

« Université de Franche-Comté - UFR de Médecine et de Pharmacie »

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE

Ecole doctorale Homme, Environnement, Santé

**Effet de l'association des Basses Concentrations d'O₂ et des Cellules Stromales
Mésenchymateuses sur l'Expansion *ex vivo* des Cellules Souches et
Progénitrices Hématopoïétiques**

THESE

« Présentée publiquement »

Le 02 octobre 2012

Par **Mohammad HAMMOUD**

En vue du grade de **Docteur de l'Université de Franche-Comté**

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

JURY

Pr Jean-Jacques LATAILLADE (Rapporteur)

Pr Jorge DOMENECH (Rapporteur)

Pr Pierre TIBERGHIE (Examineur)

Dr Bruno DELORME (Examineur- président de Jury)

Dr Zoran IVANOVIC (Directeur de thèse)

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le ministère de l'Enseignement Supérieur de Syrie pour sa participation financière fondamentale sans laquelle je n'aurais pu réaliser ce travail.

Je remercie les membres du jury pour le temps consacré à la lecture de ce manuscrit :

Monsieur le Professeur Pierre TIBERGHIEN, pour sa participation au jury.

Monsieur le Professeur Jorge DOMENECH pour avoir accepté le lourd travail de rapporteur de ce mémoire de thèse et pour ses conseils et ses remarques pertinentes.

Monsieur le Professeur Jean-Jacques LATAILLADE pour avoir accepté d'évaluer ce travail également en qualité de rapporteur.

Vos corrections et vos critiques étaient cruciales pour améliorer ce mémoire ainsi que cette recherche.

Monsieur le Docteur Bruno DELORME, président de Jury, pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

J'adresse mes sincères remerciements au Docteur Zoran IVANOVIC, mon Directeur de thèse, pour ses conseils, ses encouragements, sa disponibilité, sa gentillesse, sa patience (je sais que j'étais fatigant!), son humanité, son appui scientifique et moral ainsi que pour sa personnalité qui marque les esprits. J'en ai beaucoup appris de son esprit critique ($CD34^+ \neq$ cellule souche, basses concentrations d' $O_2 \neq$ hypoxie, cellule souche \neq phénotype, cellule souche = état fonctionnel ...) cela fait partie de l'alphabet de Zoran et il est impossible de les oublier. Votre raisonnement concernant la culture en hypoxie est séduisant.

Il y a un an, avec mes difficultés personnelles, j'ai cru ne plus pouvoir continuer ce travail - si j'ai pu y résister c'est grâce à son soutien. Je suis vraiment reconnaissant pour vous Zoran!

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur Pierre TIBERGHIEN pour m'avoir accueilli au sein de son équipe Inserm 645 depuis le Master jusqu'à la clôture de ma thèse.

Je remercie le Professeur Jean-Michel BOIRON et le Docteur Azzedine ASSAL, de m'avoir autorisé à réaliser cette thèse à l'EFS-AL site de Bordeaux.

Je tiens à remercier les membres du Laboratoire de Recherche & de Développement de l'EFS-AL- Bordeaux, qui ont été pour moi comme une deuxième famille avec laquelle j'ai passé le plus clair de mon temps ! Bien que mon sujet principal soit un peu étouffant (Hypoxie), l'ambiance au labo était très fraîche et pleine d'oxygène ! :

A Marija Vlaski, je la remercie particulièrement de tout mon cœur pour sa contribution à l'élaboration de ce travail depuis le début. Tu m'as beaucoup aidé tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Nous n'étions pas bavards au laboratoire !, mais toutes tes remarques, tes commentaires ont toujours été très importants et très utiles pour moi.

A Philippe Brunet de la Grange, je n'ai pas eu le temps de te remercier avant ; d'ailleurs, connaissant ton caractère je pense que tu n'en attendais pas plus. Je voudrais juste te dire que ta présence était déterminante indispensable dans les moments cruciaux de cette thèse. Ta participation était juste essentielle pour la réalisation de l'article principal de celle-ci.

A Jean Chevalere, le vrai expert en cellules mésenchymateuses, en techniques expérimentales et dans la vie. Vous aviez toujours une réponse à toutes nos questions. J'ai appris beaucoup à travers nos discussions à la fois passionnantes et très enrichissantes agrémentée de moments conviviaux et chaleureux.

A Pascale Duchez. C'est elle qui a mis au point la technique de culture sur laquelle je me suis basé pour effectuer mon expérimentation et obtenir mes résultats.

A Laura Rodrigues, la plus jeune du labo, toujours souriante et radieuse malgré la charge de travail. Merci pour ses retouches féminines magiques sur ma présentation de soutenance.

A Fontanet Bijou, énergie enthousiasme extraordinaire, toujours disponible pour nous apporter de l'aide... personnalité inoubliable de qualité très rare.

A Elisabeth Volkman, merci surtout pour tes corrections finales.

Je remercie le personnel de l'EFS de Bordeaux, en particulier le service de Contrôle Qualité dirigé par le Docteur Xavier Lafarge qui était très impliqué dans notre travail, le service HLA dirigé par le Docteur Dominique Fizet, le service de Thérapie Cellulaire dirigé par le Docteur Bernard Dazey et le service de Ressource Humaines dirigé par le Docteur Philippe Juret.

Je remercie l'équipe du Professeur Vincent Praloran, et tout particulièrement Monsieur le Professeur Praloran pour ses remarques pendant mes présentations. A Yann, à Arnaud, à Amélie ...

Merci au personnel de l'UMR 5164 - partie immuno notamment véronique Conrade qui effectue une partie de ses manipes à l'EFS.

Merci à l'équipe du Professeur Patrick Blanco pour la réalisation d'une partie des mesures des cytokines.

Il me reste à remercier ma petite famille : je te remercie Amal, ma chère épouse, d'avoir supporté mon absence et de m'avoir aidé dans la réalisation de ce manuscrit, de m'avoir remplacé sur le front syrien ! Et tout cela malgré la préparation de ton Master.

Je suis désolé Lamar, mon cher fils, je t'assure que nous trouverons le temps pour jouer ensemble et t'accompagner pour une fois à l'école.

Je te remercie Ghoulba, mon cousin, pour ton aide à tous les niveaux !

Je ne sais pas avec toutes les nouvelles pressions que j'ai sur tous les niveaux dans mon environnement et mon micro-environnement ce que je vais devenir. Est-ce que cela va m'amener à l'autorenouvellement ou à l'engagement dans un processus de sénescence et d'apoptose !?

Ce travail est dédié à ma famille en Syrie, ma mère, mon père, à Raghda, Dalal, Rima Nidal, Ebtissam, Nisrin, Ali, Kïnan et surtout à Arrouj ...

Une petite pensée va à mes compatriotes Syriens en espérant qu'on trouvera une fin heureuse dans la résolution des conflits.

TABLE DES MATIERES

Liste des Figures	8
Liste des Tableaux	10
Abréviations	11
INTRODUCTION.....	16
I. Hématopoïèse	17
I.A- Ontogénie des Cellules Souches Hématopoïétiques.....	17
I.B- Hiérarchie du système hématopoïétique	18
I.B.1- Les Cellules Souches Hématopoïétiques	18
I.B.2- Les progéniteurs Hématopoïétiques	22
I.B.3- Les précurseurs	23
I.B.4- Les cellules matures	23
I.C- Identification des cellules souches hématopoïétiques.....	24
I.C.1- Caractérisation phénotypique des CSH.....	25
I.C.1.1 Marqueurs membranaires positifs	25
I.C.1.1.1. L'antigène CD34	25
I.C.1.1.2. L'antigène CD133.....	25
I.C.1.1.3 L'antigène CD90 (Thy1.1).....	27
I.C.1.1.4 L'antigène CD117 (c-Kit).....	27
I.C.1.2 Marqueurs membranaires négatifs	28
I.C.1.2.1. Le marqueur Lin-.....	28
I.C.1.2.2. L'antigène CD38.....	28
I.C.1.2.3. La molécule HLA-DR.....	28
I.C.2- Caractérisation métabolique des CSH.....	27
I.C.2.1 L'activité de l'enzyme ALDH.....	29
I.C.2.2 L'activité des molécules ROS	20
I.C.2.3 Le phénotype <i>Side Population</i>	20
I.C.2.4 Le cycle cellulaire.....	31
I.C.3- Caractérisation fonctionnelle.....	33
I.C.3.1 Tests <i>in vitro</i>	33
I.C.3.2 Tests <i>in vivo</i>	35
II. Microenvironnement médullaire et Cellules Souches/Stromales Mésoenchymateuses.....	40
II.A- La niche hématopoïétique	40
II.B- Composants et régulation du microenvironnement médullaire	43
II.B.1- Le composant cellulaire.....	44
II.B.1.1. Cellules d'origine mésoenchymateuse.....	44
II.B.1.1.1. Les Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM)	44
II.B.1.1.2. Les Ostéoblastes	45
II.B.1.1.3. Les Cellules réticulaires	46
II.B.1.1.4. Les Adipocytes	47
II.B.1.2. Cellules d'origine hématopoïétique.....	47
II.B.1.2.1. Les Ostéoclastes	47
II.B.1.2.2. Les Cellules Endothéliales (CE).....	47
II.B.1.2.3. Les Macrophage.....	48
II.B.2- Matrice extracellulaire	49

