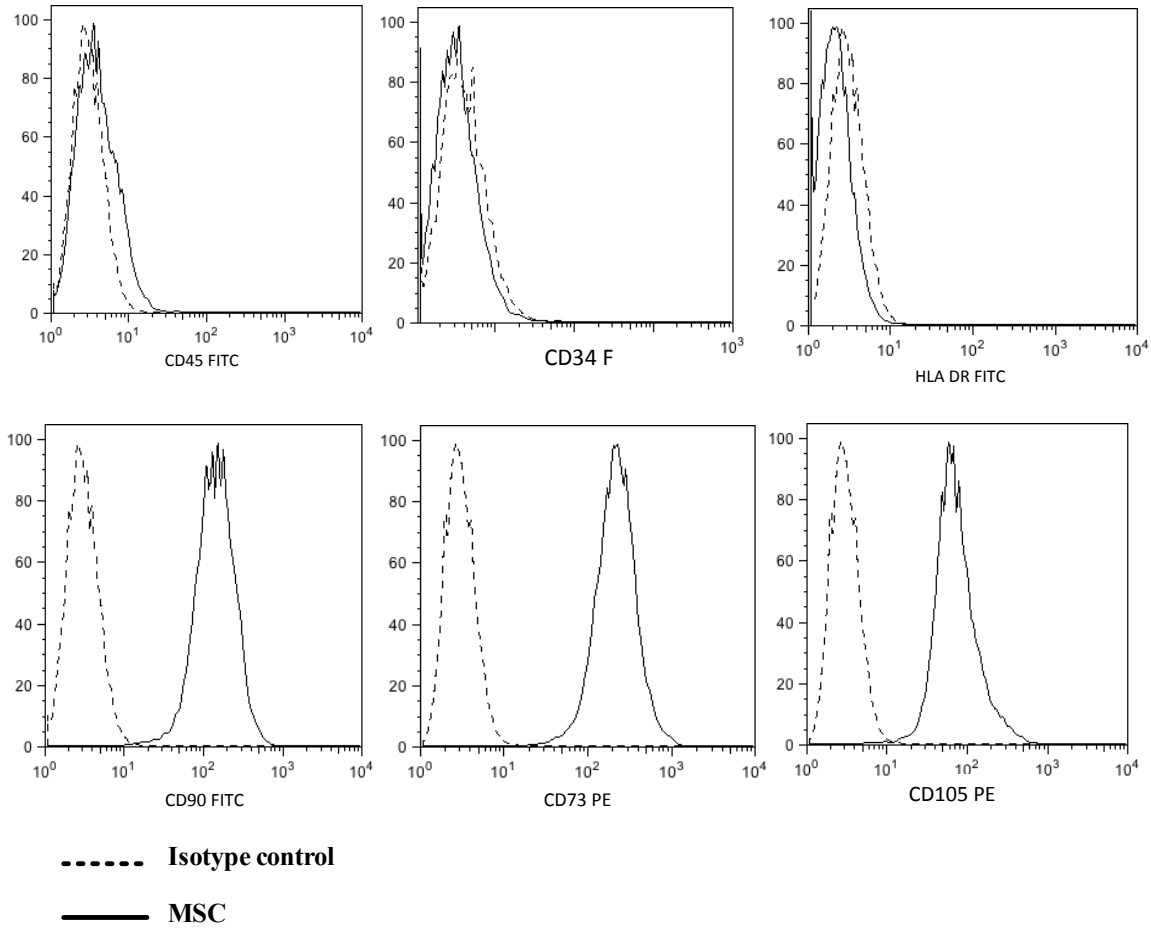


Figure S2: Identification of SP cells by flow cytometry

Gate R1 was drown to eliminate debris on a SSC *vs.* FSC cytogram (a); Gate R2 selected living cells on a SSC *vs.* 7AAD cytogram (b); Gate R3 selected hematopoietic cells on a SSC *vs.* CD45 cytogram, and showed that most of the living cells are $CD45^+$ (c); Gates R4 and R5 selected SP and MP cells respectively on a blue Hoechst *vs.* red Hoechst cytogram (d). Cytogram e summarizes the same procedure in the presence of verapamil; this cytogram defines the upper limit of the R4 gate.

Figure S2: Gating method used to identify SP cells

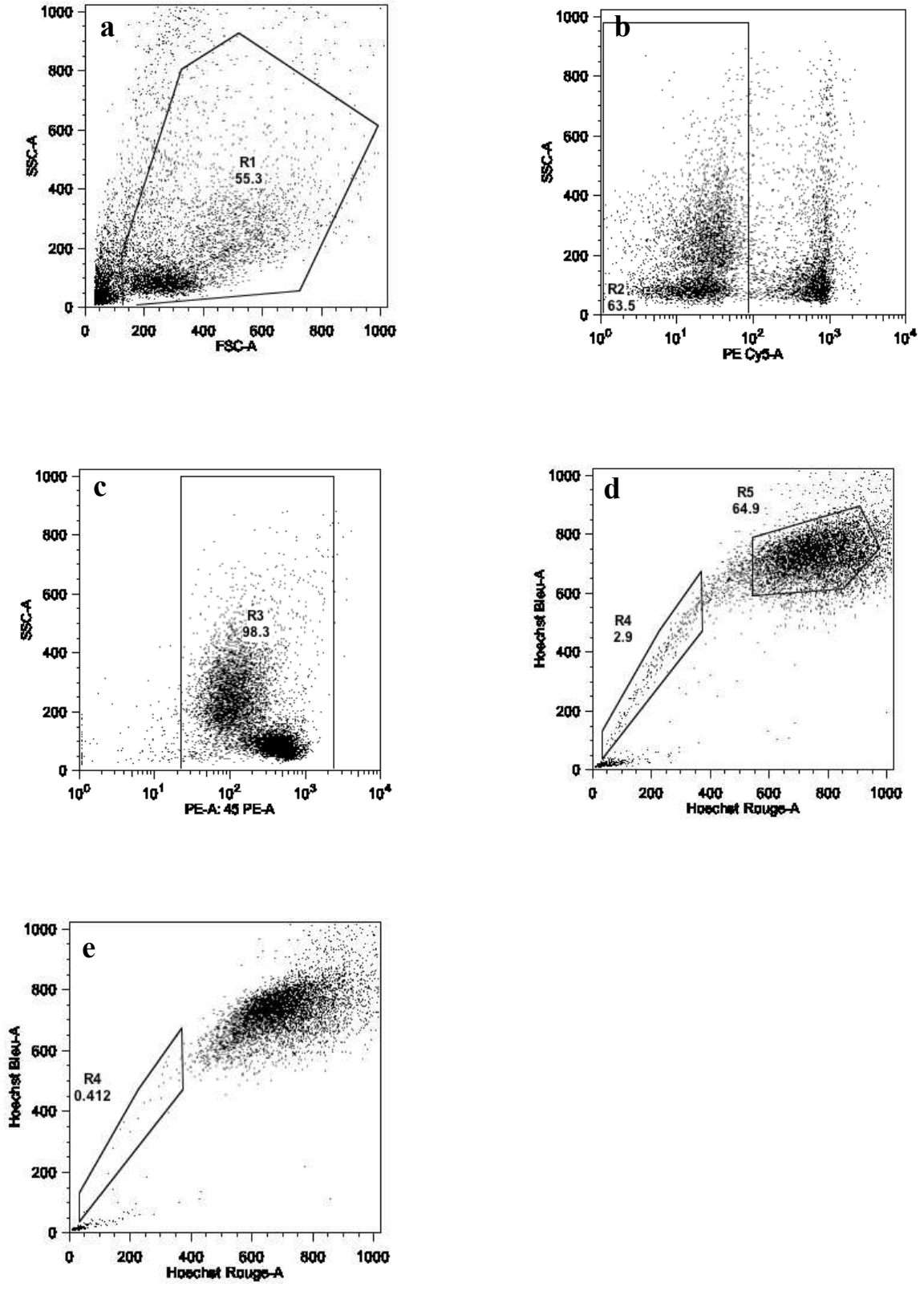
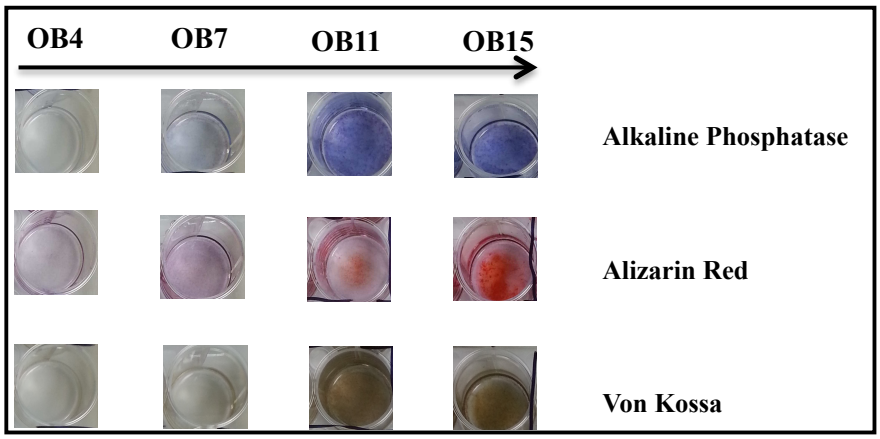


Figure S3: Evaluation of the differentiation kinetic of MSC-derived osteoblasts

Evaluation of alkaline phosphatase, alizarin red expression and Von Kossa coloration through osteoblastic differentiation, on days 4-7-11-15. Results of one representative experiment among three are presented.

Figure S3: Evaluation of the differentiation kinetic of MSC-derived osteoblasts



REFERENCES

1. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(2):93-106.

2. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829-834.

3. Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K, et al. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity*. 2010;33(3):387-399.

4. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. 2003;425(6960):836-841.

5. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 2004;118(2):149-161.

6. Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Takubo K, Nakamura Y, et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell*. 2007;1(6):685-697.

7. Umemoto T, Yamato M, Shiratsuchi Y, Terasawa M, Yang J, Nishida K, et al. Expression of Integrin beta3 is correlated to the properties of quiescent hemopoietic stem cells possessing the side population phenotype. *J Immunol*. 2006;177(11):7733-7739.

8. Umemoto T, Yamato M, Ishihara J, Shiratsuchi Y, Utsumi M, Morita Y, et al. Integrin-alphavbeta3 regulates thrombopoietin-mediated maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood*. 2012;119(1):83-94.

9. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*. 1996;183(4):1797-1806.

10. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med*. 2001;7(9):1028-1034.

11. Zhou S, Morris JJ, Barnes Y, Lan L, Schuetz JD, Sorrentino BP. Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(19):12339-12344.

12. Challen GA, Little MH. A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells*. 2006;24(1):3-12.

13. Hosokawa K, Arai F, Yoshihara H, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, et al. Function of oxidative stress in the regulation of hematopoietic stem cell-niche interaction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;363(3):578-583.

14. Uchida N, Fujisaki T, Eaves AC, Eaves CJ. Transplantable hematopoietic stem cells in human fetal liver have a CD34(+) side population (SP)phenotype. *J Clin Invest*. 2001;108(7):1071-1077.

15. Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med*. 1997;3(12):1337-1345.

16. Guo Y, Follo M, Geiger K, Lubbert M, Engelhardt M. Side-population cells from different precursor compartments. *J Hematother Stem Cell Res*. 2003;12(1):71-82.

17. Preffer FI, Dombkowski D, Sykes M, Scadden D, Yang YG. Lineage-negative side-population (SP) cells with restricted hematopoietic capacity circulate in normal human adult blood: immunophenotypic and functional characterization. *Stem Cells*. 2002;20(5):417-427.

18. Brunet de la Grange P, Vlaski M, Duchez P, Chevaleyre J, Lapostolle V, Boiron JM, et al. Long-term repopulating hematopoietic stem cells and "side population" in human steady state peripheral blood. *Stem Cell Res*. 2013;11(1):625-633.

19. Storms RW, Goodell MA, Fisher A, Mulligan RC, Smith C. Hoechst dye efflux reveals a novel CD7(+)CD34(-) lymphoid progenitor in human umbilical cord blood. *Blood*. 2000;96(6):2125-2133.

20. Naylor CS, Jaworska E, Branson K, Embleton MJ, Chopra R. Side population/ABCG2-positive cells represent a heterogeneous group of

haemopoietic cells: implications for the use of adult stem cells in transplantation and plasticity protocols. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35(4):353-360.

21. Wulf GG, Wang RY, Kuehnle I, Weidner D, Marini F, Brenner MK, et al. A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001;98(4):1166-1173.

22. Moserle L, Ghisi M, Amadori A, Indraccolo S. Side population and cancer stem cells: therapeutic implications. *Cancer Lett*. 2010;288(1):1-9.

23. Gross E, L'Faqihi-Olive FE, Ysebaert L, Brassac M, Struski S, Kheirallah S, et al. B-chronic lymphocytic leukemia chemoresistance involves innate and acquired leukemic side population cells. *Leukemia*. 2010;24(11):1885-1892.

24. Becker PS. Dependence of acute myeloid leukemia on adhesion within the bone marrow microenvironment. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:856467.

25. Matsunaga T, Fukai F, Miura S, Nakane Y, Owaki T, Kodama H, et al. Combination therapy of an anticancer drug with the FNIII14 peptide of fibronectin effectively overcomes cell adhesion-mediated drug resistance of acute myelogenous leukemia. *Leukemia*. 2008;22(2):353-360.

26. Konopleva M, Konoplev S, Hu W, Zaritskey AY, Afanasiev BV, Andreeff M. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia*. 2002;16(9):1713-1724.

27. Matsunaga T, Takemoto N, Sato T, Takimoto R, Tanaka I, Fujimi A, et al. Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat Med*. 2003;9(9):1158-1165.

28. Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med*. 2006;12(10):1167-1174.

29. Shiozawa Y, Havens AM, Pienta KJ, Taichman RS. The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites. *Leukemia*. 2008;22(5):941-950.

30. Lataillade JJ, Clay D, Bourin P, Herodin F, Dupuy C, Jasmin C, et al. Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G(0)/G(1) transition in CD34(+) cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism. *Blood*. 2002;99(4):1117-1129.

31. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X, et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol*. 2005;205(2):228-236.

32. Hurley RW, McCarthy JB, Verfaillie CM. Direct adhesion to bone marrow stroma via fibronectin receptors inhibits hematopoietic progenitor proliferation. *J Clin Invest*. 1995;96(1):511-519.

33. Golebiewska A, Brons NH, Bjerkvig R, Niclou SP. Critical appraisal of the side population assay in stem cell and cancer stem cell research. *Cell Stem Cell*. 2011;8(2):136-147.

34. Pierre-Louis O, Clay D, Brunet de la Grange P, Blazsek I, Desterke C, Guerton B, et al. Dual SP/ALDH functionalities refine the human hematopoietic Lin-CD34+CD38- stem/progenitor cell compartment. *Stem Cells*. 2009;27(10):2552-2562.

35. Mo W, Zhang JT. Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *Int J Biochem Mol Biol*. 2012;3(1):1-27.

36. Shapiro HM. Flow cytometric estimation of DNA and RNA content in intact cells stained with Hoechst 33342 and pyronin Y. *Cytometry*. 1981;2(3):143-150.

37. Winkler IG, Pettit AR, Raggatt LJ, Jacobsen RN, Forristal CE, Barbier V, et al. Hematopoietic stem cell mobilizing agents G-CSF, cyclophosphamide or AMD3100 have distinct mechanisms of action on bone marrow HSC niches and bone formation. *Leukemia*. 2012;26(7):1594-1601.

38. Wardyn GG, Rennard SI, Brusnahan SK, McGuire TR, Carlson ML, Smith LM, et al. Effects of exercise on hematological parameters, circulating side population cells, and cytokines. *Exp Hematol*. 2008;36(2):216-223.

39. Brusnahan SK, McGuire TR, Jackson JD, Lane JT, Garvin KL, O'Kane BJ, et al. Human blood and marrow side population stem cell and Stro-1 positive bone marrow stromal cell numbers decline with age, with an increase in quality of surviving stem cells: correlation with cytokines. *Mech Ageing Dev*. 2010;131(11-12):718-722.

40. Papayannopoulou T, Craddock C, Nakamoto B, Priestley GV, Wolf NS. 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*. 1995;92(21):9647-9651.

41. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science*. 1999;283(5403):845-848.

42. Jetmore A, Plett PA, Tong X, Wolber FM, Breese R, Abonour R, et al. Homing efficiency, cell cycle kinetics, and survival of quiescent and cycling human CD34(+) cells transplanted into conditioned NOD/SCID recipients. *Blood*. 2002;99(5):1585-1593.

43. Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, Hangoc G, Cooper S, Plett PA, et al. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med*. 2005;201(8):1307-1318.

44. Jing D, Fonseca AV, Alakel N, Fierro FA, Muller K, Bornhauser M, et al. Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells--modeling the niche compartments in vitro. *Haematologica*. 2010;95(4):542-550.

45. Teixido J, Hemler ME, Greenberger JS, Anklesaria P. Role of beta 1 and beta 2 integrins in the adhesion of human CD34hi stem cells to bone marrow stroma. *J Clin Invest*. 1992;90(2):358-367.

46. Verfaillie CM, Benis A, Iida J, McGlave PB, McCarthy JB. Adhesion of committed human hematopoietic progenitors to synthetic peptides from the C-terminal heparin-binding domain of fibronectin: cooperation between the integrin alpha 4 beta 1 and the CD44 adhesion receptor. *Blood*. 1994;84(6):1802-1811.

47. Thankamony SP, Sackstein R. Enforced hematopoietic cell E- and L-selectin ligand (HCELL) expression primes transendothelial migration of human mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(6):2258-2263.

48. Harburger DS, Calderwood DA. Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt 2):159-163.

49. Toole BP, Slomiany MG. Hyaluronan, CD44 and Emmprin: partners in cancer cell chemoresistance. *Drug Resist Updat*. 2008;11(3):110-121.

50. Deguchi T, Komada Y, Sugiyama K, Zhang XL, Azuma E, Yamamoto H, et al. Expression of homing-associated cell adhesion molecule (H-CAM/CD44) on human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*. 1999;27(3):542-552.

51. Challen GA, Boles NC, Chambers SM, Goodell MA. Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1. *Cell Stem Cell*. 2010;6(3):265-278.

52. Ghaffari S, Smadja-Joffe F, Oostendorp R, Levesque JP, Dougherty G, Eaves A, et al. CD44 isoforms in normal and leukemic hematopoiesis. *Exp Hematol*. 1999;27(6):978-993.

53. Steinbach D, Sell W, Voigt A, Hermann J, Zintl F, Sauerbrey A. BCRP gene expression is associated with a poor response to remission induction therapy in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2002;16(8):1443-1447.

DISCUSSION

L'ensemble de mes travaux a permis de démontrer que 1) la fonctionnalité SP est un phénomène dynamique et inductible dans les PH circulants les plus immatures ne l'exprimant pas initialement, par l'adhésion au stroma médullaire et 2) ce mécanisme implique VLA-4 et CD44. L'étude des blastes circulants de LAM est en faveur de l'existence d'un mécanisme de régulation du phénotype SP similaire à celui observé pour les CSPH du sang circulant de sujets sains.

Plusieurs éléments, fondamentaux pour certains, potentiellement d'application clinique pour d'autres, peuvent être discutés à partir de ces résultats:

1- Que représente la fonctionnalité SP dans l'hématopoïèse humaine ?
2- Par quels mécanismes le stroma médullaire contrôle-t-il la fonctionnalité SP chez l'homme ?
3- Le rôle des CSM dans la régulation de la fonctionnalité SP est-il un élément indirect en faveur de l'existence d'une niche mésenchymateuse ?
4- Un « priming » par les CSM pourrait-il améliorer la prise de greffe hématopoïétique ?
5- L'activation des ABC transporteurs par la niche mésenchymateuse est-elle un nouveau mécanisme de CAM-DR à prendre en compte en thérapeutique ?

1- Que représente la fonctionnalité SP dans l'hématopoïèse humaine ?

Nous avons vu dans l'introduction de cette thèse que la fonctionnalité SP était un excellent moyen pour purifier les CSH murines mais que la valeur de ce marqueur vis à vis des CSH humaines reste débattue. En effet, il a été décrit que, d'une part, des cellules différenciées comme les lymphocytes, les cellules NK et les érythroblastes exprimaient la fonctionnalité SP, et, d'autre part, le marqueur CD34 reste actuellement le marqueur le plus robuste pour caractériser les CSPH humains. La fonctionnalité SP permet malgré tout, chez l'homme, de sélectionner les cellules les plus immatures au sein de populations déjà enrichies en CSPH (population $CD34^+CD38^-$ par exemple). Nos résultats apportent des éléments sur la nature des cellules SP circulantes. En effet, plusieurs auteurs ont décrit la présence de cellules SP dans le sang périphérique non mobilisé. Ils ont pour la plupart travaillé à partir de cellules mononucléées (CMN) ou réalisé des déplétions Lin^- incomplètes ce qui explique vraisemblablement leurs résultats (*Preffer et al. 2002; Wardyn et al. 2008; Brusnahan et al. 2010*). En utilisant un protocole de déplétion lin^- plus complet après une sélection des CMN, à l'instar de Naylor *et al.*(*Naylor et al. 2005*), nous ne retrouvons pas ou extrêmement peu de cellules SP circulantes.

Nos résultats apportent également des informations sur la nature et la versatilité de la fonctionnalité SP qui pourrait être le témoin du statut circulant *vs.*niché des CSPH. En effet, si chez la souris, le groupe d'Arai a bien identifié les cellules SP comme quiescentes au contact de la niche endostéale, avec une perte de la fonctionnalité SP lors de la mobilisation, nos travaux montrent, chez l'homme, que ce phénomène est vraisemblablement réversible. Nous mettons en effet en évidence que, au sein d'une population de CSPH de sang périphérique, le « nichage » permet à certains d'entre eux d'acquérir une fonctionnalité SP. De plus, les cellules qui acquièrent cette fonctionnalité (cellules SP) sont plus quiescentes, plus immatures, ont une plus grande capacité de migration en réponse à CXCL12 et une plus grande capacité de greffe à long terme (LT-SRC) que les cellules qui ne l'acquièrent pas (cellules MP). En parallèle, nos résultats à partir des co-cultures de PH lin^- de moelle osseuse montrent que le stroma permet de maintenir le « pool » de cellules SP de ce compartiment hématopoïétique sans pour autant l'augmenter. Il apparaît donc qu'il existe dans ces deux compartiments (sang et MO) une fraction de CSPH immatures capables d'exprimer une fonctionnalité SP. Dans la moelle, les PH étant au contact du stroma, cette fonctionnalité SP est spontanément exprimée. Dans le sang périphérique, cette fonctionnalité SP serait révélée par le « nichage » sur des CSM. Il est possible que les cellules de sang périphérique capables

d'acquérir la fonctionnalité SP correspondent, en partie, aux CSPH en cours de mobilisation physiologique (Figure 16). Nous réfléchissons actuellement au meilleur moyen de vérifier cette hypothèse *in vivo*. Pour cela, nous allons greffer des souris NSG, en intra-fémoral, avec une grande quantité de PH lin$^-$ de sang circulant. Ces souris seront sacrifiées précocement (J2-4) afin de rechercher des cellules SP humaines intra-médullaires ou intra-spléniques. La mise en évidence de cellules SP à partir de ces PH circulants greffés validerait notre hypothèse *in vivo*.

Parmi les cellules SP révélées par les co-cultures de PH lin$^-$ circulants sur CSM, la sous-population SP CD34$^+$CD44$^{-/faible}$ pourrait correspondre à la population circulante la plus immature. La présence de cette sous-population, qui n'apparaît qu'en présence de CSM, est surprenante par rapport au rôle du CD44 dans le processus de homing des CSPH (*Vermeulen et al. 1998*). Elle pourrait s'expliquer de différentes façons. Il est en effet possible que l'anticorps utilisé ne reconnaisse pas un nouvel épitope révélé par l'adhésion mais on ne peut également exclure la possibilité que l'adhésion elle-même provoque une diminution de l'expression membranaire du CD44 comme le montrent nos résultats de biologie moléculaire. L'étude spécifique de cette sous-population est techniquement difficile car elle représente une petite fraction des cellules SP et est donc rare. L'idéal serait d'arriver à trier les cellules SP CD34$^+$CD44$^{-/faible}$ en quantité suffisante pour les étudier *in vitro* (pouvoir prolifératif et clonogénique en culture secondaire, expression des gènes « souches ») et *in vivo* (greffe de souris NSG).

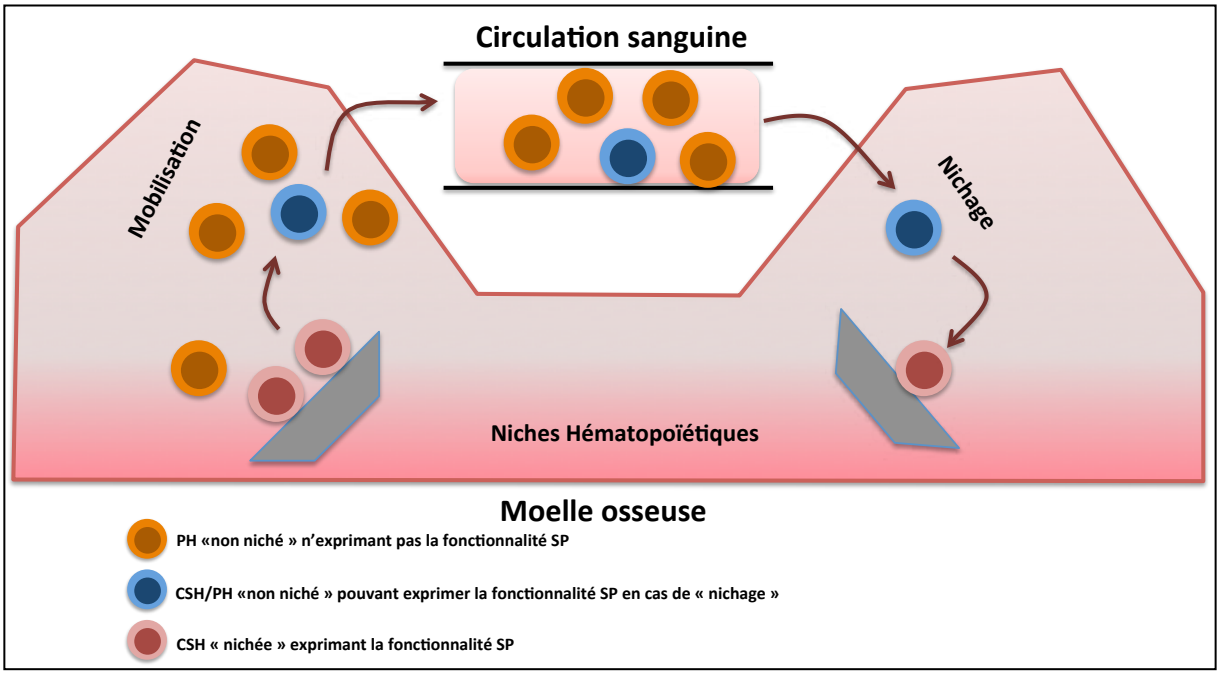


Figure 16 : La fonctionnalité SP, un témoin du statut niché *vs.* circulant des CSPH ?

2- Par quels mécanismes le stroma médullaire contrôle-t-il la fonctionnalité SP chez l'homme ?

Les travaux de l'équipe d'Arai chez la souris ont montré que l'acquisition du phénotype SP par les CSPH était étroitement corrélée à l'activation de Tie2 et Mpl au contact de la niche endostéale. L'activation de ces deux récepteurs a pour conséquence une augmentation de l'adhésion à la niche *via* une « up-régulation » de la N-Cadhérine et de l'intégrine-ß1 (*Arai et al. 2004; Yoshihara et al. 2007*). Nos résultats expérimentaux chez l'homme ne semblent pas en faveur d'une implication de Tie2 et Mpl. En effet, si l'ARNm de Tie2 est plus exprimé dans les cellules SP que dans les MP, il n'y a pas de différence d'expression de Mpl entre les deux populations. De plus, ces deux molécules ne sont quasiment pas exprimées à la surface des PH lin^- avant et après co-culture. Enfin, les anticorps neutralisant Tie2 et/ou Mpl n'ont pas d'effet sur l'acquisition de la fonctionnalité SP après co-culture.

Nos résultats sont par contre en faveur de l'implication de deux molécules d'adhésion clefs du « homing » et du nichage dans l'acquisition de cette fonctionnalité : le VLA-4 et le CD44. En ce qui concerne VLA-4, le blocage par un anticorps neutralisant l'intégrine-ß1 ou l'intégrine-α4 inhibe l'acquisition de la fonctionnalité SP. Ces résultats sont renforcés par l'utilisation du VCAM-1 soluble, comme récepteur « leurre », qui inhibe également l'acquisition de la fonctionnalité SP. Le blocage du CD44 produit également le même effet. Le CD44 étant capable d'activer VLA-4 par l'intermédiaire des protéines G, l'effet inhibiteur de la toxine pertussique nous laisse supposer que l'activation de la fonctionnalité SP pourrait être secondaire à une coopération active entre les deux molécules. Il est possible que le CD44 active VLA-4 avant d'être « down-régulé » comme le suggèrent nos résultats montrant une diminution de l'expression de l'ARNm de CD44 et de la protéine de surface dans les cellules SP. L'activation de VLA-4 permettrait alors une fixation de VCAM-1 et/ou de la fibronectine à la surface des CSM, une adhésion ferme des PH à la niche mésenchymateuse et une activation de la fonctionnalité SP. La transduction du signal par VLA-4 impliquerait des Src-kinases comme le montrent l'effet de leur inhibition pharmacologique ainsi que l'augmentation de phospho-Src intracellulaire dans les PH SP. Il est également possible que VLA-4 et CD44 puissent agir indépendamment sur ABCG2, par exemple en la stabilisant à la membrane comme cela été récemment montré pour le CD44 dans les cellules tumorales (*Toole and Slomiany 2008*). Enfin, d'autres voies de transduction sont vraisemblablement impliquées comme la voie PI3K/AKT (*Mogi et al. 2003; Bleau et al. 2009*) et mériteront d'être étudiées. Nos expériences d'inactivation métabolique des CSM par la glutaraldéhyde

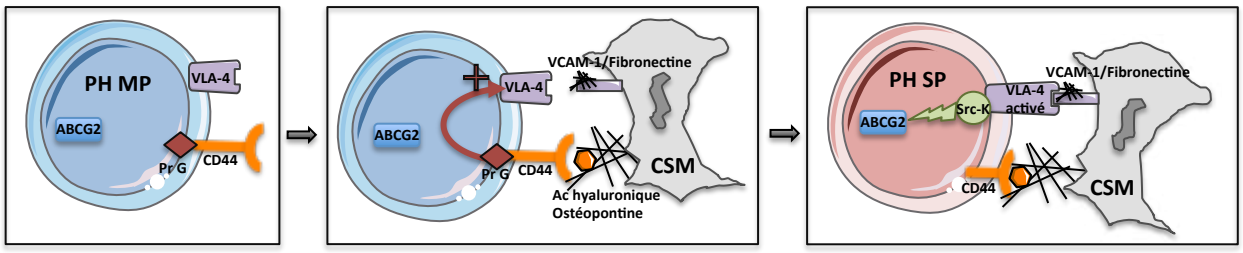
sont de plus en faveur de l'implication de molécules diffusibles sécrétées par le stroma dans l'acquisition de ce phénotype. Nous avons montré que les CSM sécrétaient diverses cytokines capable d'agir sur les CSPH (Ang1, CXCL12, SCF, IL-6, IL-8, osteopontine) mais n'avons pas évalué précisément quelles molécules pouvaient être impliquées. Notons simplement que l'addition d'Angiopoiétine-1 lors des co-cultures CSM/PH lin$^-$ n'augmente pas la fraction SP. Une invalidation sélective des gènes de cytokines cibles, au sein des CSM avant co-culture, pourrait permettre de mieux comprendre lesquelles d'entre elles sont impliquées. Nous avons également réalisé des cultures de PH lin$^-$ de sang circulant sur de la fibronectine ou du VCAM-1 recombinant « coatés » au fond des puits. Ces deux éléments, seuls, ne promeuvent pas l'acquisition du phénotype SP. Ce phénomène est donc dynamique et nécessite vraisemblablement un stroma fonctionnel sur le plan des sécrétions et de l'expression/modulation des molécules de surface.