II.B.3- Facteurs de Croissance et Cytokines.....	49
II.B.3.1. Les cytokines stimulantes.....	50
II.B.3.1.1. <i>Stem Cell Factor</i> (SCF) ou C-kit Ligand (KL).....	50
II.B.3.1.2- Flt-3 Ligand (FL).....	50
II.B.3.1.3. Thrombopoïétine (TPO).....	51
II.B.3.1.4. L'interleukine 6 (IL-6).....	52
II.B.3.1.5. <i>Colony Stimulating Factors</i> (CSF).....	52
II.B.3.1.6. L'interleukine 3 (IL-3).....	52
II.B.3.1.7. L'Erythropoïétine (EPO).....	54
II.B.3.1.8. L'interleukine 5 (IL-5).....	54
II.B.3.1.9. Autres facteurs stimulateurs.....	54
II.B.3.2. Les cytokines inhibitrices.....	55
II.B.3.2.1. <i>Transforming Growth Factor</i> β (TGF- β)	55
II.B.3.2.2. L'interleukine 10 (IL-10).....	55
II.B.3.2.3. <i>Tumor Necrosis Factor</i> α (TN F- α).....	55
II.B.3.2.4. <i>Platelet Factor 4</i> (PF4).....	55
II.B.3.2.5. <i>Macrophage-Inflammatory-Protein 1α</i> (MIP-1 α).....	55
II.B.4- Autres facteurs intervenant dans la régulation de l'hématopoïèse.....	56
II.B.4.1. Les chimiokines.....	56
II.B.4.2. Les molécules d'adhésion.....	57
II.B.4.3. Signalisations impliquées dans la régulation de l'hématopoïèse.....	59
II.B.4.3.1. Les voies morphogènes	59
II.B.4.3.2. L'axe Tie2/Ang-1 et Cdh2/integrin β 1/c-MYC	61
II.B.4.3.3. Le signal TPO/Mpl dans les CSH.....	61
II.B.4.3.4. Les protéines BMP.....	61
II.B.4.3.5. Les facteurs de transcription.....	62
III. Cellules Stromales mésenchymateuses (CSM)	64
III.A- Sources et caractéristiques des CSM.....	65
III.B- Les propriétés des CSM	67
III.C- Le rôle des CSM dans l'hématopoïèse <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i>	69
III.C.1- Mécanisme d'action de CSM dans l'hématopoïèse.....	70
III.C.1.1. Sécrétion de cytokines par les CSM.....	70
III.C.1.1.1. VEGF-A.....	71
III.C.1.1.2. FGF-2.....	71
III.C.1.1.3. HGF.....	72
III.C.1.1.4. IL-10.....	73
III.C.1.1.5. IL-6.....	73
III.C.1.1.6. SDF-1.....	73
III.C.1.1.7. IL-8.....	74
III.C.1.1.8. TGF- β	74
III.C.1.2. Interaction directe CSM/CSH (contact cellulaire).....	74
III.C.1.2.1. Rôle de l'adhésion médiée par VCAM-1/VLA-4.....	76
III.C.1.2.2. Rôle des voies morphogènes.....	76
IV. Influence des basses concentrations d'O ₂ sur les cellules souches.....	77
IV.A- Introduction.....	77
IV.B- Hypoxie/Normoxie <i>in situ</i>	77
IV.C- Les concentrations d'O ₂ dans l'organisme humain.....	78

IV.D- Rôle de l'oxygène dans les cellules souches.....	80
IV.D.1- Les Facteurs de transcription HIF	80
IV.D.1.1. Les sous unités α	81
IV.D.1.1.1. HIF-1 α	81
IV.D.1.1.2. HIF-2 α et HIF-3 α	82
IV.D.1.2. Les sous unités β	82
IV.D.1.2.1. HIF-1 β	82
IV.D.1.2.2. HIF-2 β et HIF-3 β	83
IV.D.1.3. Les cibles de HIF.....	83
IV.D.2- Les cellules souches et les basses concentrations d'O ₂ – Introduction.....	83
IV.D.3- Cellules souches embryonnaires (CSE) et Oxygène.....	85
IV.D.4- Cellules souches pluripotentes induites (iPSC) et Oxygène	85
IV.D.5- Cellules souches neurales (CSN) et Oxygène	86
IV.D.6- Cellules souches mésenchymateuses et Oxygène	87
IV.D.6.1. La prolifération.....	87
IV.D.6.2. La différenciation	88
IV.D.6.3. La migration.....	89
IV.D.6.4. La sécrétion des facteurs solubles	90
IV.D.7- Cellules souches hématopoïétiques et Oxygène	92
IV.D.7.1. Le cycle cellulaire des cellules hématopoïétiques primitives.....	93
IV.D.7.2. Le stress oxydatif.....	95
IV.D.7.3. L'expansion <i>ex vivo</i> de CSH et Oxygène.....	96
IV.D.7.4. Modulation de l'effet des cytokines	98
V. Expansion <i>ex vivo</i> de greffon du sang placentaire.....	99
V.A- La greffe de cellules souches hématopoïétiques.....	99
V.A.1- Les différents types de greffe de cellules souches hématopoïétiques.....	99
V.A.1.1. L'autogreffe.....	99
V.A.1.2. L'allogreffe	100
V.A.2- Les sources des CSH des greffons allogéniques.....	102
V.A.2.1. La moelle osseuse	102
V.A.2.2. Les cellules souches du sang périphérique mobilisées.....	102
V.A.2.3. Le Sang Placentaire (SP).....	103
V.A.2.3.1. Intérêt du sang placentaire.....	104
V.A.2.3.2. Problématique de la greffe du SP	106
V.B- Expansion <i>ex vivo</i> de greffon du sang placentaire.....	107
V.B.1- Expériences à partir de Greffon médullaire et du CSP	109
V.B.2- Expériences avec Greffon du SP.....	110
V.B.3- Amélioration de l'Expansion <i>ex vivo</i> de Greffon du SP.....	112
V.B.4- Rôle du support Stromal dans l'Expansion <i>ex vivo</i> de Greffon du SP.....	113
V.C- Rôle de CSM dans l'Expansion <i>ex vivo</i> de Greffon hématopoïétique	115
V.C.1 Rôle de CSM dans l'Expansion <i>ex vivo</i> de Greffon médullaire et CSP.....	115
V.C.2 Rôle de CSM dans l'Expansion <i>ex vivo</i> de Greffon du SP.....	116
OBJECTIFS.....	120
MATERIELS ET METHODES.....	123
I. PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....	124
II. Préparation des cellules et culture cellulaire	125
II.A. Unité de sang placentaire.....	125