Enfin, Il est intéressant de noter que, bien que les cellules SP hyper-expriment l'ARNm de CXCR4 et migrent beaucoup mieux en présence d'un gradient de CXCL12 par rapport aux PH MP, le blocage de CXCR4 par un anticorps neutralisant ou son inhibition par l'AMD 3100 ne s'accompagnent pas d'une inhibition de l'acquisition de la fonctionnalité SP.

Dans le but de préciser l'ABC transporteur principalement impliqué dans l'efflux du Hoechst 33342, nous avons étudié l'expression de la protéine ABCG2 en surface par cytométrie, de son ARNm en RQ-PCR. Nous n'avons pas retrouvé d'expression d'ABCG2 en cytométrie, mais il est possible que l'anticorps que nous avons utilisé manque de sensibilité ou de spécificité. Il n'y a pas de différence d'expression de l'ARNm d'ABCG2 entre les PH MP et les PH SP. Toutefois, les tests fonctionnels que nous avons pratiqués montrent que la Fumitrémorgine-C et surtout le Ko-143, inhibiteurs spécifiques d'ABCG2 inhibent l'apparition des cellules SP. Ces résultats sont donc plus en faveur d'une activation d'ABCG2 dans certains PH par le stroma plutôt que de l'induction d'une hyper-expression de la protéine.

Ces résultats nous amènent à proposer une hypothèse de régulation de la fonctionnalité SP des CSPH humains reposant, au contact du stroma, sur l'activation de VLA-4 par CD44 *via* les protéines G, puis une transduction du signal vers ABCG2 impliquant les Src-kinases (figure 17). Cette hypothèse nécessite d'être confirmée par des études mécanistiques plus approfondies (invalidation de CD44 et/ou ß1 par ARN interférence, immunoprécipitations…) actuellement mises en œuvre dans le laboratoire. Au vu des résultats récents de Corselli *et al*., en faveur d'un rôle de la voie Notch dans la régulation des CSPH humains par la niche

mésenchymateuse périvasculaire (*Corselli et al. 2013*), nous prévoyons également d'évaluer l'effet d'inhibiteurs de γ-sécrétase sur l'acquisition du phénotype SP.



1- Le PH immature pénètre dans la moelle osseuse et est dirigé vers la niche mésenchymateuse par le gradient de CXCL12
2- L'engagement du CD44 par ses ligands active VLA-4
3- VLA-4 activé lie fortement VCAM-1 et/ou la fibronectine à la surface des CSM de la niche et active ABCG2 via un signal transduit par des Src kinases

Figure 17 : Modèle de régulation de la fonctionnalité SP par le stroma médullaire humain

3- Le rôle des CSM dans la régulation de la fonctionnalité SP est-il un élément indirect en faveur de l'existence d'une niche mésenchymateuse ?

Les travaux de l'équipe d'Arai ont associé la fonctionnalité SP de la CSH à son adhésion à la niche endostéale (*Arai et al. 2005*). Les niches hématopoïétiques ont longtemps été dichotomisées entre niche endostéale, compartiment de quiescence et éventuellement auto-renouvellement des CSH, et niche vasculaire, compartiment de prolifération/différenciation des CSPH. Des travaux plus récents ont fait naitre l'hypothèse d'une troisième niche, la niche mésenchymateuse, créant le lien entre ces deux niches historiques (*Mendez-Ferrer et al. 2010; Omatsu et al. 2010*). Contrairement aux résultats de l'équipe d'Arai, nos résultats montrent que les ostéoblastes matures n'induisent pas le phénotype SP mais que les CSM engagées vers la voie ostéoblastique, correspondant à des ostéoblastes immatures, sont capables d'induire cette fonctionnalité. Ces éléments renforcent le rôle d'ostéoblastes immatures dans l'organisation de la niche endostéale chez l'homme (*Zhang et al. 2003*). De plus, nous montrons pour la première fois que les CSM non différenciées présentent également cette capacité. Si nous retenons l'acquisition de la fonctionnalité SP par les CSPH comme un marqueur de leur « nichage » et de maintien en quiescence, nos travaux renforcent le rôle d'une niche mésenchymateuse dans la régulation des CSPH. L'implication de la niche mésenchymateuse fait intervenir des contacts cellulaires entre les CSPH et les CSM mais il est très vraisemblable que des facteurs diffusibles participent également à cette régulation. Il serait opportun d'étudier le rôle des différents sous-types de CSM récemment décrits (nestine$^+$, LepR$^+$, 146$^+$, CAR cells) dans l'activation de la fonctionnalité SP. D'autres

éléments seraient intéressants à étudier comme l'effet du stress sur la capacité du stroma à induire le phénotype SP : un stroma irradié ou soumis à de faibles concentrations relatives en O_2 est il capable d'induire l'acquisition du phénotype SP par les cellules hématopoïétiques à son contact ? Le rôle de la Matrice Extracellulaire pourrait par elle même avoir un rôle important dans ce mécanisme puisqu'elle est sécrétée en culture par les CSM quand celles-ci sont induites à se différencier en ostéoblastes et de façon importante aux stades tardifs de la différenciation (ostéoblastes matures). Il serait donc intéressant d'étudier le rôle de certains éléments de cette matrice sur le mécanisme d'acquisition du phénotype SP. Si le rôle de la niche vasculaire est plutôt de favoriser l'auto-renouvellement et la prolifération/différenciation des CSPH, il serait néanmoins intéressant d'évaluer l'effet des cellules endothéliales sur l'induction/maintien de la fonctionnalité SP. Afin de nous rapprocher des conditions physiologiques de l'hématopoïèse au sein de la moelle osseuse, nous évaluons actuellement la régulation de la fonctionnalité SP des CSPH au sein d'un modèle tridimensionnel de niche médullaire intégrant dans la même co-culture CSM, ostéoblastes, adipocytes, ostéoclastes, progéniteurs endothéliaux et PH. Cette modélisation à laquelle j'ai grandement participé a fait l'objet d'un brevet intitulé « Modélisation *in vitro* des niches médullaires à cellules souches hématopoiétiques : un outil pour étudier la régulation de l'hématopoièse, évaluer le potentiel de nichage d'un greffon hématopoïétique et tester la pharmaco-toxicologie des médicaments » déposé le 16 Août 2011 sous la référence N° 11 57358. Ce modèle repose sur l'expansion/différenciation de CSM, otéoblastes, adipocytes, ostéoclastes et progéniteurs endothéliaux sur des biomatériaux de type hydroxyapatite-calcium, capables de mimer les conditions des niches hématopoïétiques médullaires. Il permet également d'étudier le rôle spécifique de chaque sous-type cellulaire dans le soutien de l'hématopoïèse. Nous avons montré que ce modèle permet l'expansion de PH immatures $CD34^+$ et $CD34^+CD38^-$, et évaluons actuellement sa capacité à maintenir/promouvoir les PH SP.

4- Un « priming » par les CSM pourrait-il améliorer la prise de greffe hématopoïétique ?

Les greffes de cellules hématopoïétiques, autologues ou allogéniques, constituent un outil thérapeutique majeur pour de nombreuses pathologies, particulièrement les hémopathies malignes. La mise en œuvre de ces traitements nécessite l'obtention au préalable d'un greffon de cellules hématopoïétiques suffisamment riche pour permettre la reconstitution d'une

hématopoïèse de qualité chez le receveur. La richesse insuffisante de certains greffons peut amener à récuser une indication de greffe chez des patients pouvant potentiellement en tirer bénéfice. Ce problème se pose essentiellement pour les greffons autologues et pour les greffons de sang placentaire. Les greffons autologues sont parfois pauvres car recueillis chez des patients ayant déjà reçu plusieurs lignes de traitement cytotoxiques pour la lignée hématopoïétique. Les greffons de sang placentaire sont « naturellement » pauvres et exposent, même quand la richesse du greffon permet l'allogreffe, à des durées d'aplasies plus longues et à un risque de rejet nettement supérieur aux greffons « classiques » de moelle osseuse ou de sang mobilisé. Améliorer la prise de greffe est donc un réel besoin, afin d'augmenter la proportion de patients « greffables » et de diminuer la morbi-mortalité des greffes de sang placentaire. La principale piste explorée dans cette optique est l'expansion des greffons en culture. Si les cultures en milieu liquide permettent d'amplifier de façon importante le nombre de cellules nucléées, cette expansion s'accompagne d'une perte des cellules les plus immatures et expose au risque de non prise à long terme (*Holyoake et al. 1997; Sorrentino 2004*). Les cultures sur stroma permettent également d'amplifier de façon importante les greffons, tout en préservant mieux les cellules immatures (*Breems et al. 1998; Sorrentino 2004; Hofmeister et al. 2007*). Il semble toutefois que ces expansions sur stroma s'accompagnent d'une perte des CSPH les plus primitifs. En effet, une étude récente a évalué la greffe de deux unités de sang placentaire, une unité non manipulée et une unité amplifiée pendant 2 semaines sur des CSM. Si la prise de greffe initiale est assurée par l'unité amplifiée, avec une réduction des durées de reconstitution granuleuse et plaquettaire, l'hématopoïèse définitive est assurée par l'unité non manipulée (*de Lima et al. 2012*). Les greffons amplifiés étant beaucoup moins riches en lymphocytes que les greffons non manipulés, il est également possible que la prise préférentielle de ces derniers soit plutôt liée à un effet allogénique.

Dans notre système expérimental, la durée de co-culture est beaucoup plus courte (4 jours *vs.* 2 semaines) et la concentration en cytokines (10ng/ml) est beaucoup plus faible que dans les protocoles classiques d'expansion cellulaire (50-100ng/ml). De plus, nous n'utilisons pas de cytokines promouvant de façon forte la prolifération (G-CSF). Dans nos expériences, réalisées à partir de cellules lin^- de sang périphérique, nous n'avons pas observé d'amplification des cellules $CD34^+$, mais une surexpression des molécules de homing/nichage comme le CXCR4 et les intégrines $\alpha 4$ et ß1. De plus, les greffes de souris NSG ont montré une meilleure prise de greffe à 12 semaines des cellules SP par rapport à des PH $CD34^+$ de moelle osseuse non « primées ». Ces résultats nous interpellent car ils montrent que dans ces conditions, des

CSPH SP de sang périphérique greffent mieux que des CSPH de moelle osseuse. Il semble donc qu'un « priming » par des CSM dans un milieu faiblement concentré en cytokines « prépare » les PH à la greffe. Ce « priming » agirait en partie par l'hyper-expression de VLA-4 et de CXCR4, tout en évitant la mise en cycle des CSPH les plus immatures. Nous envisageons de confirmer ces résultats à partir de sang mobilisé ou de sang placentaire. Leur confirmation permettrait d'envisager un nouveau moyen d'optimiser la prise de greffe, à richesse égale, en augmentant l'efficacité fonctionnelle des cellules injectées.

5- L'activation des ABC transporteurs par la niche mésenchymateuse est-elle un nouveau mécanisme de CAM-DR à prendre en compte en thérapeutique ?

Nous avons vu que, à l'instar des CSPH normaux, les cellules souches leucémiques (CSL) étaient régulées par les niches hématopoïétiques médullaires. Ces niches protègent les cellules leucémiques des chimiothérapies par des mécanismes anti-apoptotiques, ou en favorisant leur quiescence. Les principaux médiateurs de ces phénomènes sont CXCR4, CD44 et VLA-4. Nos résultats, encore préliminaires, montrent que la co-culture de blastes de sang périphérique de patients atteints de LAM avec des CSM permet l'activation de leur fonctionnalité SP. Cette activation s'accompagne d'une capacité d'efflux de drogues, comme la Mitoxantrone, et est inhibée en bloquant les intégrines-ß1. Ces résultats sont en faveur d'un mécanisme de CAM-DR, non décrit à ce jour dans les LAM, reposant sur l'activation d'ABC transporteurs. Nous poursuivons actuellement des études sur ce thème au sein du laboratoire, en nous centrant autour des questions suivantes :

- Quelle proportion de blastes circulants est concernée par une régulation de son phénotype SP par le stroma, et cette régulation est elle corrélée à un sous-type de LAM ou un pronostic particulier ?

- L'activation de la fonctionnalité SP s'accompagne-t-elle d'une plus grande chimiorésistance ? Nous étudierons également quels sont les ABC transporteurs impliqués dans l'induction du phénotype SP.

- Les blastes qui acquièrent la fonctionnalité SP correspondent ils à une fraction plus tumorogénique ? Dans ce but, nous rechercherons si l'acquisition du phénotype SP par les blastes circulants de LAM après co-culture avec des CSM révèle un contingent de CSL circulantes identifiées par leur capacité à greffer et à redonner la maladie chez la souris immunodéficiente.

- Quels mécanismes régulent l'activation de la fonctionnalité SP des blastes de LAM ? Dans ce but, nous étudierons par des technologies de type anticorps bloquants/stimulants, inhibitions pharmacologiques et ARN interférence le rôle de CD44 et de VLA-4, mais aussi de leurs voies de signalisation, notamment les Protéines G, les Src-kinases, la voie PI3K/AKT dans l'induction du phénotype SP et de la chimiorésistance des blastes circulants par le stroma médullaire.

- Existe-t-il des altérations spécifiques du stroma médullaire des patients atteints de LAM qui pourraient être des cibles thérapeutiques? Pour ceci nous comparerons l'effet de CSM de sujets sains à celui de CSM de patients LAM quant à leur capacité à promouvoir le phénotype SP et la chimiorésistance des blastes leucémiques. Nous étudierons également si le stroma des patients est capable de moduler la fonctionnalité SP de CSPH de sujets sains.