II.A.1. Isolement des cellules mononuclées (CMN)	125
II.A.2. Purification des cellules CD34 ⁺	125
II.B. Préparation de la couche adhérente de CSM	126
III. Analyse des CSM	127
III.A. Analyses fonctionnelles - colonies CFU-F (<i>Colony Forming Unit - Fibroblast</i>).....	127
III.B. Analyse phénotypique des préparations de CSM	128
IV. Congélation et Décongélation des cellules.....	129
IV.A. Congélation des cellules	129
IV.B. Décongélation des cellules.....	129
V. Culture simple et Co-culture sur CSM des cellules CD34 ⁺ - Culture C1.....	130
V.A. Analyses par Cytométrie en Flux (CMF).....	131
V.A.1. Expression des Antigènes Membranaires.....	131
V.A.2. Activité de l'enzyme Aldéhyde Déshydrogénase (ALDH).....	132
V.B. Détection des cellules progénitrices CFC – culture semi-solide.....	133
V.C. Détection des progéniteurs primitifs Pré-CFCs	133
V.D. Détection des cellules souches SRC (<i>Scid-Repopulating Cells</i>).....	134
V.D.1. Détection des cellules humaines dans la moelle osseuse des souris par CMF...	135
V.D.2. Détection des progéniteurs humains dans la MO des souris par test CFC.....	135
VI. La production des cytokines.....	136
VII. Expansion de cellules CD34 ⁺ avec les surnageants de culture.....	137
VIII. Tests Statistiques	138
RESULTATS.....	139
I. Article principal	140
II. Résultats Complémentaires.....	152
II.A. Effet d'IL-3 sur le taux d'expansion de cellules totales.....	153
II.B. Effet d'IL-3 sur le taux d'expansion des cellules CD34 ⁺	154
II.C. Effet d'IL-3 sur le taux d'expansion de CFC	155
II.D. Phénotypage en fin de culture (J10) réalisé sur les cellules totales	156
II.D.1. Marqueurs mégacaryocytaires CD41 et CD61	156
II.D.2. Marqueurs myéloïdes (CD13 et CD33) et marqueur lymphoïde B CD19.....	157
II.D.3. Marqueurs de « primitivité » CD133, ALDH et CD90	158
II.D.3.1. L'expression du CD133.....	158
II.D.3.2. L'activité de l'ALDH	158
II.D.3.3. L'expression du CD90.....	159
II.D.4. Molécules d'adhésion	159
II.E. Activité (SRC) - analyse de xénogreffe dans les conditions avec ou sans IL-3.....	160
II.E.1. Analyses du potentiel de greffe dans les conditions avec IL-3 : SRC-CD.....	160
II.E.2. Analyses du potentiel de greffe dans les conditions sans IL-3 : SRC-CD.....	163
II.E.3. Analyses liées aux CFC humains dans les conditions avec IL-3 : SRC-CFC.....	164
II.E.4. Analyses liées aux CFC humains dans les conditions sans IL-3 : SRC-CFC.....	165
III. Travaux sur les CSM.....	167
III.A. Caractérisation des préparations de CSM.....	168
III.A.1. Production de colonies CFU-F (<i>Colony Forming Unit - Fibroblast</i>).....	168
III.A.2. Effet de basses concentrations d'O ₂ sur le phénotype des CSM.....	169
III.A.3. Impact des taux d'O ₂ sur la sécrétion des cytokines par les CSM.....	172
III.A.3.1. IL-6	172
III.A.3.2. VEGF.....	173

III.A.3.3. IL-8.....	173
III.A.3.4. TGF- β 1	174
III.A.3.5. FGF-2	174
III.A.3.6. IL-3.....	175
III.A.3.7. G-CSF	176
III.A.3.8. TPO.....	176
III.A.3.9. SDF-1 α + β	177
III.A.3.10. IL-4, GM-CSF, IL-17A, IL-1 β , IL-10, HGF et TNF- α	178
III.B. Impact des surnageants sur la culture de CD34 ⁺ SP	180
III.B.1. Condition 1 : 10% de surnageant.....	181
III.B.2. Condition 2 : 20% de surnageant.....	182
DISCUSSION	184
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	194
BIBLIOGRAPHIE.....	198
ANNEXES.....	234
Article 1.....	236
Article 2.....	244
Communications aux colloques.....	250
RESUME.....	251

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les sites de l'hématopoïèse fœtale	18
Figure 2 : Schéma générale de l'hématopoïèse.....	21
Figure 3 : Divisions symétrique et asymétrique des CSH dans le temps (t).....	22
Figure 4 : Analyse par Cytométrie en Flux du phénotypage Side Population sur des CMN Lin-médullaires humaines.....	31
Figure 5 : Hiérarchie des CSH et des progéniteurs dépendant de méthode de détection.....	35
Figure 6 : Niches réticulaires créées par les progéniteurs mésenchymateux pouvant maintenir et réguler les CSH.....	42
Figure 7 : Illustration abrégée de l'hématopoïèse.....	43
Figure 8 : Concentration en oxygène dans les principaux organes du corps humain.....	79
Figure 9 : Les niches de certaines cellules souches avec leurs concentrations physiologiques d'O ₂	84
Figure 10 : Expansion de greffon hématopoïétique en fonction des concentrations d'O ₂	97
Figure 11 : Evolution de la répartition des indications d'allogreffe en France.....	101
Figure 12 : Evolution de la répartition des sources de greffon des CSH allogéniques en France entre 1995 au 2010.....	105
Figure 13 : Evolution de la répartition des sources de greffon des CSH allogéniques non-apparentés en France entre 1995 au 2010.....	105
Figure 14 : le principe de l'expansion <i>ex vivo</i> de greffon hématopoïétiques.....	108
Figure 15 : Illustration du modèle expérimental.	122
Figure 16 : Culture de cellules stromales mésenchymateuses humaines issues de la moelle Osseuse avec de différents grossissements.....	128
Figure 17 : Système de mini-chambre à O ₂ contrôlé.....	130
Figure 18 : La culture secondaire.....	134
Figure 19 : Schéma représentant le test in vivo de xénogreffe aux souris NOG/SCID.....	135
Figure 20 : Taux d'expansion des cellules totales.	154
Figure 21 : Taux d'expansion des cellules CD34 ⁺	154

Figure 22 : Taux d'expansion des progéniteurs CFC.....	155
Figure 23 : Marqueurs mégacaryocytaires CD41 et CD61.....	157
Figure 24 : Pourcentage de cellules CD133 ⁺ CD34 ⁺	163
Figure 25 : Pourcentage de cellules ALDH ⁺ CD34 ⁺	164
Figure 26 : Molécules d'adhésion VLA-4, LFA-1 et CXCR-4.....	165
Figure 27 : Impact de basses concentrations d'O ₂ , de CSM et d'IL-3 sur l'activité SRC-CD.....	162
Figure 28 : Impact de basses concentrations d'O ₂ , de CSM et d'IL-3 sur l'activité SRC-CFC....	166
Figure 29 : Nombre de CFU-F en fonction de concentrations d'O ₂	168
Figure 30 : Image représentative des colonies CFU-F obtenues des CSM à différentes concentrations d'O ₂	169
Figure 31 : Concentrations d'IL-6 dans les surnageants des co-cultures et cultures simples de CSM.....	172
Figure 32 : Concentrations de VEGF dans les surnageants des co-cultures et cultures simples de CSM.....	173
Figure 33 : Concentrations d'IL-8 dans les surnageants des co-cultures et cultures simples de CSM.....	174
Figure 34 : Interactions entre CSM et cellules CD34 ⁺ à BC-O ₂	179
Figure 35 : Taux d'amplification moyen des cellules CD34 ⁺ dans un milieu contenant 10% de Surnageant.....	181
Figure 36 : Taux d'amplification moyen des cellules CD34 ⁺ dans un milieu contenant 20% de Surnageant.....	182
Figure 37 : Schéma représentant le greffon avant et après expansion dans nos conditions de culture.....	196