L'ensemble de ces travaux devrait nous permettre d'apporter de nouveaux éléments sur la régulation de la chimiorésistance des blastes de patients atteints de LAM par les niches hématopoïétiques. En effet, le rôle des niches dans la modulation de l'activité des ABC-transporteurs n'a encore jamais été décrit. La compréhension de ce nouveau mécanisme de CAM-DR pourrait permettre de développer des pistes thérapeutiques novatrices. La combinaison d'inhibiteurs d'ABC transporteurs et de traitements ciblant les interactions entre les cellules leucémiques et les niches médullaires (par des inhibiteurs de l'adhésion au stroma comme des anti-intégrines par exemple) pourrait potentialiser l'effet des chimiothérapies.

CONCLUSION

Dans ce travail, nous montrons pour la première fois chez l'homme, que la fonctionnalité SP des CSPH est versatile et peut être régulée par le stroma médullaire, particulièrement les cellules stromales mésenchymateuses, par des mécanismes impliquant VLA-4 et le CD44.

Le phénotype SP est étroitement lié à la protection active des cellules souches et des cellules cancéreuses contre divers substrats, dont les chimiothérapies. La mise en évidence d'une versatilité de ce phénotype en fonction de l'interaction ou non avec le stroma ouvre ainsi des pistes sur la régulation des mécanismes de protection physiologique des cellules souches et les moyens de les influencer, mais également sur la régulation des mécanismes de chimiorésistance cellules cancéreuses. A ce titre, nos travaux préliminaires montrent que, à l'instar des PH circulants, la fonctionnalité SP de blastes circulants de LAM semble être soumise à une régulation ß1-intégrine dépendante. Cette activation d'ABC-transporteurs ß1-intégrine dépendante constituerait donc un nouveau mécanisme de CAM-DR qui pourrait être modulé, par exemple en associant des inhibiteurs d'adhésion et des inhibiteurs d'ABC-transporteurs.

Ainsi, à partir d'une étude très fondamentale visant à mieux comprendre les mécanismes de régulation du phénotype SP des cellules souches hématopoïétiques par le stroma, nos résultats nous permettent d'envisager un mécanisme physiopathologique basé sur la modulation de la chimiorésistance des cellules souches qu'elles soient normales ou tumorales. Une étape ultérieure importante de notre travail sera de rechercher comment faire acquérir la fonctionnalité SP de manière sélective uniquement par les cellules souches normales. Cette étape permettra de développer de nouvelles méthodes pour cibler l'effet des chimiothérapies vers les cellules tumorales en limitant la toxicité sur les cellules souches normales.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abkowitz, J. L., A. E. Robinson, S. Kale, et al. (2003). "Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure." Blood **102**(4): 1249-1253.
Adams, G. B., K. T. Chabner, I. R. Alley, et al. (2006). "Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor." Nature **439**(7076): 599-603.
Ahmed, F., N. Arseni, H. Glimm, et al. (2008). "Constitutive expression of the ATP-binding cassette transporter ABCG2 enhances the growth potential of early human hematopoietic progenitors." Stem Cells **26**(3): 810-818.
Alt, R., F. Wilhelm, O. Pelz-Ackermann, et al. (2009). "ABCG2 expression is correlated neither to side population nor to hematopoietic progenitor function in human umbilical cord blood." Exp Hematol **37**(2): 294-301.
Andrews, R. G., E. M. Bryant, S. H. Bartelmez, et al. (1992). "CD34+ marrow cells, devoid of T and B lymphocytes, reconstitute stable lymphopoiesis and myelopoiesis in lethally irradiated allogeneic baboons." Blood **80**(7): 1693-1701.
Anthis, N. J. and I. D. Campbell (2011). "The tail of integrin activation." Trends Biochem Sci **36**(4): 191-198.
Arai, F., A. Hirao, M. Ohmura, et al. (2004). "Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche." Cell **118**(2): 149-161.
Arai, F., A. Hirao and T. Suda (2005). "Regulation of hematopoietic stem cells by the niche." Trends Cardiovasc Med **15**(2): 75-79.
Aust, S., P. Obrist, W. Jaeger, et al. (2004). "Subcellular localization of the ABCG2 transporter in normal and malignant human gallbladder epithelium." Lab Invest **84**(8): 1024-1036.
Avecilla, S. T., K. Hattori, B. Heissig, 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, S. Shivtiel, 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): 2981-2989.
Barczyk, M., S. Carracedo and D. Gullberg (2010). "Integrins." Cell Tissue Res **339**(1): 269-280.
Barker, J. E. (1994). "Sl/Sld hematopoietic progenitors are deficient in situ." Exp Hematol **22**(2): 174-177.
Barker, J. E. (1997). "Early transplantation to a normal microenvironment prevents the development of Steel hematopoietic stem cell defects." Exp Hematol **25**(6): 542-547.
Barrett, A. J., P. Longhurst, P. Sneath, et al. (1978). "Mobilization of CFU-C by exercise and ACTH induced stress in man." Exp Hematol **6**(7): 590-594.
Batard, P., M. N. Monier, N. Fortunel, et al. (2000). "TGF-(beta)1 maintains hematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle and induces CD34 antigen up-modulation." J Cell Sci **113 (Pt 3)**: 383-390.
Baum, C. M., I. L. Weissman, A. S. Tsukamoto, et al. (1992). "Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(7): 2804-2808.
Becker, A. J., C. E. Mc and J. E. Till (1963). "Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells." Nature **197**: 452-454.

Bersenev, A., C. Wu, J. Balcerek, et al. (2008). "Lnk controls mouse hematopoietic stem cell self-renewal and quiescence through direct interactions with JAK2." J Clin Invest **118**(8): 2832-2844.

Bhatia, M., D. Bonnet, B. Murdoch, et al. (1998). "A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity." Nat Med **4**(9): 1038-1045.

Bhatia, M., D. Bonnet, D. Wu, et al. (1999). "Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells." J Exp Med **189**(7): 1139-1148.

Blank, U., G. Karlsson and S. Karlsson (2008). "Signaling pathways governing stem-cell fate." Blood **111**(2): 492-503.

Blau, O., C. D. Baldus, W. K. Hofmann, et al. (2011). "Mesenchymal stromal cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients have distinct genetic abnormalities compared with leukemic blasts." Blood **118**(20): 5583-5592.

Bleau, A. M., D. Hambardzumyan, T. Ozawa, et al. (2009). "PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells." Cell Stem Cell **4**(3): 226-235.

Bocker, M. T., I. Hellwig, A. Breiling, et al. (2011). "Genome-wide promoter DNA methylation dynamics of human hematopoietic progenitor cells during differentiation and aging." Blood **117**(19): e182-189.

Boisset, J. C., W. van Cappellen, C. Andrieu-Soler, et al. (2010). "In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium." Nature **464**(7285): 116-120.

Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." Nat Med **3**(7): 730-737.

Bradley, T. R. and D. Metcalf (1966). "The growth of mouse bone marrow cells in vitro." Aust J Exp Biol Med Sci **44**(3): 287-299.

Breems, D. A., E. A. Blokland, S. Neben, et al. (1994). "Frequency analysis of human primitive haematopoietic stem cell subsets using a cobblestone area forming cell assay." Leukemia **8**(7): 1095-1104.

Breems, D. A., E. A. Blokland, K. E. Siebel, et al. (1998). "Stroma-contact prevents loss of hematopoietic stem cell quality during ex vivo expansion of CD34+ mobilized peripheral blood stem cells." Blood **91**(1): 111-117.

Bromberg, O., B. J. Frisch, J. M. Weber, et al. (2012). "Osteoblastic N-cadherin is not required for microenvironmental support and regulation of hematopoietic stem and progenitor cells." Blood **120**(2): 303-313.

Broxmeyer, H. E. (1984). "Colony assays of hematopoietic progenitor cells and correlations to clinical situations." Crit Rev Oncol Hematol **1**(3): 227-257.

Broxmeyer, H. E., C. M. Orschell, D. W. Clapp, et al. (2005). "Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist." J Exp Med **201**(8): 1307-1318.

Brusnahan, S. K., T. R. McGuire, J. D. Jackson, et al. (2010). "Human blood and marrow side population stem cell and Stro-1 positive bone marrow stromal cell numbers decline with age, with an increase in quality of surviving stem cells: correlation with cytokines." Mech Ageing Dev **131**(11-12): 718-722.

Butler, J. M., D. J. Nolan, E. L. Vertes, et al. (2010). "Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells." Cell Stem Cell **6**(3): 251-264.

Calvi, L. M., G. B. Adams, K. W. Weibrecht, et al. (2003). "Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche." Nature **425**(6960): 841-846.
Camargo, F. D., S. M. Chambers, E. Drew, et al. (2006). "Hematopoietic stem cells do not engraft with absolute efficiencies." Blood **107**(2): 501-507.
Carver-Moore, K., H. E. Broxmeyer, S. M. Luoh, et al. (1996). "Low levels of erythroid and myeloid progenitors in thrombopoietin-and c-mpl-deficient mice." Blood **88**(3): 803-808.
Cashman, J., K. Bockhold, D. E. Hogge, et al. (1997). "Sustained proliferation, multi-lineage differentiation and maintenance of primitive human haemopoietic cells in NOD/SCID mice transplanted with human cord blood." Br J Haematol **98**(4): 1026-1036.
Castro-Malaspina, H., E. M. Rabellino, A. Yen, et al. (1981). "Human megakaryocyte stimulation of proliferation of bone marrow fibroblasts." Blood **57**(4): 781-787.
Ceradini, D. J., A. R. Kulkarni, M. J. Callaghan, et al. (2004). "Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1." Nat Med **10**(8): 858-864.
Challen, G. A., N. Boles, K. K. Lin, et al. (2009). "Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis." Cytometry A **75**(1): 14-24.
Challen, G. A., N. C. Boles, S. M. Chambers, et al. (2010). "Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1." Cell Stem Cell **6**(3): 265-278.
Challen, G. A. and M. H. Little (2006). "A side order of stem cells: the SP phenotype." Stem Cells **24**(1): 3-12.
Chang, M. K., L. J. Raggatt, K. A. Alexander, et al. (2008). "Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo." J Immunol **181**(2): 1232-1244.
Chen, C., Y. Liu, R. Liu, et al. (2008). "TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species." J Exp Med **205**(10): 2397-2408.
Cheng, T., N. Rodrigues, D. Dombkowski, et al. (2000). "Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27(kip1)." Nat Med **6**(11): 1235-1240.
Cheng, T., N. Rodrigues, H. Shen, et al. (2000). "Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1." Science **287**(5459): 1804-1808.
Chitteti, B. R., Y. H. Cheng, B. Poteat, et al. (2010). "Impact of interactions of cellular components of the bone marrow microenvironment on hematopoietic stem and progenitor cell function." Blood **115**(16): 3239-3248.
Chow, A., M. Huggins, J. Ahmed, et al. (2013). "CD169(+) macrophages provide a niche promoting erythropoiesis under homeostasis and stress." Nat Med **19**(4): 429-436.
Chow, A., D. Lucas, A. Hidalgo, et al. (2010). "Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche." J Exp Med **208**(2): 261-271.
Christopher, M. J., M. Rao, F. Liu, et al. (2011). "Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice." J Exp Med **208**(2): 251-260.
Chung, Y. S., H. J. Kim, T. M. Kim, et al. (2009). "Undifferentiated hematopoietic cells are characterized by a genome-wide undermethylation dip around the transcription start site and a hierarchical epigenetic plasticity." Blood **114**(24): 4968-4978.

Civin, C. I., L. C. Strauss, C. Brovall, 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): 157-165.

Colmone, A., M. Amorim, A. L. Pontier, et al. (2008). "Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells." Science **322**(5909): 1861-1865.

Corral, D. A., M. Amling, M. Priemel, et al. (1998). "Dissociation between bone resorption and bone formation in osteopenic transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13835-13840.

Corselli, M., C. J. Chin, C. Parekh, et al. (2013). "Perivascular support of human hematopoietic cells." Blood.

Coulombel, L., A. C. Eaves and C. J. Eaves (1983). "Enzymatic treatment of long-term human marrow cultures reveals the preferential location of primitive hemopoietic progenitors in the adherent layer." Blood **62**(2): 291-297.

Cumano, A., J. C. Ferraz, M. Klaine, et al. (2001). "Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution." Immunity **15**(3): 477-485.

Damiano, J. S., A. E. Cress, L. A. Hazlehurst, et al. (1999). "Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines." Blood **93**(5): 1658-1667.

Day, K., G. Shefer, J. B. Richardson, et al. (2007). "Nestin-GFP reporter expression defines the quiescent state of skeletal muscle satellite cells." Dev Biol **304**(1): 246-259.

de Bruijn, M. F., N. A. Speck, M. C. Peeters, et al. (2000). "Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo." Embo J **19**(11): 2465-2474.

de Graaf, C. A., M. Kauppi, T. Baldwin, et al. (2010). "Regulation of hematopoietic stem cells by their mature progeny." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(50): 21689-21694.

de la Fuente, M. T., B. Casanova, E. Cantero, et al. (2003). "Involvement of p53 in alpha4beta1 integrin-mediated resistance of B-CLL cells to fludarabine." Biochem Biophys Res Commun **311**(3): 708-712.

de Lima, M., I. McNiece, S. N. Robinson, et al. (2012). "Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture." N Engl J Med **367**(24): 2305-2315.

de Revel, T., F. R. Appelbaum, R. Storb, et al. (1994). "Effects of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor, alone and in combination, on the mobilization of peripheral blood cells that engraft lethally irradiated dogs." Blood **83**(12): 3795-3799.

De Toni, F., C. Racaud-Sultan, G. Chicanne, et al. (2006). "A crosstalk between the Wnt and the adhesion-dependent signaling pathways governs the chemosensitivity of acute myeloid leukemia." Oncogene **25**(22): 3113-3122.

Deguchi, K., H. Yagi, M. Inada, et al. (1999). "Excessive extramedullary hematopoiesis in Cbfa1-deficient mice with a congenital lack of bone marrow." Biochem Biophys Res Commun **255**(2): 352-359.

Denning-Kendall, P., S. Singha, B. Bradley, et al. (2003). "Cobblestone area-forming cells in human cord blood are heterogeneous and differ from long-term culture-initiating cells." Stem Cells **21**(6): 694-701.

Dexter, T. M., T. D. Allen and L. G. Lajtha (1977). "Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro." J Cell Physiol **91**(3): 335-344.