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Résumé des critères d'identification des CSM.....	66
Tableau 2 : Marqueurs des CSM humaines natives de la moelle osseuse.....	67
Tableau 3 : Pathologies représentant les indications de la transplantation de cellules hématopoïétiques allogéniques	101
Tableau 4 : Expansion de greffons issus du sang placentaire sur un support stromal.....	119
Tableau 5 : Les anticorps monoclonaux utilisés pour le phénotypage de CSM.....	129
Tableau 6: Liste des anticorps monoclonaux utilisés pour l'analyse phénotypique du produit d'expansion.	132
Tableau 7 : Les différentes conditions de cultures à partir desquelles les surnageants sont testés	137
Tableau 8 : Analyse phénotypique des CSM après culture à 20% et 5% d'O ₂	171
Tableau 9 : Concentrations de TGF-β1.	174
Tableau 10 : Concentrations de FGF-2	175
Tableau 11 : Concentrations d'IL-3	175
Tableau 12 : Concentrations de G-CSF	176
Tableau 13 : Concentrations de TPO	177
Tableau 14 : Concentrations de SDF-1α+β.	178
Tableau 15 : Les variations de sécrétion des cytokines des CSM dans les surnageants.....	179

ABREVIATIONS

5-FU : 5-FluoroUracile

A

ABCG2/Bcrp1 : ATPBinding Cassette G2/Breast Cancer Resistance Protein

ADN : Acide DesoxyriboNucleique

AGM : Aorte-Gonades-Mésonéphros

ALCAM: Activated Lymphocyte Cell Adhesion Molecule

ALDH : ALdehyde DeHydrogenase

AML1 : Acute Myeloid Leukemia

ASCs : Adipose Stromal Cells

Ang-1 : Angiopoietine-1

ARNm : Acide RiboNucleique (RNA) messenger

ARNT: ARyl hydrocarbon Nuclear Translocator

B

Baso : Basophile

BC-O₂ : Basse Concentration d'O₂

BFU : Burst Forming Unit

bHLH : basic Helix Loop Helix

BMP : Bone Morphogenic Protein

BMPR : Bone Morphogenic Protein Receptor

BrdU : 5-bromo-2'-deoxyuridine

BSA : Bovine Serum Albumine

C

C-TAD : C- Terminal Transactivation Domain

C1: Culture primaire

C/EBP α : CCAAT/enhancer-binding protein α

CAFC : Cobblestone Area Forming Cell

CAK : CDKActivating Kinase

CAR : CXCL12-Abundant Reticular

CBP : CREB-Binding Protein

CD : Cluster de Différenciation

CDK : Cyclin-Dependent Kinase

CE : Cellules Endothéliales

CFC : Colony Forming Cell

CFSE : CarboxyFluorescéine Succinimidyl Ester

CFU : Colony Forming Unit

CFU-GEMM : CFU Granuleuse- Erythrocytaire-Macrophagique- Megacaryocytaire

CFU-Mix : Colony Forming Unit-Mixte

CFU-S : Colony Forming Unit in the Spleen

CLP : Common Lymphoid Progenitor

CMF : Cytométrie en Flux

CMN : Cellules Mononuclées

CMP : Common Myeloid Progenitor

CO : Co-culture

CO2 : Dioxyde de carbone
CS : Cellules Souches
CSE : Cellules Souches Embryonnaires
CSH : Cellule Souche Hématopoïétique
CSH/PH : Cellules Souches et Progéniteurs Hématopoïétiques
CSM : Cellules Souches/Stromales Mesenchymateuses
CSP : Cellules Souches Périphériques
CSN : Cellules Souches Neurales
CXCL12 : CXC-type Chimiokine Ligand 12
CXCR-4 : CXC-type Chimiokine Receptor 4

D

DVNA : Donneur adulte Volontaire Non Apparenté

E

E : Erythrocytaire
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Eo : Eosinophile
EPAS : Endothelial PAS protein
EPO : Erythropoietine

F

FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS : Fetal Calf Serum
FD : filtres de déleucocytation
FDCP : Factor Dependent Cell paterson
FGF-2 ou bFGF: Fibroblaste Growth Factor- 2 / basic Fibroblast Growth Factor
FITC: FluoreceinIsoThiCyanate
FL: Flt-3L : Flt-3 Ligand
FOXO : Forkhead transcription factor bOX O

G

G : Granulocytaire
GD2 : Ganglioside
GATA : GATA-binding protein
G-CSF : Granulocytic- Colony Stimulating Factor
GM-CSF : Granulocytic / Macrophagic- Colony Stimulating Factor
GVHd : Graft Versus Host disease
GVL : Graft Versus Leukemia

H

H2O2 : peroxyde d'hydrogene
HB-EGF : Heparin-Binding Epidermal Growth Factor
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HIF : Hypoxia Inducible Factor
HLA : Human Leukocyte Antigen
Hox : Homeobox
HPP-CFC : Colony Forming Cells with High Proliferative Potential
HRE : Hypoxia Response Element
HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells

I

ICAM : InterCellular Adhesion Molecule

IDO: Indole DiOxygénase
IFN : InterFiroN
IGF : Insulin Growth Factor
IGF-BP1 : IGF-Factor-Binding-Protein
IHH : Indian Hedgehog
Ik : Ikaros
IL : InterLeukine
IMDM : Iscove Modified Dubelcco Medium
iPSC : induced Pluripotent Stem Cells
ISCT : International Society for Cellular Therapy

J

Jag1 : Jagged 1
JAK : Janus Kinase

K

KIP : Kinase Inhibitor Protein
KL : C-kit Ligand

L

LEF/TCF : Lymphocyte Enhancer Factor/T Cell Factor
LFA-1 : Lymphocyte Function-associated Antigen 1
LIF : Leukemia Inhibitory Factor
Lin- : Lineage minus
LSK : Lin-Sca-1+c-Kit+
LTC-IC : Long Term Culture-Initiating Cell
LT-CSH : Long term Hematopoietic Cellule Souche Hematopoietique
LTRA : Long Term Repopulating Ability
LT-SRC: Long Term SCID-Repopulation Cell

M

Mcl-1 : Myeloid leukemia-1
M-CSF : Monocyte-Colony Stimulating Factor
MEC : Matrice Extra-Cellulaire
Meg : Megacaryocytaire
MEP : Megacaryocytic/erythrocytic Progenitor
MGDF : Megakaryocyte Growth and Development Factor
MGG: May-Grunwald-Giemsa
MIP-1 α : Macrophage-Inflammatory-Protein 1 α
MK : Megakaryocyte
MM : Myélome Multiple
MMP : Matrix MetalloProteinase
MO : Moelle Osseuse
MRA : Marrow Repopulating Ability

N

N-TAD : N-terminal TransActivation Domain
NF κ B : Nuclear- κ B Factor
NGFR: Neural Growth Factor Receptor
NICD: Notch Intracellular Domain
NK : Natural Killer
NLS : Nuclear Localization Signal

NOG/SCID : NOD/LtSz-scid IL2rycnull

O

O₂ : Dioxygene

O₂⁻ : Anion superoxyde

ODDD : Oxygen Dependent Degradation Domain

P

PAS : Per-ARNT-Sim

PBEF1 : Pre-B-cell colony- Enhancing Factor

PBS : Phosphate Buffered Saline

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PDK1 : Protein Kinase D1

PF4 : Platelet Factor 4

PG : ProstaGlandine

PHD : Prolyl Hydroxylase Domain

PLGF : PLacental Growth Factor

pO₂ : Pression partielle en Oxygène

PU.1 : Le gène Spi-1

PTH : Hormone parathyroïdienne

R

ROS : Reactive Oxygen Species

Runx1 : Runt-related transcription factor 1

S

S : Culture simple

Sca-1 : Stem Cell Antigen

SCF : Stem Cell Factor

SCID : Severe Combined Immuno- Deficiency

SDF-1 : Stromal cell-Derived Factor 1

SHH : Sonic HedgeHog

SLAM : Signaling Lymphocyte Activation Molecule

SMAD : Mothers Against Decapentaplegic Homolog

Smo : Smoothened

SN50 : N-acetyl cysteine

SNO : Spindle-shaped N-cadherin+ Osteoblastic cells

SRC : SCIDRepopulating Cells

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

ST-CSH : Short term Cellule Souche Hematopoietique

ST-SRC : Short Term SCIDRepopulation Cell

SVF : Sérum de Veau Fœtal

T

TAD : Trans Activation Domain

TCPS : Tissue Culture Polystyrene Surface

TEPA : Tétraéthylène-Pentamine

TGF- α : Transforming Growth Factor- α

TGF- β : Transforming Growth Factor- β

Th17 : T helper cell response 17

TNF : Tumor Necrosis Factor

TPO : Thrombopoietine

V

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR : VEGF Receptor

VHL : Von Hippel-Lindau

VLA : Very Late Antigen

W

WJC : Wharton's jelly cells

INTRODUCTION

I. Hématopoïèse

L'hématopoïèse constitue l'ensemble des processus qui assurent la production et le renouvellement des cellules sanguines d'un individu tout au long de la vie.

Les cellules du sang, les polynucléaires, les monocytes, les lymphocytes, etc., ainsi que les hématies et les plaquettes sont toutes originaires d'un type cellulaire particulier : la Cellule Souche Hématopoïétique (CSH).

I.A- Ontogénie des Cellules Souches Hématopoïétiques

Chez l'Homme, l'hématopoïèse commence dans le sac vitellin de l'embryon au cours des premières semaines du développement. Cependant cette hématopoïèse est « transitoire » et va être remplacée par l'hématopoïèse « définitive » provenant des CSH issues des cellules endothéliales (CE) sur la paroi de l'aorte dorsale (Bertrand et al., 2010). Celles-ci subissent donc une transformation progressive, appelée « transition hématopoïétique » (récemment décrit par Kissa et Herbomel) (Kissa and Herbomel, 2010), pour finalement donner naissance à des CSH qui vont, d'abord, migrer vers la région AGM (Aorte-Gonade-Mésonéphros) puis coloniser le foie fœtal, le thymus, la rate et la moelle osseuse fœtale. Le foie et la rate ont des rôles essentiels dans l'hématopoïèse du troisième au septième mois de la gestation ; puis, la moelle osseuse prend l'initiative progressivement pour devenir le site majeur hématopoïétique chez l'adulte (Figure 1). Dans certains contextes pathologiques touchant la moelle (certains syndromes myéloprolifératifs) le foie et la rate peuvent reprendre l'activité hématopoïétique (métaplasie myéloïde). Toutefois, durant la période pré et post-natale, les CSH se trouvent en quantités considérables dans la circulation périphérique (peuvent être prélevées à partir du cordon ombilical). Chez l'adulte, les CSH sont capables de passer temporairement dans la circulation périphérique en quantités très faibles (Udomsakdi et al., 1992) et sont « facilement » isolables à partir des filtres de déleucocytation (Ivanovic et al., 2006). Cette capacité à circuler a trouvé sa place dans une application en hématologie avec la mobilisation des cellules de la moelle osseuse au sang périphérique en utilisant certains facteurs de croissance. Cette technique représente actuellement le premier recours dans le domaine de prélèvement du greffon de CSH en clinique (Eaves, 1993).

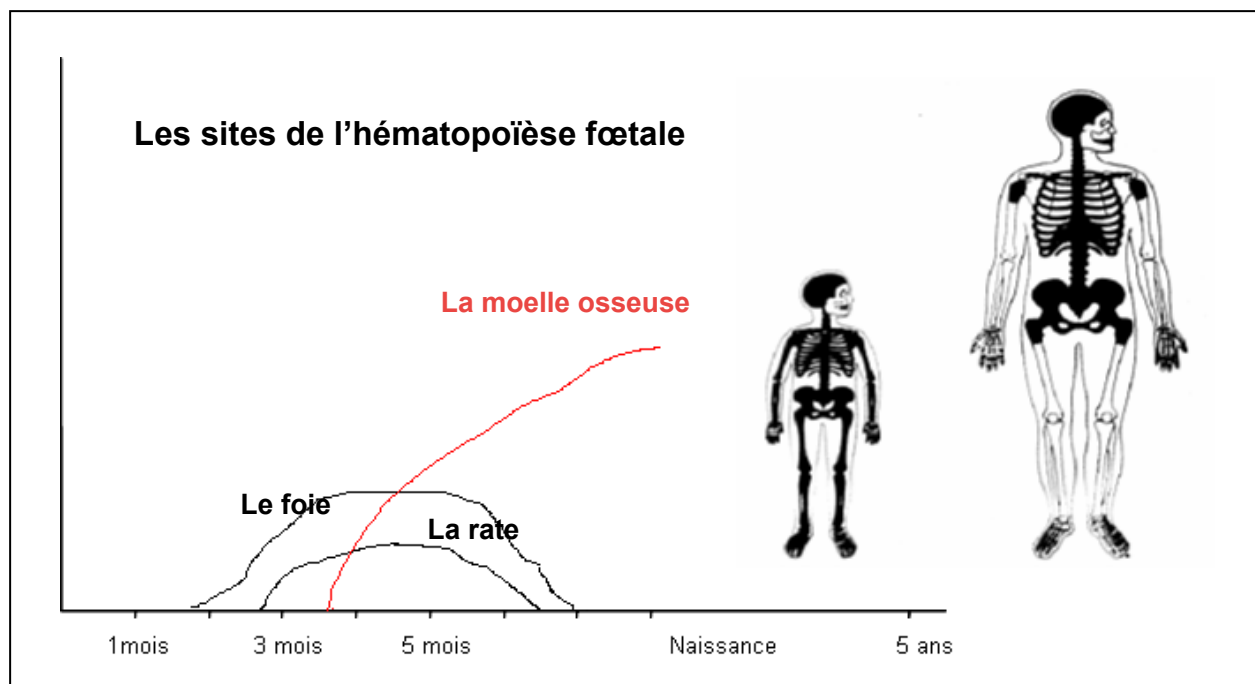


Figure 1 : Les sites de l'hématopoïèse fœtale.

Vers le 4^{ème} mois de la vie intra-utérine, la moelle osseuse commence à être colonisée et prendre en charge l'hématopoïèse. Elle sera le site exclusif de l'hématopoïèse à la naissance et pour toute la vie (dans tous les os jusqu'à 5 ans, puis uniquement les os courts et plats : sternum, côtes, vertèbres, crâne, bassin).

I.B- Hiérarchie du système hématopoïétique

L'ensemble du système hématopoïétique dérive de cellules souches qui assurent l'homéostasie du tissu hématopoïétique en remplaçant les cellules perdues lors des lésions tissulaires et en régénérant les cellules hématopoïétiques quotidiennement (Figure 2). Ces cellules souches permettent, en outre, la reconstitution hématopoïétique chez les individus transplantés. Les cellules du système hématopoïétique peuvent être regroupées en quatre compartiments répondant surtout à des niveaux de différenciation et maturation croissants : les cellules souches hématopoïétiques (CSH) indifférenciées, les progéniteurs et les précurseurs et, pour finir, les cellules matures qui représentent les éléments fonctionnels figurés du sang.

I.B.1- Les Cellules Souches Hématopoïétiques

Les CSH ont été mises en évidence dès les années soixante avec les travaux de Till et McCulloch sur un modèle murin (Till and McCulloch, 1961). En réalité, les CSH représentent 0.005% - 0.05% des cellules de la moelle osseuse murine et humaine (Morrison and Weissman,

1994 ; Szilvassy et al., 2002; Sharkis et al., 1997) et se développent dans la niche médullaire. Cette niche fait partie du micro-environnement privilégié pour les CSH dans lequel sont réunies, en effet, toutes les conditions indispensables pour leur survie, à savoir, le contact avec les cellules accessoires et l'endoste, la présence de certains facteurs de croissance et des concentrations très basses en oxygène. On rappelle aussi que l'endoste est une membrane recouvrant la face interne de l'os compact et les trabécules de l'os spongieux et qui est formée d'une seule couche contenant des ostéoclastes et des cellules ostéoprogénitrices capables de se transformer en ostéoblastes. (*Détails dans le chapitre Micro-environnement médullaire et Cellules Stromales Mésoenchymateuses- P. 40*).

Les caractéristiques fondamentales des CSH sont (Bonnet, 2002; Szilvassy et al., 2002; Spangrude et al., 1988) :

- 1) L'auto-renouvellement: défini comme la capacité de multiplication à l'identique sans subir de différenciation, permettant ainsi de maintenir une réserve constante en CSH.
- 2) La multipotence qui peut-être définie par la capacité de se différencier vers l'ensemble des lignées cellulaires hématopoïétiques.
- 3) La capacité de greffe : liée au “*homing*” (domiciliation) qui permet aux CSH de retourner (se nicher) dans la moelle osseuse après injection pour repeupler la moelle osseuse et reconstruire l'hématopoïèse.