DiMartino, J. F., L. Selleri, D. Traver, et al. (2001). "The Hox cofactor and proto-oncogene Pbx1 is required for maintenance of definitive hematopoiesis in the fetal liver." Blood **98**(3): 618-626.
Dimitroff, C. J., J. Y. Lee, R. C. Fuhlbrigge, et al. (2000). "A distinct glycoform of CD44 is an L-selectin ligand on human hematopoietic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13841-13846.
Dimitroff, C. J., J. Y. Lee, S. Rafii, et al. (2001). "CD44 is a major E-selectin ligand on human hematopoietic progenitor cells." J Cell Biol **153**(6): 1277-1286.
Ding, L., T. L. Saunders, G. Enikolopov, et al. (2012). "Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells." Nature **481**(7382): 457-462.
Domen, J. and I. L. Weissman (1999). "Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate." Mol Med Today **5**(5): 201-208.
Doulatov, S., F. Notta, E. Laurenti, et al. (2012). "Hematopoiesis: a human perspective." Cell Stem Cell **10**(2): 120-136.
Dumble, M., L. Moore, S. M. Chambers, et al. (2007). "The impact of altered p53 dosage on hematopoietic stem cell dynamics during aging." Blood **109**(4): 1736-1742.
Dykstra, B., D. Kent, M. Bowie, et al. (2007). "Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs in vivo." Cell Stem Cell **1**(2): 218-229.
Eaker, S. S., T. S. Hawley, A. Ramezani, et al. (2004). "Detection and enrichment of hematopoietic stem cells by side population phenotype." Methods Mol Biol **263**: 161-180.
Eberharter, A., R. Ferreira and P. Becker (2005). "Dynamic chromatin: concerted nucleosome remodelling and acetylation." Biol Chem **386**(8): 745-751.
Ehninger, A. and A. Trumpp (2011). "The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in." J Exp Med **208**(3): 421-428.
Emmons, R. V., D. M. Reid, R. L. Cohen, et al. (1996). "Human thrombopoietin levels are high when thrombocytopenia is due to megakaryocyte deficiency and low when due to increased platelet destruction." Blood **87**(10): 4068-4071.
Eppert, K., K. Takenaka, E. R. Lechman, et al. (2011). "Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia." Nat Med **17**(9): 1086-1093.
Fauser, A. A. and H. A. Messner (1978). "Granuloerythropoietic colonies in human bone marrow, peripheral blood, and cord blood." Blood **52**(6): 1243-1248.
Ferkowicz, M. J. and M. C. Yoder (2005). "Blood island formation: longstanding observations and modern interpretations." Exp Hematol **33**(9): 1041-1047.
Fetsch, P. A., A. Abati, T. Litman, et al. (2006). "Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues." Cancer Lett **235**(1): 84-92.
Feuring-Buske, M. and D. E. Hogge (2001). "Hoechst 33342 efflux identifies a subpopulation of cytogenetically normal CD34(+)CD38(-) progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia." Blood **97**(12): 3882-3889.
Fialkow, P. J., E. D. Thomas, J. I. Bryant, et al. (1971). "Leukaemic transformation of engrafted human marrow cells in vivo." Lancet **1**(7693): 251-255.
Ficara, F., M. J. Murphy, M. Lin, et al. (2008). "Pbx1 regulates self-renewal of long-term hematopoietic stem cells by maintaining their quiescence." Cell Stem Cell **2**(5): 484-496.
Fischer, M., M. Schmidt, S. Klingenberg, et al. (2006). "Short-term repopulating cells with myeloid potential in human mobilized peripheral blood do not have a side population (SP) phenotype." Blood **108**(6): 2121-2123.

Flanagan, J. G., D. C. Chan and P. Leder (1991). "Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sld mutant." Cell **64**(5): 1025-1035.
Flynn, C. M. and D. S. Kaufman (2007). "Donor cell leukemia: insight into cancer stem cells and the stem cell niche." Blood **109**(7): 2688-2692.
Forsberg, E. C., S. S. Prohaska, S. Katzman, et al. (2005). "Differential expression of novel potential regulators in hematopoietic stem cells." PLoS Genet **1**(3): e28.
Foster, A. E., F. V. Okur, E. Biagi, et al. (2010). "Selective elimination of a chemoresistant side population of B-CLL cells by cytotoxic T lymphocytes in subjects receiving an autologous hCD40L/IL-2 tumor vaccine." Leukemia **24**(3): 563-572.
Fritsch, G., M. Stimpfl, M. Kurz, et al. (1995). "Characterization of hematopoietic stem cells." Ann N Y Acad Sci **770**: 42-52.
Fujisaki, J., J. Wu, A. L. Carlson, et al. (2011). "In vivo imaging of Treg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche." Nature **474**(7350): 216-219.
Gallacher, L., B. Murdoch, D. M. Wu, et al. (2000). "Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7." Blood **95**(9): 2813-2820.
Ghaffari, S., F. Smadja-Joffe, R. Oostendorp, et al. (1999). "CD44 isoforms in normal and leukemic hematopoiesis." Exp Hematol **27**(6): 978-993.
Gilks, C. B., S. E. Bear, H. L. Grimes, et al. (1993). "Progression of interleukin-2 (IL-2)-dependent rat T cell lymphoma lines to IL-2-independent growth following activation of a gene (Gfi-1) encoding a novel zinc finger protein." Mol Cell Biol **13**(3): 1759-1768.
Glimm, H., W. Eisterer, K. Lee, 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.
Goessling, W., T. E. North, S. Loewer, et al. (2009). "Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration." Cell **136**(6): 1136-1147.
Golebiewska, A., N. H. Brons, R. Bjerkvig, et al. (2011). "Critical appraisal of the side population assay in stem cell and cancer stem cell research." Cell Stem Cell **8**(2): 136-147.
Goodell, M. A., K. Brose, G. Paradis, et al. (1996). "Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo." J Exp Med **183**(4): 1797-1806.
Goodell, M. A., M. Rosenzweig, H. Kim, et al. (1997). "Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species." Nat Med **3**(12): 1337-1345.
Grassinger, J., D. N. Haylock, B. Williams, et al. (2010). "Phenotypically identical hemopoietic stem cells isolated from different regions of bone marrow have different biologic potential." Blood **116**(17): 3185-3196.
Greenbaum, A. M., L. D. Revollo, J. R. Woloszynek, et al. (2012). "N-cadherin in osteolineage cells is not required for maintenance of hematopoietic stem cells." Blood **120**(2): 295-302.
Gross, E., F. E. L'Faqihi-Olive, L. Ysebaert, et al. (2010). "B-chronic lymphocytic leukemia chemoresistance involves innate and acquired leukemic side population cells." Leukemia **24**(11): 1885-1892.

Gunji, Y., M. Nakamura, H. Osawa, et al. (1993). "Human primitive hematopoietic progenitor cells are more enriched in KITlow cells than in KIThigh cells." Blood **82**(11): 3283-3289.

Gupta, P., T. R. Oegema, Jr., J. J. Brazil, et al. (1998). "Structurally specific heparan sulfates support primitive human hematopoiesis by formation of a multimolecular stem cell niche." Blood **92**(12): 4641-4651.

Hao, Q. L., F. T. Thiemann, D. Petersen, et al. (1996). "Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population." Blood **88**(9): 3306-3313.

Hashimoto, N., T. Watanabe, Y. Shiratori, et al. (1995). "Prostanoid secretion by rat hepatic sinusoidal endothelial cells and its regulation by exogenous adenosine triphosphate." Hepatology **21**(6): 1713-1718.

Hattori, K., B. Heissig, K. Tashiro, 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): 3354-3360.

Hazlehurst, L. A., R. F. Argilagos and W. S. Dalton (2007). "Beta1 integrin mediated adhesion increases Bim protein degradation and contributes to drug resistance in leukaemia cells." Br J Haematol **136**(2): 269-275.

Hazlehurst, L. A., J. S. Damiano, I. Buyuksal, et al. (2000). "Adhesion to fibronectin via beta1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR)." Oncogene **19**(38): 4319-4327.

Hazlehurst, L. A., N. Valkov, L. Wisner, et al. (2001). "Reduction in drug-induced DNA double-strand breaks associated with beta1 integrin-mediated adhesion correlates with drug resistance in U937 cells." Blood **98**(6): 1897-1903.

Heissig, B., K. Hattori, S. Dias, 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): 625-637.

Hiramatsu, H., R. Nishikomori, T. Heike, et al. (2003). "Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD34+ cells using the NOD/SCID/gammacnull mice model." Blood **102**(3): 873-880.

Hock, H., M. J. Hamblen, H. M. Rooke, et al. (2004). "Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells." Nature **431**(7011): 1002-1007.

Hodgson, G. S. and T. R. Bradley (1979). "Properties of haematopoietic stem cells surviving 5-fluorouracil treatment: evidence for a pre-CFU-S cell?" Nature **281**(5730): 381-382.

Hofmeister, C. C., J. Zhang, K. L. Knight, et al. (2007). "Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: growing knowledge from the hematopoietic niche." Bone Marrow Transplant **39**(1): 11-23.

Hoggatt, J., P. Singh, J. Sampath, et al. (2009). "Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation." Blood **113**(22): 5444-5455.

Holyoake, T. L., M. J. Alcorn, L. Richmond, et al. (1997). "CD34 positive PBPC expanded ex vivo may not provide durable engraftment following myeloablative chemoradiotherapy regimens." Bone Marrow Transplant **19**(11): 1095-1101.

Hooper, A. T., J. M. Butler, D. J. Nolan, et al. (2009). "Engraftment and reconstitution of hematopoiesis is dependent on VEGFR2-mediated regeneration of sinusoidal endothelial cells." Cell Stem Cell **4**(3): 263-274.

Hosen, N., C. Y. Park, N. Tatsumi, et al. (2007). "CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(26): 11008-11013.
Hosokawa, K., F. Arai, H. Yoshihara, et al. (2010). "Knockdown of N-cadherin suppresses the long-term engraftment of hematopoietic stem cells." Blood **116**(4): 554-563.
Hosokawa, K., F. Arai, H. Yoshihara, et al. (2007). "Function of oxidative stress in the regulation of hematopoietic stem cell-niche interaction." Biochem Biophys Res Commun **363**(3): 578-583.
Hsieh, Y. T., E. J. Gang, H. Geng, et al. (2013). "Integrin alpha4 blockade sensitizes drug resistant pre-B acute lymphoblastic leukemia to chemotherapy." Blood **121**(10): 1814-1818.
Huls, M., C. D. Brown, A. S. Windass, et al. (2008). "The breast cancer resistance protein transporter ABCG2 is expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane." Kidney Int **73**(2): 220-225.
Humphries, J. D., A. Byron and M. J. Humphries (2006). "Integrin ligands at a glance." J Cell Sci **119**(Pt 19): 3901-3903.
Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." Cell **110**(6): 673-687.
Ibrahim, S. F., A. H. Diercks, T. W. Petersen, et al. (2007). "Kinetic analyses as a critical parameter in defining the side population (SP) phenotype." Exp Cell Res **313**(9): 1921-1926.
Imbert, A. M., G. Belaaloui, F. Bardin, et al. (2006). "CD99 expressed on human mobilized peripheral blood CD34+ cells is involved in transendothelial migration." Blood **108**(8): 2578-2586.
Ishikawa, F., S. Yoshida, Y. Saito, et al. (2007). "Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region." Nat Biotechnol **25**(11): 1315-1321.
Ito, K., R. Bernardi, A. Morotti, et al. (2008). "PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells." Nature **453**(7198): 1072-1078.
Ito, K., A. Hirao, F. Arai, et al. (2004). "Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells." Nature **431**(7011): 997-1002.
Ito, K., A. Hirao, F. Arai, et al. (2006). "Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells." Nat Med **12**(4): 446-451.
Ivanova, N. B., J. T. Dimos, C. Schaniel, et al. (2002). "A stem cell molecular signature." Science **298**(5593): 601-604.
Jaenisch, R. and A. Bird (2003). "Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals." Nat Genet **33 Suppl**: 245-254.
Jakubikova, J., S. Adamia, M. Kost-Alimova, et al. (2011). "Lenalidomide targets clonogenic side population in multiple myeloma: pathophysiologic and clinical implications." Blood **117**(17): 4409-4419.
Jalili, A., N. Shirvaikar, L. Marquez-Curtis, et al. (2010). "Fifth complement cascade protein (C5) cleavage fragments disrupt the SDF-1/CXCR4 axis: further evidence that innate immunity orchestrates the mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells." Exp Hematol **38**(4): 321-332.
Jang, Y. Y. and S. J. Sharkis (2007). "A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche." Blood **110**(8): 3056-3063.

Ji, H., L. I. Ehrlich, J. Seita, et al. (2010). "Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors." Nature **467**(7313): 338-342.
Jin, L., K. J. Hope, Q. Zhai, et al. (2006). "Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells." Nat Med **12**(10): 1167-1174.
Jing, D., A. V. Fonseca, N. Alakel, et al. (2010). "Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells--modeling the niche compartments in vitro." Haematologica **95**(4): 542-550.
Johnson, R. S., B. M. Spiegelman and V. Papaioannou (1992). "Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene." Cell **71**(4): 577-586.
Jonker, J. W., J. W. Smit, R. F. Brinkhuis, et al. (2000). "Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan." J Natl Cancer Inst **92**(20): 1651-1656.
Jordan, C. T. and I. R. Lemischka (1990). "Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse." Genes Dev **4**(2): 220-232.
Jordan, C. T., D. Upchurch, S. J. Szilvassy, et al. (2000). "The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells." Leukemia **14**(10): 1777-1784.
Josefsen, D., L. Forfang, M. Dyrhaug, et al. (2011). "Side population cells in highly enriched CD34-positive cells from peripheral blood progenitor cells identify an immature subtype of hematopoietic progenitor cells but do not predict time to engraftment in patients treated with high-dose therapy." Eur J Haematol **87**(6): 494-502.
Jung, Y., J. Wang, A. Schneider, et al. (2006). "Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing." Bone **38**(4): 497-508.
Kacena, M. A., C. M. Gundberg and M. C. Horowitz (2006). "A reciprocal regulatory interaction between megakaryocytes, bone cells, and hematopoietic stem cells." Bone **39**(5): 978-984.
Kacena, M. A., C. M. Gundberg, T. Nelson, et al. (2005). "Loss of the transcription factor p45 NF-E2 results in a developmental arrest of megakaryocyte differentiation and the onset of a high bone mass phenotype." Bone **36**(2): 215-223.
Kacena, M. A., R. A. Shivdasani, K. Wilson, et al. (2004). "Megakaryocyte-osteoblast interaction revealed in mice deficient in transcription factors GATA-1 and NF-E2." J Bone Miner Res **19**(4): 652-660.
Kamel-Reid, S. and J. E. Dick (1988). "Engraftment of immune-deficient mice with human hematopoietic stem cells." Science **242**(4886): 1706-1709.
Katayama, Y., M. Battista, W. M. Kao, et al. (2006). "Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow." Cell **124**(2): 407-421.
Kawamori, Y., Y. Katayama, N. Asada, et al. (2010). "Role for vitamin D receptor in the neuronal control of the hematopoietic stem cell niche." Blood **116**(25): 5528-5535.
Kennedy, M. S., J. D. Stobo and M. E. Goldyne (1980). "In vitro synthesis of prostaglandins and related lipids by populations of human peripheral blood mononuclear cells." Prostaglandins **20**(1): 135-145.
Kenneth, N. S. and S. Rocha (2008). "Regulation of gene expression by hypoxia." Biochem J **414**(1): 19-29.