La préservation de l'homéostasie du tissu hématopoïétique exige le maintien d'un nombre constant de CSH normales. Le maintien de ce « pool » dépend de trois équilibres - dont les mécanismes ne sont pas encore complètement identifiés - : survie et apoptose, prolifération et quiescence, différenciation et auto-renouvellement.

Parmi les différents facteurs influençant l'auto-renouvellement des CSH on trouve : 1) les facteurs de transcription tels que HOXB4 (Antonchuk et al., 2002), 2) les régulateurs du cycle cellulaire tels que p21 (Cheng et al., 2000), 3) les protéines impliquées dans le développement telles que Notch, Sonic Hedgehog et Wnt (Varnum-Finney et al., 2000) et 4) certains gènes modifiant la structure chromatinienne : ex, la 5-aza-2'-déoxycytidine et la Trichostatine A (Milhem et al., 2004).

Les deux propriétés remarquables des CSH sont la **quiescence** et la **prolifération lente (*low-cycling*)**. En effet, la majorité des CSH sont en état de dormance (en phase G0/G1 du cycle cellulaire (Nie et al., 2008) ce qui est fondamental afin de se protéger des agressions extérieures comme les radiations et de leur conférer un état de résistance contre certains agents antinéoplasiques tel que le 5-fluoro-uracile (Mauch et al., 1995; Lerner and Harrison, 1990). Ceci leur permet également de résister à la congélation à - 196° (azote liquide) en conservant leurs propriétés fonctionnelles (durant des dizaines d'années).

En limitant le nombre de division, les CSH préservent également l'intégrité de leur génome. De plus, elles possèdent une forte activité télomérase qui renforce le maintien de cette intégrité (Morrison et al., 1996). Des études récentes ont confirmé que la fréquence de division des CSH est basse et hétérogène : 80% des CSH feraient 1 cycle tous les 15 à 30 jours (les CSH actives) et les 20% restants tous les 4 à 6 mois (les CSH dormantes). Ces dernières pourraient sortir de la quiescence en situation de stress pour subvenir à un besoin exceptionnel de l'organisme (infection, saignement ... etc.) puis retourner à leur état de quiescence (Wilson et al., 2008).

Il a été montré par ailleurs l'existence d'une corrélation entre la fréquence de division des CSH et la diminution de leur capacité à reconstruire une hématopoïèse après injection dans un animal irradié. Ainsi, il existe deux catégories de CSH : les CSH dites « long terme » (HSC-LTR) et les CSH dites « court terme » (HSC-STR) qui possèdent la capacité à reconstituer l'hématopoïèse d'un receveur à long et à court terme respectivement (Figure 2).

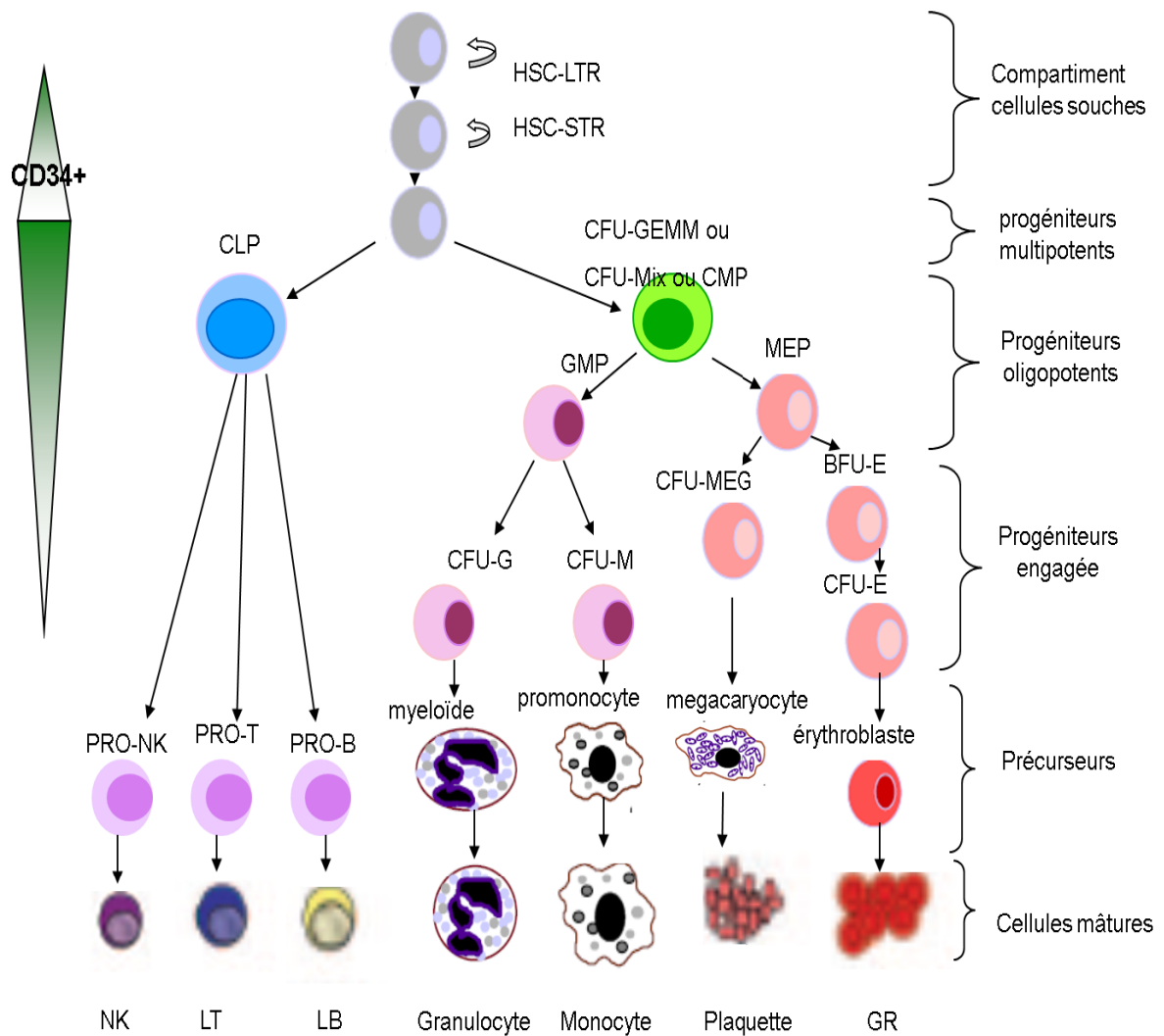


Figure 2 : Schéma général de l'hématopoïèse.

HSC-LTR : *Hematopoietic Stem Cells- Long Term Repopulating* ; HSC-STR : *Hematopoietic Stem Cells- Short Term Repopulating* ; CFU-GEMM : CFU-Granuleuse/ Erythrocytaire/ Macrophagique/Mégacaryocytaire ; CFU-Mix : *Colony Forming-Unit-Mixte*; CMP : *Common Myeloid Progenitor*; MEP : *Megacaryocytic/Erythrocytic Progenitor* ; BFU : *Burst forming unit*; CFU : *Colony Forming Unit* ; MEG : Megacaryocytaire; E : Erythrocytaire; GM : Granulo-Macrophagique ; G : Granulocytaire ; M : Macrophagique ; Eo : Eosinophile; Baso : Basophile ; CLP : *Common Lymphoid Progenitor* ; NK : *Natural Killer* ; LT : Lymphocyte T ; LB : Lymphocyte B. Les cellules CD34⁺ sont présentes dans les compartiments des cellules souches et des progéniteurs.

Les CSH subissent deux types de division : symétrique ou asymétrique. La première amène à la production de deux cellules similaires qui sont soit souches (Figure 3a) (l'auto-renouvellement conduisant à augmenter « le pool » de CSH) soit différenciées (Figure 3c) (diminuant ainsi « le pool » de CSH). La deuxième (Figure 3b) permet de produire une cellule similaire à la cellule

mère et une autre qui s'engage dans le processus de différenciation (ce type de division assure l'équilibre dans « le pool » de CSH) (Ho and Wagner, 2007).