Kent, D. G., M. R. Copley, C. Benz, et al. (2009). "Prospective isolation and molecular characterization of hematopoietic stem cells with durable self-renewal potential." Blood **113**(25): 6342-6350.
Khaldoyanidi, S., D. Schnabel, N. Fohr, et al. (1997). "Functional activity of CD44 isoforms in haemopoiesis of the rat." Br J Haematol **96**(1): 31-45.
Kiel, M. J., M. Acar, G. L. Radice, et al. (2009). "Hematopoietic stem cells do not depend on N-cadherin to regulate their maintenance." Cell Stem Cell **4**(2): 170-179.
Kiel, M. J., O. H. Yilmaz, T. Iwashita, et al. (2005). "SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells." Cell **121**(7): 1109-1121.
Kimura, S., A. W. Roberts, D. Metcalf, 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): 1195-1200.
Kobayashi, H., J. M. Butler, R. O'Donnell, et al. (2010). "Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells." Nat Cell Biol **12**(11): 1046-1056.
Kollet, O., A. Dar, S. Shivtiel, et al. (2006). "Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells." Nat Med **12**(6): 657-664.
Kollet, O., A. Peled, T. Byk, et al. (2000). "beta2 microglobulin-deficient (B2m(null)) NOD/SCID mice are excellent recipients for studying human stem cell function." Blood **95**(10): 3102-3105.
Konopleva, M., S. Konoplev, W. Hu, et al. (2002). "Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins." Leukemia **16**(9): 1713-1724.
Korbling, M. and P. Anderlini (2001). "Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter?" Blood **98**(10): 2900-2908.
Kovach, N. L., N. Lin, T. Yednock, 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): 159-167.
Krane, S. M. and M. Inada (2008). "Matrix metalloproteinases and bone." Bone **43**(1): 7-18.
Krishnamurthy, P., D. D. Ross, T. Nakanishi, et al. (2004). "The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme." J Biol Chem **279**(23): 24218-24225.
Krishnamurthy, P. and J. D. Schuetz (2005). "The ABC transporter Abcg2/Bcrp: role in hypoxia mediated survival." Biometals **18**(4): 349-358.
Kruijtzer, C. M., J. H. Beijnen, H. Rosing, et al. (2002). "Increased oral bioavailability of topotecan in combination with the breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitor GF120918." J Clin Oncol **20**(13): 2943-2950.
Kubota, Y., K. Takubo and T. Suda (2008). "Bone marrow long label-retaining cells reside in the sinusoidal hypoxic niche." Biochem Biophys Res Commun **366**(2): 335-339.
Kukreja, A., A. Hutchinson, K. Dhodapkar, et al. (2006). "Enhancement of clonogenicity of human multiple myeloma by dendritic cells." J Exp Med **203**(8): 1859-1865.
Lacombe, J., S. Herblot, S. Rojas-Sutterlin, et al. (2010). "Scl regulates the quiescence and the long-term competence of hematopoietic stem cells." Blood **115**(4): 792-803.

Lacorazza, H. D., T. Yamada, Y. Liu, et al. (2006). "The transcription factor MEF/ELF4 regulates the quiescence of primitive hematopoietic cells." Cancer Cell **9**(3): 175-187.

Lam, B. S., C. Cunningham and G. B. Adams (2011). "Pharmacologic modulation of the calcium-sensing receptor enhances hematopoietic stem cell lodgment in the adult bone marrow." Blood **117**(4): 1167-1175.

Lapid, K., Y. Vagima, O. Kollet, et al. (2008). Egress and mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells. StemBook. Cambridge (MA).

Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, et al. (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." Nature **367**(6464): 645-648.

Larochelle, A., J. Vormoor, H. Hanenberg, et al. (1996). "Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy." Nat Med **2**(12): 1329-1337.

Lassila, O., J. Eskola, P. Toivanen, et al. (1978). "The origin of lymphoid stem cells studied in chick yold sac-embryo chimaeras." Nature **272**(5651): 353-354.

Lataillade, J. J., D. Clay, P. Bourin, et al. (2002). "Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G(0)/G(1) transition in CD34(+) cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism." Blood **99**(4): 1117-1129.

Lataillade, J. J., D. Clay, C. Dupuy, et al. (2000). "Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival." Blood **95**(3): 756-768.

Lataillade, J. J., O. Pierre-Louis, H. C. Hasselbalch, et al. (2008). "Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence." Blood **112**(8): 3026-3035.

Laterveer, L., I. J. Lindley, M. S. Hamilton, et al. (1995). "Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability." Blood **85**(8): 2269-2275.

Le Bousse-Kerdiles, M. C. (2012). "Primary myelofibrosis and the "bad seeds in bad soil" concept." Fibrogenesis Tissue Repair **5 Suppl 1**: S20.

Lee, C. G., B. Das, T. L. Lin, et al. (2012). "A rare fraction of drug-resistant follicular lymphoma cancer stem cells interacts with follicular dendritic cells to maintain tumourigenic potential." Br J Haematol **158**(1): 79-90.

Lee, H. M., M. Wysoczynski, R. Liu, et al. (2010). "Mobilization studies in complement-deficient mice reveal that optimal AMD3100 mobilization of hematopoietic stem cells depends on complement cascade activation by AMD3100-stimulated granulocytes." Leukemia **24**(3): 573-582.

Lessard, J. and G. Sauvageau (2003). "Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells." Nature **423**(6937): 255-260.

Levesque, J. P., J. Hendy, Y. Takamatsu, et al. (2003). "Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide." J Clin Invest **111**(2): 187-196.

Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky, et al. (2007). "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated." Nat Rev Immunol **7**(9): 678-689.

Li, W., S. A. Johnson, W. C. Shelley, et al. (2004). "Hematopoietic stem cell repopulating ability can be maintained in vitro by some primary endothelial cells." Exp Hematol **32**(12): 1226-1237.

Lichterfeld, M., S. Martin, L. Burkly, 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.
Linton, K. J. (2007). "Structure and function of ABC transporters." Physiology (Bethesda) **22**: 122-130.
Liu, Y., S. E. Elf, T. Asai, et al. (2009). "The p53 tumor suppressor protein is a critical regulator of hematopoietic stem cell behavior." Cell Cycle **8**(19): 3120-3124.
Lo Celso, C., H. E. Fleming, J. W. Wu, et al. (2009). "Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche." Nature **457**(7225): 92-96.
Loh, Y. S., S. Mo, R. D. Brown, et al. (2008). "Presence of Hoechst low side populations in multiple myeloma." Leuk Lymphoma **49**(9): 1813-1816.
Lord, B. I. and L. B. Woolford (1993). "Proliferation of spleen colony forming units (CFU-S8, CFU-S13) and cells with marrow repopulating ability." Stem Cells **11**(3): 212-217.
Lutzny, G., T. Kocher, M. Schmidt-Supprian, et al. (2013). "Protein kinase c-beta-dependent activation of NF-kappaB in stromal cells is indispensable for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells in vivo." Cancer Cell **23**(1): 77-92.
Lyman, S. D. and S. E. Jacobsen (1998). "c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities." Blood **91**(4): 1101-1134.
Lymperi, S., A. Ersek, F. Ferraro, et al. (2011). "Inhibition of osteoclast function reduces hematopoietic stem cell numbers in vivo." Blood **117**(5): 1540-1549.
Maes, C., S. Goossens, S. Bartunkova, et al. (2010). "Increased skeletal VEGF enhances beta-catenin activity and results in excessively ossified bones." EMBO J **29**(2): 424-441.
Magli, M. C., N. N. Iscove and N. Odartchenko (1982). "Transient nature of early haematopoietic spleen colonies." Nature **295**(5849): 527-529.
Maillard, I., U. Koch, A. Dumortier, et al. (2008). "Canonical notch signaling is dispensable for the maintenance of adult hematopoietic stem cells." Cell Stem Cell **2**(4): 356-366.
Majeti, R., M. P. Chao, A. A. Alizadeh, et al. (2009). "CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells." Cell **138**(2): 286-299.
Maliepaard, M., G. L. Scheffer, I. F. Faneyte, et al. (2001). "Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues." Cancer Res **61**(8): 3458-3464.
Mancini, S. J., N. Mantei, A. Dumortier, et al. (2005). "Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation." Blood **105**(6): 2340-2342.
Mansour, A., G. Abou-Ezzi, E. Sitnicka, et al. (2012). "Osteoclasts promote the formation of hematopoietic stem cell niches in the bone marrow." J Exp Med **209**(3): 537-549.
Matsui, W., C. A. Huff, Q. Wang, et al. (2004). "Characterization of clonogenic multiple myeloma cells." Blood **103**(6): 2332-2336.
Matsui, W., Q. Wang, J. P. Barber, et al. (2008). "Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance." Cancer Res **68**(1): 190-197.
Matsumoto, A., S. Takeishi, T. Kanie, et al. (2011). "p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells." Cell Stem Cell **9**(3): 262-271.

Matsunaga, T., F. Fukai, S. Miura, et al. (2008). "Combination therapy of an anticancer drug with the FNIII14 peptide of fibronectin effectively overcomes cell adhesion-mediated drug resistance of acute myelogenous leukemia." Leukemia **22**(2): 353-360.

Matsunaga, T., N. Takemoto, T. Sato, et al. (2003). "Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia." Nat Med **9**(9): 1158-1165.

Matsuzaki, Y., K. Kinjo, R. C. Mulligan, et al. (2004). "Unexpectedly efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cells." Immunity **20**(1): 87-93.

Mazo, I. B., J. C. Gutierrez-Ramos, P. S. Frenette, et al. (1998). "Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1." J Exp Med **188**(3): 465-474.

Mazo, I. B., E. J. Quackenbush, J. B. Lowe, et al. (2002). "Total body irradiation causes profound changes in endothelial traffic molecules for hematopoietic progenitor cell recruitment to bone marrow." Blood **99**(11): 4182-4191.

Mazo, I. B. and U. H. von Andrian (1999). "Adhesion and homing of blood-borne cells in bone marrow microvessels." J Leukoc Biol **66**(1): 25-32.

Mazzon, C., A. Anselmo, J. Cibella, et al. (2011). "The critical role of agrin in the hematopoietic stem cell niche." Blood **118**(10): 2733-2742.

McCulloch, E. A., L. Siminovitch, J. E. Till, et al. (1965). "The cellular basis of the genetically determined hemopoietic defect in anemic mice of genotype Sl-Sld." Blood **26**(4): 399-410.

McCulloch, E. A. and J. E. Till (1964). "Proliferation of Hemopoietic Colony-Forming Cells Transplanted into Irradiated Mice." Radiat Res **22**: 383-397.

Meads, M. B., R. A. Gatenby and W. S. Dalton (2009). "Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease." Nat Rev Cancer **9**(9): 665-674.

Medvinsky, A. and E. Dzierzak (1996). "Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region." Cell **86**(6): 897-906.

Mendez-Ferrer, S., M. Battista and P. S. Frenette (2010). "Cooperation of beta(2)- and beta(3)-adrenergic receptors in hematopoietic progenitor cell mobilization." Ann N Y Acad Sci **1192**: 139-144.

Mendez-Ferrer, S., D. Lucas, M. Battista, et al. (2008). "Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations." Nature **452**(7186): 442-447.

Mendez-Ferrer, S., T. V. Michurina, F. Ferraro, et al. (2010). "Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche." Nature **466**(7308): 829-834.

Miyake, K., K. L. Medina, S. Hayashi, et al. (1990). "Monoclonal antibodies to Pgp-1/CD44 block lympho-hemopoiesis in long-term bone marrow cultures." J Exp Med **171**(2): 477-488.

Miyake, K., I. L. Weissman, J. S. Greenberger, et al. (1991). "Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis." J Exp Med **173**(3): 599-607.

Miyamoto, K., K. Y. Araki, K. Naka, et al. (2007). "Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool." Cell Stem Cell **1**(1): 101-112.

Mo, S. L., J. Li, Y. S. Loh, et al. (2011). "Factors influencing the abundance of the side population in a human myeloma cell line." Bone Marrow Res **2011**: 524845.

Mo, W. and J. T. Zhang (2012). "Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance." Int J Biochem Mol Biol **3**(1): 1-27.

Mogi, M., J. Yang, J. F. Lambert, et al. (2003). "Akt signaling regulates side population cell phenotype via Bcrp1 translocation." J Biol Chem **278**(40): 39068-39075.
Montanaro, F., K. Liadaki, J. Schienda, et al. (2004). "Demystifying SP cell purification: viability, yield, and phenotype are defined by isolation parameters." Exp Cell Res **298**(1): 144-154.
Moore, K. A. and I. R. Lemischka (2006). "Stem cells and their niches." Science **311**(5769): 1880-1885.
Morel, F., A. Galy, B. Chen, et al. (1998). "Equal distribution of competitive long-term repopulating stem cells in the CD34+ and CD34- fractions of Thy-1lowLin-/lowSca-1+ bone marrow cells." Exp Hematol **26**(5): 440-448.
Morita, Y., H. Ema and H. Nakauchi (2010). "Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment." J Exp Med **207**(6): 1173-1182.
Morita, Y., H. Ema, S. Yamazaki, et al. (2006). "Non-side-population hematopoietic stem cells in mouse bone marrow." Blood **108**(8): 2850-2856.
Morrison, S. J., N. Uchida and I. L. Weissman (1995). "The biology of hematopoietic stem cells." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 35-71.
Moserle, L., M. Ghisi, A. Amadori, et al. (2010). "Side population and cancer stem cells: therapeutic implications." Cancer Lett **288**(1): 1-9.
Moshaver, B., A. van Rhenen, A. Kelder, et al. (2008). "Identification of a small subpopulation of candidate leukemia-initiating cells in the side population of patients with acute myeloid leukemia." Stem Cells **26**(12): 3059-3067.
Mourcin, F., C. Breton, J. Tellier, et al. (2011). "Galectin-1-expressing stromal cells constitute a specific niche for pre-BII cell development in mouse bone marrow." Blood **117**(24): 6552-6561.
Muller, A. M., A. Medvinsky, J. Strouboulis, et al. (1994). "Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo." Immunity **1**(4): 291-301.
Nagasawa, T., S. Hirota, K. Tachibana, et al. (1996). "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1." Nature **382**(6592): 635-638.
Nakamura, Y., K. Ando, J. Chargui, et al. (1999). "Ex vivo generation of CD34(+) cells from CD34(-) hematopoietic cells." Blood **94**(12): 4053-4059.
Nakashima, M., Y. Ishii, M. Watanabe, et al. (2010). "The side population, as a precursor of Hodgkin and Reed-Sternberg cells and a target for nuclear factor-kappaB inhibitors in Hodgkin's lymphoma." Cancer Sci **101**(11): 2490-2496.
Naveiras, O., V. Nardi, P. L. Wenzel, et al. (2009). "Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment." Nature **460**(7252): 259-263.
Naylor, C. S., E. Jaworska, K. Branson, et al. (2005). "Side population/ABCG2-positive cells represent a heterogeneous group of haemopoietic cells: implications for the use of adult stem cells in transplantation and plasticity protocols." Bone Marrow Transplant **35**(4): 353-360.
Nervi, B., P. Ramirez, M. P. Rettig, et al. (2009). "Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100." Blood **113**(24): 6206-6214.
Nie, Y., Y. C. Han and Y. R. Zou (2008). "CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells." J Exp Med **205**(4): 777-783.

Nilsson, S. K., H. M. Johnston, G. A. Whitty, et al. (2005). "Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells." Blood **106**(4): 1232-1239.

Novershtern, N., A. Subramanian, L. N. Lawton, et al. (2011). "Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis." Cell **144**(2): 296-309.

Oh, I. H. and R. K. Humphries (2012). "Concise review: Multidimensional regulation of the hematopoietic stem cell state." Stem Cells **30**(1): 82-88.

Ohneda, O., C. Fennie, Z. Zheng, et al. (1998). "Hematopoietic stem cell maintenance and differentiation are supported by embryonic aorta-gonad-mesonephros region-derived endothelium." Blood **92**(3): 908-919.