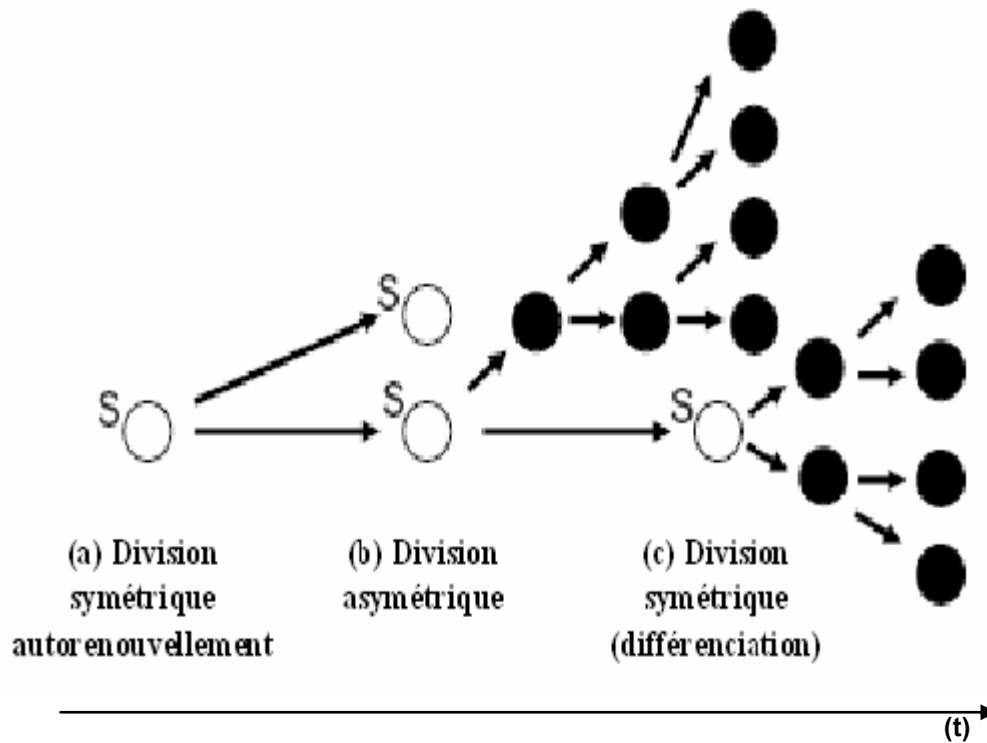


Figure 3 : Divisions symétrique et asymétrique des CSH dans le temps (t). Les CSH sont notées « S » sur cette figure. (a) Les CSH se divisent de façon symétrique pour se reproduire à l'identique, permettant ainsi un repeuplement du pool de cellules souches : c'est la capacité d'auto-renouvellement. (b) Certaines CSH subissent une division asymétrique, c'est-à-dire qu'une des cellules filles est l'identique de la CSH mère, alors que l'autre cellule fille est une cellule engagée dans le processus de différenciation et possédant une prolifération plus rapide. (c) La fonction de cellule souche est perdue quand toutes les cellules filles sont des progéniteurs engagés ayant une prolifération plus rapide. (D'après Ho & Wagner, 2007).

I.B.2- Les progéniteurs hématopoïétiques (CPH)

Ces cellules sont engagées dans une ou plusieurs voies de différenciation et leur capacité d'auto-renouvellement est réduite. Quantitativement, ils représentent 0.1% des cellules de la moelle osseuse (Metcalf, 1977 ; Mayani, 2003). Morphologiquement, les progéniteurs ne sont pas reconnaissables, ils ont été mis en évidence par culture en milieu semi-solide et en présence de facteurs de croissance adaptés (Bradley and Metcalf, 1966). Dans ces conditions, ils donnent différents types de colonies cellulaires expliquant ainsi leur appellation en anglais : CFC (*Colony Forming Cells*) (Metcalf, 1977).

La première différenciation d'une cellule souche multipotente peut se faire vers la lignée lymphoïde ou vers la lignée myéloïde. La cellule progénitrice lymphoïde possède la potentialité de différenciation vers les différents types de lymphocytes (T, B et NK).

La cellule progénitrice myéloïde multipotente appelée "*Colony Forming Unit*" GEMM (CFU-GEMM) va poursuivre son programme de différenciation et donner naissance à des progéniteurs encore plus engagés :

CFU-GM Granulo-Macrophagique

CFU-G Granuleuse

CFU-M Macrophagique

CFU-MK Mégacaryocytaire

CFU-Eo Eosinophile

CFU-B Basophile

BFU-E (*Burst Forming Unit*) (progéniteur érythrocytaire précocé immature)

CFU-E Erythrocytaire tardive

Les progéniteurs perdent leur capacité d'auto-renouvellement au fur et à mesure au cours de la différenciation.

I.B.3- Les précurseurs hématopoïétiques

Les précurseurs représentent le dernier stade de la maturation des cellules hématopoïétiques. Ce sont des cellules morphologiquement identifiables qui ont perdu leur capacité d'auto-renouvellement.

Dans la moelle osseuse où ils sont localisés, les précurseurs vont subir deux phénomènes simultanés, la maturation et la multiplication. En effet, les cellules subissent certaines modifications au niveau de leur taille, de leur chromatine et de leur composition en organites. Parallèlement, à chaque stade cytologique correspond une division cellulaire.

I.B.4- Les cellules matures

La maturation des précurseurs conduit à la formation de cellules circulantes matures, qui peuvent passer dans le sang, telles que :

> les granulocytes neutrophiles, éosinophiles et basophiles

- > les monocytes (à l'origine des macrophages)
- > les lymphocytes
- > les érythrocytes
- > les thrombocytes (les plaquettes)

Ce sont des cellules parfaitement fonctionnelles et reconnaissables morphologiquement ou sur des critères phénotypiques (expression de marqueurs membranaires spécifiques des différents lignages).

Pour certaines de ces cellules, le sang ne représente qu'un lieu de passage et de transport entre le lieu de leur production (la moelle) et le lieu de leurs fonctions (les tissus).

I.C- Identification des cellules souches hématopoïétiques

Les CSH ne sont pas reconnaissables morphologiquement (elles ressemblent à des lymphoblastes). Depuis les années quatre-vingt, des techniques basées sur les propriétés physico-chimiques et biologiques des CSH ont été initiées afin d'isoler les CSH. Les techniques de purification basées sur l'expression des antigènes de surface sont sans doute les méthodes les plus couramment utilisées à la fois aux niveaux expérimental et clinique. Malgré les grands efforts déployés dans ce domaine, les CSH restent non-identifiables phénotypiquement, puisque tous les marqueurs mis en évidence ne sont pas spécifiques (Ivanovic, 2010).

Certaines équipes (Christensen and Weissman, 2001) auraient identifié phénotypiquement les cellules souches capables de greffer à court terme et celles qui greffent à long terme, mais les résultats récents relativisent cette découverte en montrant que ces deux populations ne sont pas vraiment distinctes fonctionnellement (Liu et al., 2012b). Cette idée est spécialement vraie après un passage *ex vivo* où le phénomène de dissociation phénotype/fonction est bien clair (Danet et al., 2001).

En réalité, les marqueurs phénotypiques ont permis d'obtenir des populations cellulaires enrichies en cellules hématopoïétiques primitives sans qu'il soit possible pour autant de prédire le degré de cette primitivité notamment concernant la capacité de greffe à moyen ou à long terme. Il s'agit donc, le plus souvent, d'une population hétérogène sur le plan fonctionnel.