Okumura, N., K. Tsuji, Y. Ebihara, et al. (1996). "Chemotactic and chemokinetic activities of stem cell factor on murine hematopoietic progenitor cells." Blood **87**(10): 4100-4108.

Omatsu, Y., T. Sugiyama, H. Kohara, et al. (2010). "The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche." Immunity **33**(3): 387-399.

Oostendorp, R. A. and P. Dormer (1997). "VLA-4-mediated interactions between normal human hematopoietic progenitors and stromal cells." Leuk Lymphoma **24**(5-6): 423-435.

Osawa, M., K. Hanada, H. Hamada, et al. (1996). "Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell." Science **273**(5272): 242-245.

Paget, S. (1889). "The distribution of secondary growths in cancer of the breast." Lancet: 571-573.

Palis, J., S. Robertson, M. Kennedy, et al. (1999). "Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse." Development **126**(22): 5073-5084.

Papathanasiou, P., J. L. Attema, H. Karsunky, et al. (2009). "Evaluation of the long-term reconstituting subset of hematopoietic stem cells with CD150." Stem Cells **27**(10): 2498-2508.

Papayannopoulou, T., C. Craddock, B. Nakamoto, 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): 9647-9651.

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): 9374-9378.

Park, I. K., D. Qian, M. Kiel, et al. (2003). "Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells." Nature **423**(6937): 302-305.

Parmar, K., P. Mauch, J. A. Vergilio, et al. (2007). "Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(13): 5431-5436.

Patt, H. M. and M. A. Maloney (1972). "Bone formation and resorption as a requirement for marrow development." Proc Soc Exp Biol Med **140**(1): 205-207.

Pearce, D. J. and D. Bonnet (2007). "The combined use of Hoechst efflux ability and aldehyde dehydrogenase activity to identify murine and human hematopoietic stem cells." Exp Hematol **35**(9): 1437-1446.

Pearce, D. J., C. M. Ridler, C. Simpson, et al. (2004). "Multiparameter analysis of murine bone marrow side population cells." Blood **103**(7): 2541-2546.
Pearce, D. J., D. Taussig, K. Zibara, et al. (2006). "AML engraftment in the NOD/SCID assay reflects the outcome of AML: implications for our understanding of the heterogeneity of AML." Blood **107**(3): 1166-1173.
Peled, A., V. Grabovsky, L. Habler, 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): 1199-1211.
Peled, A., O. Kollet, T. Ponomaryov, 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): 3289-3296.
Peled, A., I. Petit, O. Kollet, et al. (1999). "Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4." Science **283**(5403): 845-848.
Petit, I., M. Szyper-Kravitz, A. Nagler, et al. (2002). "G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4." Nat Immunol **3**(7): 687-694.
Pettengell, R., T. Luft, R. Henschler, et al. (1994). "Direct comparison by limiting dilution analysis of long-term culture-initiating cells in human bone marrow, umbilical cord blood, and blood stem cells." Blood **84**(11): 3653-3659.
Petzer, A. L., D. E. Hogge, P. M. Landsdorp, et al. (1996). "Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long-term-culture-initiating cells) in vitro and their expansion in defined medium." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(4): 1470-1474.
Pflumio, F., B. Izac, A. Katz, et al. (1996). "Phenotype and function of human hematopoietic cells engrafting immune-deficient CB17-severe combined immunodeficiency mice and nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice after transplantation of human cord blood mononuclear cells." Blood **88**(10): 3731-3740.
Piacibello, W., F. Sanavio, A. Severino, et al. (1999). "Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34(+) cord blood cells after ex vivo expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells." Blood **93**(11): 3736-3749.
Pierre-Louis, O., D. Clay, P. Brunet de la Grange, et al. (2009). "Dual SP/ALDH functionalities refine the human hematopoietic Lin-CD34+CD38- stem/progenitor cell compartment." Stem Cells **27**(10): 2552-2562.
Pietras, E. M., M. R. Warr and E. Passegue (2011). "Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells." J Cell Biol **195**(5): 709-720.
Ploemacher, R. E., J. P. van der Sluijs, J. S. Voerman, et al. (1989). "An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse." Blood **74**(8): 2755-2763.
Poncin, G., A. Beaulieu, C. Humblet, et al. (2012). "Characterization of spontaneous bone marrow recovery after sublethal total body irradiation: importance of the osteoblastic/adipocytic balance." PLoS One **7**(2): e30818.
Ponta, H., L. Sherman and P. A. Herrlich (2003). "CD44: from adhesion molecules to signalling regulators." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(1): 33-45.
Preffer, F. I., D. Dombkowski, M. Sykes, et al. (2002). "Lineage-negative side-population (SP) cells with restricted hematopoietic capacity circulate in normal human adult blood: immunophenotypic and functional characterization." Stem Cells **20**(5): 417-427.

Purton, L. E. and D. T. Scadden (2007). "Limiting factors in murine hematopoietic stem cell assays." Cell Stem Cell **1**(3): 263-270.
Qian, H., N. Buza-Vidas, C. D. Hyland, et al. (2007). "Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells." Cell Stem Cell **1**(6): 671-684.
Raaijmakers, M. H. (2011). "Niche contributions to oncogenesis: emerging concepts and implications for the hematopoietic system." Haematologica **96**(7): 1041-1048.
Raaijmakers, M. H., S. Mukherjee, S. Guo, et al. (2010). "Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia." Nature **464**(7290): 852-857.
Rafii, S., R. Mohle, F. Shapiro, et al. (1997). "Regulation of hematopoiesis by microvascular endothelium." Leuk Lymphoma **27**(5-6): 375-386.
Ramalho-Santos, M., S. Yoon, Y. Matsuzaki, et al. (2002). ""Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells." Science **298**(5593): 597-600.
Ramos, P., C. Casu, S. Gardenghi, et al. (2013). "Macrophages support pathological erythropoiesis in polycythemia vera and beta-thalassemia." Nat Med **19**(4): 437-445.
Ratajczak, J., R. Reca, M. Kucia, et al. (2004). "Mobilization studies in mice deficient in either C3 or C3a receptor (C3aR) reveal a novel role for complement in retention of hematopoietic stem/progenitor cells in bone marrow." Blood **103**(6): 2071-2078.
Ratajczak, M. Z., H. Lee, M. Wysoczynski, et al. (2010). "Novel insight into stem cell mobilization-plasma sphingosine-1-phosphate is a major chemoattractant that directs the egress of hematopoietic stem progenitor cells from the bone marrow and its level in peripheral blood increases during mobilization due to activation of complement cascade/membrane attack complex." Leukemia **24**(5): 976-985.
Rice, K. L., I. Hormaeche and J. D. Licht (2007). "Epigenetic regulation of normal and malignant hematopoiesis." Oncogene **26**(47): 6697-6714.
Robb, L., I. Lyons, R. Li, et al. (1995). "Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(15): 7075-7079.
Robinson, S. N., S. M. Seina, J. C. Gohr, et al. (2005). "Evidence for a qualitative hierarchy within the Hoechst-33342 'side population' (SP) of murine bone marrow cells." Bone Marrow Transplant **35**(8): 807-818.
Roshal, M., S. Chien, M. Othus, et al. (2013). "The proportion of CD34(+)CD38(low or neg) myeloblasts, but not side population frequency, predicts initial response to induction therapy in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia." Leukemia **27**(3): 728-731.
Ross, D. D., W. Yang, L. V. Abruzzo, et al. (1999). "Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines." J Natl Cancer Inst **91**(5): 429-433.
Sacchetti, B., A. Funari, S. Michienzi, et al. (2007). "Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment." Cell **131**(2): 324-336.
Sackstein, R. (2011). "The biology of CD44 and HCELL in hematopoiesis: the 'step 2-bypass pathway' and other emerging perspectives." Curr Opin Hematol **18**(4): 239-248.
Saito, Y., N. Uchida, S. Tanaka, et al. (2010). "Induction of cell cycle entry eliminates human leukemia stem cells in a mouse model of AML." Nat Biotechnol **28**(3): 275-280.

Samokhvalov, I. M., N. I. Samokhvalova and S. Nishikawa (2007). "Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis." Nature **446**(7139): 1056-1061.
Sansonetti, A., S. Bourcier, L. Durand, et al. (2012). "CD44 activation enhances acute monoblastic leukemia cell survival via Mcl-1 upregulation." Leuk Res **36**(3): 358-362.
Santaguida, M., K. Schepers, B. King, et al. (2009). "JunB protects against myeloid malignancies by limiting hematopoietic stem cell proliferation and differentiation without affecting self-renewal." Cancer Cell **15**(4): 341-352.
Sarry, J. E., K. Murphy, R. Perry, et al. (2011). "Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2Rgammac-deficient mice." J Clin Invest **121**(1): 384-395.
Sato, T., N. Onai, H. Yoshihara, et al. (2009). "Interferon regulatory factor-2 protects quiescent hematopoietic stem cells from type I interferon-dependent exhaustion." Nat Med **15**(6): 696-700.
Scandura, J. M., P. Boccuni, J. Massague, et al. (2004). "Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(42): 15231-15236.
Scharenberg, C. W., M. A. Harkey and B. Torok-Storb (2002). "The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors." Blood **99**(2): 507-512.
Schinkel, A. H. and J. W. Jonker (2003). "Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview." Adv Drug Deliv Rev **55**(1): 3-29.
Schmidt, C., G. Steinbach, R. Decking, et al. (2003). "IL-6 and PGE2 release by human osteoblasts on implant materials." Biomaterials **24**(23): 4191-4196.
Schofield, R. (1978). "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell." Blood Cells **4**(1-2): 7-25.
Scott, L. M., G. V. Priestley and T. Papayannopoulou (2003). "Deletion of alpha4 integrins from adult hematopoietic cells reveals roles in homeostasis, regeneration, and homing." Mol Cell Biol **23**(24): 9349-9360.
Semenza, G. L. (2001). "HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus." Cell **107**(1): 1-3.
Semerad, C. L., M. J. Christopher, F. Liu, et al. (2005). "G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow." Blood **106**(9): 3020-3027.
Shafer, J. A., C. R. Cruz, A. M. Leen, et al. (2010). "Antigen-specific cytotoxic T lymphocytes can target chemoresistant side-population tumor cells in Hodgkin lymphoma." Leuk Lymphoma **51**(5): 870-880.
Shao, Y., S. Y. Kim, D. Shin, et al. (2010). "TXNIP regulates germinal center generation by suppressing BCL-6 expression." Immunol Lett **129**(2): 78-84.
Shibata, F., Y. Goto-Koshino, Y. Morikawa, et al. (2009). "Roundabout 4 is expressed on hematopoietic stem cells and potentially involved in the niche-mediated regulation of the side population phenotype." Stem Cells **27**(1): 183-190.
Shivdasani, R. A., Y. Fujiwara, M. A. McDevitt, et al. (1997). "A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development." Embo J **16**(13): 3965-3973.
Siczkowski, M., D. Clarke and M. Y. Gordon (1992). "Binding of primitive hematopoietic progenitor cells to marrow stromal cells involves heparan sulfate." Blood **80**(4): 912-919.

Sipkins, D. A., X. Wei, J. W. Wu, et al. (2005). "In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment." Nature **435**(7044): 969-973.
Sirin, O., G. L. Lukov, R. Mao, et al. (2010). "The orphan nuclear receptor Nurr1 restricts the proliferation of haematopoietic stem cells." Nat Cell Biol **12**(12): 1213-1219.
Sorrentino, B. P. (2004). "Clinical strategies for expansion of haematopoietic stem cells." Nat Rev Immunol **4**(11): 878-888.
Spoo, A. C., M. Lubbert, W. G. Wierda, et al. (2007). "CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia." Blood **109**(2): 786-791.
Staller, P., J. Sulitkova, J. Lisztwan, et al. (2003). "Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL." Nature **425**(6955): 307-311.
Staud, F. and P. Pavek (2005). "Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)." Int J Biochem Cell Biol **37**(4): 720-725.
Stier, S., Y. Ko, R. Forkert, et al. (2005). "Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size." J Exp Med **201**(11): 1781-1791.
Storms, R. W., M. A. Goodell, A. Fisher, et al. (2000). "Hoechst dye efflux reveals a novel CD7(+)CD34(-) lymphoid progenitor in human umbilical cord blood." Blood **96**(6): 2125-2133.
Sudhoff, T. and D. Sohngen (2002). "Circulating endothelial adhesion molecules (sE-selectin, sVCAM-1 and sICAM-1) during rHuG-CSF-stimulated stem cell mobilization." J Hematother Stem Cell Res **11**(1): 147-151.
Sugiyama, T., H. Kohara, M. Noda, et al. (2006). "Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches." Immunity **25**(6): 977-988.
Sutherland, H. J., C. J. Eaves, A. C. Eaves, et al. (1989). "Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro." Blood **74**(5): 1563-1570.
Szilvassy, S. J., R. K. Humphries, P. M. Lansdorp, et al. (1990). "Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(22): 8736-8740.
Tabe, Y., L. Jin, Y. Tsutsumi-Ishii, et al. (2007). "Activation of integrin-linked kinase is a critical prosurvival pathway induced in leukemic cells by bone marrow-derived stromal cells." Cancer Res **67**(2): 684-694.
Tadokoro, Y., H. Ema, M. Okano, et al. (2007). "De novo DNA methyltransferase is essential for self-renewal, but not for differentiation, in hematopoietic stem cells." J Exp Med **204**(4): 715-722.
Taichman, R. S. and S. G. Emerson (1998). "The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment." Stem Cells **16**(1): 7-15.
Takakura, N., X. L. Huang, T. Naruse, et al. (1998). "Critical role of the TIE2 endothelial cell receptor in the development of definitive hematopoiesis." Immunity **9**(5): 677-686.
Takeda, S., F. Elefteriou, R. Levasseur, et al. (2002). "Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system." Cell **111**(3): 305-317.
Taniguchi, H., T. Toyoshima, K. Fukao, et al. (1996). "Presence of hematopoietic stem cells in the adult liver." Nat Med **2**(2): 198-203.
Taussig, D. C., F. Miraki-Moud, F. Anjos-Afonso, et al. (2008). "Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells." Blood **112**(3): 568-575.

Taussig, D. C., J. Vargaftig, F. Miraki-Moud, et al. (2010). "Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction." Blood **115**(10): 1976-1984.

Tavor, S., I. Petit, S. Porozov, et al. (2004). "CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice." Cancer Res **64**(8): 2817-2824.

Teixido, J., M. E. Hemler, J. S. Greenberger, 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): 358-367.

Thankamony, S. P. and R. Sackstein (2011). "Enforced hematopoietic cell E- and L-selectin ligand (HCELL) expression primes transendothelial migration of human mesenchymal stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(6): 2258-2263.

Thompson, B. J., V. Jankovic, J. Gao, et al. (2008). "Control of hematopoietic stem cell quiescence by the E3 ubiquitin ligase Fbw7." J Exp Med **205**(6): 1395-1408.

Thoren, L. A., K. Liuba, D. Bryder, et al. (2008). "Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells." J Immunol **180**(4): 2045-2053.

Tipping, A. J., C. Pina, A. Castor, et al. (2009). "High GATA-2 expression inhibits human hematopoietic stem and progenitor cell function by effects on cell cycle." Blood **113**(12): 2661-2672.

To, K. K., O. Polgar, L. M. Huff, et al. (2008). "Histone modifications at the ABCG2 promoter following treatment with histone deacetylase inhibitor mirror those in multidrug-resistant cells." Mol Cancer Res **6**(1): 151-164.

To, K. K., Z. Zhan and S. E. Bates (2006). "Aberrant promoter methylation of the ABCG2 gene in renal carcinoma." Mol Cell Biol **26**(22): 8572-8585.

To, L. B., D. N. Haylock, R. J. Kimber, et al. (1984). "High levels of circulating haemopoietic stem cells in very early remission from acute non-lymphoblastic leukaemia and their collection and cryopreservation." Br J Haematol **58**(3): 399-410.

Toksoz, D., K. M. Zsebo, K. A. Smith, et al. (1992). "Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(16): 7350-7354.

Toole, B. P. and M. G. Slomiany (2008). "Hyaluronan, CD44 and Emmprin: partners in cancer cell chemoresistance." Drug Resist Updat **11**(3): 110-121.

Tothova, Z., R. Kollipara, B. J. Huntly, et al. (2007). "FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress." Cell **128**(2): 325-339.

Trowbridge, J. J., J. W. Snow, J. Kim, et al. (2009). "DNA methyltransferase 1 is essential for and uniquely regulates hematopoietic stem and progenitor cells." Cell Stem Cell **5**(4): 442-449.

Turpen, J. B., C. M. Knudson and P. S. Hoefen (1981). "The early ontogeny of hematopoietic cells studied by grafting cytogenetically labeled tissue anlagen: localization of a prospective stem cell compartment." Dev Biol **85**(1): 99-112.

Uchida, N., T. Fujisaki, A. C. Eaves, et al. (2001). "Transplantable hematopoietic stem cells in human fetal liver have a CD34(+) side population (SP)phenotype." J Clin Invest **108**(7): 1071-1077.

Uchida, N. and I. L. Weissman (1992). "Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1lo Lin- Sca-1+ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow." J Exp Med **175**(1): 175-184.

Ueno, H. and I. L. Weissman (2010). "The origin and fate of yolk sac hematopoiesis: application of chimera analyses to developmental studies." Int J Dev Biol **54**(6-7): 1019-1031.

Ulyanova, T., L. M. Scott, G. V. Priestley, 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.

Umemoto, T., M. Yamato, J. Ishihara, et al. (2012). "Integrin-alphavbeta3 regulates thrombopoietin-mediated maintenance of hematopoietic stem cells." Blood **119**(1): 83-94.

Umemoto, T., M. Yamato, Y. Shiratsuchi, et al. (2006). "Expression of Integrin beta3 is correlated to the properties of quiescent hemopoietic stem cells possessing the side population phenotype." J Immunol **177**(11): 7733-7739.

van Os, R., L. M. Kamminga, A. Ausema, et al. (2007). "A Limited role for p21Cip1/Waf1 in maintaining normal hematopoietic stem cell functioning." Stem Cells **25**(4): 836-843.

van Rhenen, A., G. A. van Dongen, A. Kelder, et al. (2007). "The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells." Blood **110**(7): 2659-2666.

Varnum-Finney, B., L. M. Halasz, M. Sun, et al. (2011). "Notch2 governs the rate of generation of mouse long- and short-term repopulating stem cells." J Clin Invest **121**(3): 1207-1216.

Varnum-Finney, B., L. Xu, C. Brashem-Stein, et al. (2000). "Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling." Nat Med **6**(11): 1278-1281.

Vasiliou, V., K. Vasiliou and D. W. Nebert (2009). "Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family." Hum Genomics **3**(3): 281-290.

Vega, F., Y. Davuluri, J. H. Cho-Vega, et al. (2010). "Side population of a murine mantle cell lymphoma model contains tumour-initiating cells responsible for lymphoma maintenance and dissemination." J Cell Mol Med **14**(6B): 1532-1545.

Velders, G. A., J. F. Pruijt, P. Verzaal, 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): 327-333.

Verfaillie, C. M., A. Benis, J. Iida, et al. (1994). "Adhesion of committed human hematopoietic progenitors to synthetic peptides from the C-terminal heparin-binding domain of fibronectin: cooperation between the integrin alpha 4 beta 1 and the CD44 adhesion receptor." Blood **84**(6): 1802-1811.

Vermeulen, M., F. Le Pesteur, M. C. Gagnerault, et al. (1998). "Role of adhesion molecules in the homing and mobilization of murine hematopoietic stem and progenitor cells." Blood **92**(3): 894-900.

Viatour, P., T. C. Somervaille, S. Venkatasubrahmanyam, et al. (2008). "Hematopoietic stem cell quiescence is maintained by compound contributions of the retinoblastoma gene family." Cell Stem Cell **3**(4): 416-428.

Visnjic, D., Z. Kalajzic, D. W. Rowe, et al. (2004). "Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency." Blood **103**(9): 3258-3264.

Wagner, W., F. Wein, C. Roderburg, et al. (2008). "Adhesion of human hematopoietic progenitor cells to mesenchymal stromal cells involves CD44." Cells Tissues Organs **188**(1-2): 160-169.

Walkley, C. R., G. H. Olsen, S. Dworkin, et al. (2007). "A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency." Cell **129**(6): 1097-1110.
Walkley, C. R., J. M. Shea, N. A. Sims, et al. (2007). "Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment." Cell **129**(6): 1081-1095.
Wang, L. D. and A. J. Wagers (2011). "Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(10): 643-655.
Wang, Z., G. Li, W. Tse, et al. (2009). "Conditional deletion of STAT5 in adult mouse hematopoietic stem cells causes loss of quiescence and permits efficient nonablative stem cell replacement." Blood **113**(20): 4856-4865.
Wardyn, G. G., S. I. Rennard, S. K. Brusnahan, et al. (2008). "Effects of exercise on hematological parameters, circulating side population cells, and cytokines." Exp Hematol **36**(2): 216-223.
Warr, M. R., E. M. Pietras and E. Passegue (2011). "Mechanisms controlling hematopoietic stem cell functions during normal hematopoiesis and hematological malignancies." Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med **3**(6): 681-701.
Wei, J., M. Wunderlich, C. Fox, et al. (2008). "Microenvironment determines lineage fate in a human model of MLL-AF9 leukemia." Cancer Cell **13**(6): 483-495.
Wein, F., L. Pietsch, R. Saffrich, et al. (2010). "N-cadherin is expressed on human hematopoietic progenitor cells and mediates interaction with human mesenchymal stromal cells." Stem Cell Res **4**(2): 129-139.
Weksberg, D. C., S. M. Chambers, N. C. Boles, et al. (2008). "CD150- side population cells represent a functionally distinct population of long-term hematopoietic stem cells." Blood **111**(4): 2444-2451.
Wilson, A., M. J. Murphy, T. Oskarsson, et al. (2004). "c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation." Genes Dev **18**(22): 2747-2763.
Wilson, A., G. M. Oser, M. Jaworski, et al. (2007). "Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches." Ann N Y Acad Sci **1106**: 64-75.
Wilson, A. and A. Trumpp (2006). "Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches." Nat Rev Immunol **6**(2): 93-106.
Winkler, I. G., V. Barbier, B. Nowlan, et al. (2012). "Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance." Nat Med.
Winkler, I. G., V. Barbier, R. Wadley, et al. (2010). "Positioning of bone marrow hematopoietic and stromal cells relative to blood flow in vivo: serially reconstituting hematopoietic stem cells reside in distinct nonperfused niches." Blood **116**(3): 375-385.
Winkler, I. G., N. A. Sims, A. R. Pettit, et al. (2010). "Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs." Blood **116**(23): 4815-4828.
Winter, O., K. Moser, E. Mohr, et al. (2010). "Megakaryocytes constitute a functional component of a plasma cell niche in the bone marrow." Blood **116**(11): 1867-1875.
Wiseman, D. H. (2011). "Donor cell leukemia: a review." Biol Blood Marrow Transplant **17**(6): 771-789.
Wong, K., H. T. Park, J. Y. Wu, et al. (2002). "Slit proteins: molecular guidance cues for cells ranging from neurons to leukocytes." Curr Opin Genet Dev **12**(5): 583-591.

Wright, D. E., A. J. Wagers, A. P. Gulati, et al. (2001). "Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells." Science **294**(5548): 1933-1936.
Wu, C. and B. A. Alman (2008). "Side population cells in human cancers." Cancer Lett **268**(1): 1-9.
Wulf, G. G., R. Y. Wang, I. Kuehnle, et al. (2001). "A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia." Blood **98**(4): 1166-1173.
Xie, Y., T. Yin, W. Wiegraebe, et al. (2009). "Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging." Nature **457**(7225): 97-101.
Xu, M. J., S. Matsuoka, F. C. Yang, et al. (2001). "Evidence for the presence of murine primitive megakaryocytopoiesis in the early yolk sac." Blood **97**(7): 2016-2022.
Yamamoto, K., S. Suzu, Y. Yoshidomi, et al. (2007). "Erythroblasts highly express the ABC transporter Bcrp1/ABCG2 but do not show the side population (SP) phenotype." Immunol Lett **114**(1): 52-58.
Yamazaki, S., H. Ema, G. Karlsson, et al. (2011). "Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche." Cell **147**(5): 1146-1158.
Yamazaki, S., A. Iwama, S. Takayanagi, et al. (2009). "TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation." Blood **113**(6): 1250-1256.
Yang, B., S. Kirby, J. Lewis, et al. (1995). "A mouse model for beta 0-thalassemia." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(25): 11608-11612.
Yao, L., T. Yokota, L. Xia, et al. (2005). "Bone marrow dysfunction in mice lacking the cytokine receptor gp130 in endothelial cells." Blood **106**(13): 4093-4101.
Yong, K. L., M. Watts, N. Shaun Thomas, 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): 1196-1205.
Yoshihara, H., F. Arai, K. Hosokawa, et al. (2007). "Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche." Cell Stem Cell **1**(6): 685-697.
Zanjani, E. D., G. Almeida-Porada, J. L. Ascensao, et al. (1997). "Transplantation of hematopoietic stem cells in utero." Stem Cells **15 Suppl 1**: 79-92; discussion 93.
Zanjani, E. D., G. Almeida-Porada, A. G. Livingston, 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): 353-360.
Zanjani, E. D., G. Almeida-Porada, A. G. Livingston, et al. (2003). "Reversible expression of CD34 by adult human bone marrow long-term engrafting hematopoietic stem cells." Exp Hematol **31**(5): 406-412.
Zanjani, E. D., A. W. Flake, H. Rice, et al. (1994). "Long-term repopulating ability of xenogeneic transplanted human fetal liver hematopoietic stem cells in sheep." J Clin Invest **93**(3): 1051-1055.
Zeng, H., R. Yucel, C. Kosan, et al. (2004). "Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells." Embo J **23**(20): 4116-4125.
Zeng, Z., Y. X. Shi, I. J. Samudio, et al. (2009). "Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML." Blood **113**(24): 6215-6224.
Zhang, B., M. Li, T. McDonald, et al. (2013). "Microenvironmental protection of CML stem and progenitor cells from tyrosine kinase inhibitors through N-cadherin and Wnt-beta-catenin signaling." Blood **121**(10): 1824-1838.

Zhang, J., J. C. Grindley, T. Yin, et al. (2006). "PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention." Nature **441**(7092): 518-522.

Zhang, J., C. Niu, L. Ye, et al. (2003). "Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size." Nature **425**(6960): 836-841.

Zhang, W., J. Mojsilovic-Petrovic, M. F. Andrade, et al. (2003). "The expression and functional characterization of ABCG2 in brain endothelial cells and vessels." Faseb J **17**(14): 2085-2087.

Zheng, J., H. Huynh, M. Umikawa, et al. (2011). "Angiopoietin-like protein 3 supports the activity of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche." Blood **117**(2): 470-479.

Zhou, S., J. J. Morris, Y. Barnes, et al. (2002). "Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(19): 12339-12344.

Zhou, S., J. D. Schuetz, K. D. Bunting, et al. (2001). "The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype." Nat Med **7**(9): 1028-1034.

Ziegler, B. L., M. Valtieri, G. A. Porada, et al. (1999). "KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells." Science **285**(5433): 1553-1558.

Zou, Y. R., A. H. Kottmann, M. Kuroda, et al. (1998). "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development." Nature **393**(6685): 595-599.

RESUME

L'hématopoïèse est un processus finement régulé pour permettre sa pérennité et son adaptation aux contraintes physiologiques et pathologiques. Ce potentiel repose en grande partie sur les capacités de quiescence, auto-renouvellement, division asymétrique et multipotence des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les CSH et progéniteurs hématopoïétiques (CSPH) sont principalement régulés de façon extrinsèque au sein des niches hématopoïétiques médullaires et cette régulation fait intervenir, des contacts intercellulaires et des facteurs diffusibles. Le phénotype « side-population » (SP), secondaire à l'efflux actif d'un colorant fluorescent (Hoechst 33342) par des pompes de type *multidrugresistance*, est une caractéristique des cellules souches de la plupart des tissus. Au sein de l'hématopoïèse, le phénotype SP est un excellent moyen pour identifier les CSH murines et est associé à leur quiescence et à leur adhésion à la niche endostéale, mais sa valeur comme marqueur des CSH est plus discutée chez l'homme. Les cellules SP, de par leur nature, sont également étudiées en oncologie, et sont associées aux cellules tumorales les plus résistantes et les plus tumorogènes. La compréhension des mécanismes régulant la fonctionnalité SP devrait permettre d'ouvrir des pistes en physiologie quand à la compréhension de la régulation des CSPH par les niches mésenchymateuses et en pathologie pour cibler les mécanismes de chimiorésistance.

Dans ce travail nous montrons pour la première fois chez l'homme que l'acquisition du phénotype SP est un phénomène dynamique et versatile sous le contrôle du stroma médullaire. Le stroma médullaire est en effet capable de maintenir le phénotype SP de CSPH médullaires et d'induire le phénotype SP de CSPH circulants. L'acquisition du phénotype SP par les cellules circulantes nécessite à la fois un « nichage » au sein du stroma et des facteurs diffusibles. Les cellules circulantes capables d'acquérir le phénotype SP contiennent des CSPH au regard de (i) leur expression du CD34, (ii) leur richesse en cellules quiescentes, (iii) leur capacité clonogénique et proliférative en cultures secondaires, (iv) leur expression des gènes de « nichage » et de « souchitude », (v) leur capacité de migration en réponse à un gradient de CXCL12, (vi) leur activité LT-SRC *in vivo*. De plus nous avons mis en évidence, au sein de ces CSPH $SP^{+}CD34^{+}$ révélés par le stroma médullaire, une sous-population $CD44^{-/faible}$ qui pourrait contenir les cellules plus immatures en raison de sa quiescence et de l'intensité de son efflux du Hoechst 33342. Les études mécanistiques montrent que l'acquisition du phénotype SP par les cellules circulantes est sous la dépendance de l'intégrine VLA-4 et du CD44. La transduction du signal implique des protéines G et la famille des Src-kinases. Nous montrons également que le stroma médullaire peut induire/maintenir/amplifier la fonctionnalité SP de blastes circulants de leucémie aigüe myéloblastique de façon ß1-intégrine dépendante et que cette fonctionnalité est associée à une capacité d'efflux de Mitoxantrone. Ce mécanisme de modulation de l'activité d'ABC-transporteurs par l'adhésion au stroma correspond à un mécanisme encore jamais décrit de CAM-DR.