I.C.1- Caractérisation phénotypique des CSH

I.C.1.1- Marqueurs membranaires positifs

I.C.1.1.1- L'antigène CD34

Cette molécule a été décrite pour la première fois en juillet 1984 par Curt Civin et al (Civin et al., 1984). C'est une protéine transmembranaire exprimée sur une faible proportion des cellules hématopoïétiques de morphologie indifférenciée, en particulier d'origine médullaire. Les cellules morphologiquement reconnaissables, en particulier, les précurseurs des lignées myéloïdes et érythroïdes, n'expriment pas cette molécule. Les différentes populations de progéniteurs hématopoïétiques, identifiables dans des tests fonctionnels, sont au contraire majoritairement présentes au sein de la population CD34⁺. Ce marqueur de surface est vite devenu le marqueur de choix dans la sélection des CSH humaines même si sa fonction exacte dans le système hématopoïétique reste énigmatique. Les premières explorations fonctionnelles des cellules exprimant l'antigène CD34 ont rapidement montré que les progéniteurs clonogéniques de type CFU-GM (colonies contenant à la fois des cellules de lignée neutrophile et de la lignée monocyttaire), BFU-E (amas de cellules érythroblastiques) et BFU-MK (progéniteurs mégacaryocytaires) étaient présents au sein de la population CD34⁺ et absents au sein de la population CD34⁻. De même, les LTC-IC (*Long-Term Culture-Initiating Cells*) qui sont les progéniteurs qui initient l'hématopoïèse dans les systèmes de culture médullaire à long terme, sont présents dans la population CD34⁺. Par la suite, les modèles de xénogreffe des cellules hématopoïétiques humaines ayant pour receveur certaines souches de souris immunodéficientes ou des fœtus ovins, ont révélé que les cellules primitives, dénommées (*SCID-repopulating cells*) ou SRC dans le cas des modèles de xénogreffe des souris NOD-SCID, étaient majoritairement présents dans la population des cellules médullaires CD34⁺. L'ensemble de ces observations abondantes suggère que la population CD34⁺ est enrichie en progéniteurs et cellules souches, et au contraire déplétée en précurseurs et cellules matures.

Malgré toutes ces données encourageantes concernant son intérêt, la problématique liée à la molécule CD34 est plus complexe qu'il n'apparaît. En effet, au sein de la population CD34⁺ du sang placentaire (SP), les progéniteurs (CFU-GM, BFU-E, CFU mix, et CFU-Mk) représentent 30% à 50% et seul un faible pourcentage représente des cellules primitives (Silvestri et al., 1992). En plus, certaines cellules souches, comme les MAPC (*Multipotent Adult Progenitor Cells*) (Subramanian et al., 2010), n'expriment pas l'antigène CD34 en l'état stable et l'expression de

cette molécule est réversible et non liée aux capacités fonctionnelles des cellules souches (Dao et al., 2003). Ainsi, il a été mis en évidence, à travers des tests fonctionnels, une population minoritaire des cellules très primitives n'exprimant pas l'antigène CD34 et dotées d'un potentiel fonctionnel très important (Goodell et al., 1997). Ceci concerne des populations ALDH⁺ (Jones et al., 1996) et « *Side Population* » (Goodell et al., 1996) enrichies en cellules SRC sans qu'elles soient positives en CD34 (Bonnet, 1999). Cette problématique de l'instabilité du rapport phénotype/fonction nous laisse supposer que les cellules souches sont plutôt une entité fonctionnelle ayant des expressions phénotypiques qui peuvent être hétérogènes (Zipori, 2004).

Il faut noter également que le marqueur CD34 n'est pas spécifique des cellules hématopoïétiques puisqu'il est également exprimé sur les CE vasculaires (Krause et al., 1996), les cellules dendritiques périvasculaires, les cellules souches des follicules des cheveux et les cellules fusiformes dans les glandes sudoripares eccrines (Nickoloff, 1991). Toutefois, dans le greffon hématopoïétique, la proportion de cellules exprimant l'antigène CD34 reste un paramètre utile ayant un impact important sur la cinétique de prise de greffe, bien que seule une petite fraction de ces cellules ait des caractéristiques de cellules souches. En effet, la fraction CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻ du sang placentaire (cordon) ne contient que 1% -2% de cellules souches détectables par un test *in vivo* fonctionnel (Yahata et al., 2003).

En ce qui concerne les cellules CD34⁺ issues de l'expansion *ex-vivo* des greffons hématopoïétiques, la relation entre phénotype/fonction est encore plus confuse. En effet, on obtient, le plus souvent, un nombre considérable de cellules CD34⁺ suite à la culture. Cependant, ces cellules ont pour la plupart perdu le caractère souche (ne possédant pas d'activité SRC) (Danet et al., 2001; Holyoake et al., 1997). Par ailleurs, l'expansion *ex vivo* à partir des cellules souches de grade clinique (Ivanovic et al., 2011) permet de produire un nombre de progéniteurs nettement supérieur à celui des cellules CD34⁺ indiquant ainsi qu'une partie de progéniteurs est CD34⁻ (Boiron et al., 2006; Ivanovic and Boiron, 2009a).

I.C.1.1.2- L'antigène CD133

La molécule CD133 fait partie des glycoprotéines qui ont été décrites comme étant spécifiques pour les cellules souches normales et cancéreuses dans plusieurs tissus. Ainsi, les populations de cellules exprimant l'antigène CD133 fraîchement isolées se sont montrées riches en CSH quelle que soient leurs origines : MO, (cellules souches périphériques mobilisées) CSP et

placentaire (Miraglia et al., 1997; Yin et al., 1997; Kobari et al., 2001). Cette molécule, comme le CD34, n'a pas de fonction bien établie. Toutefois, certains travaux ont montré qu'elle peut être impliquée dans certaines fonctions des CSH : la migration et la domiciliation indispensables pour réintégrer les CSH dans les niches après leur transplantation (Giebel et al., 2004).

Le marqueur CD133 n'est, en fait, pas restreint au tissu hématopoïétique étant donné qu'il est exprimé également sur les CE, des lignées cellulaires souches embryonnaires (CSE), les cellules souches neurales fœtales (Kelly et al., 2004), des cellules adhérentes non hématopoïétiques (Kuci S, et al., 2003) et les cellules progénitrices multipotentes adultes (MAPC) (Jiang et al., 2002).

Plusieurs études indiquent clairement que la molécule CD133 représente un marqueur de surface pour l'identification des cellules souches humaines pluripotentes dotées d'un potentiel de différenciation plus large que les cellules CD34⁺ (Gordon et al., 2003). Cependant, le bénéfice clinique potentiel de purification des cellules primitives par sélection positive des cellules CD133⁺ en comparaison avec les cellules CD34⁺ n'est pas complètement élucidé (Lang et al., 2004). Pour cela, certaines équipes ont combiné les deux marqueurs CD34⁺ CD133⁺ afin d'obtenir la population la plus enrichie possible en cellules primitives au risque d'avoir une quantité très faible de matériel de départ pour initier l'expansion *ex vivo* de greffon hématopoïétique (Drake et al., 2011).

Dans les situations cliniques et comme avec le marqueur CD34, l'antigène CD133 pourrait être utilisé pour la purge des greffons hématopoïétiques, étant donné la corrélation de leurs expressions sur les cellules malignes hématopoïétiques (Vercauteren and Sutherland, 2001; Feller et al., 2005).

I.C.1.1.3- L'antigène CD90 (*Thymocyte antigen 1*) (Thy1.1)

Ce marqueur CD90 (Péault et al., 1993), possédant différentes fonctions (contact cellulaire, apoptose, migration... etc) (Rege and Hagood, 2006), et est exprimé faiblement sur une population ayant un potentiel de reconstitution médullaire chez l'Homme et chez la souris. Il peut être combiné aux marqueurs CD34 et CD38 afin d'enrichir la population de CSH.

I.C.1.1.4- L'antigène CD117 (c-Kit)

C'est un récepteur tyrosine kinase au SCF (*Stem Cell Factor*) ce qui lui confère différentes fonctions (survie, auto-renouvellement, différenciation, adhésion, *homing*, migration) (Moore,

2005). Il est impliqué dans différentes voies de signalisation et son expression diminue au cours de la différenciation (Moore, 2005; Sharma et al., 2006).

I.C.1.2- Marqueurs membranaires négatifs

I.C.1.2.1- Le marqueur Lin⁻

C'est une méthode d'enrichissement en cellules primitives basée sur la sélection négative, autrement dit, les cellules marquées avec cette technique sont éliminées alors que les cellules d'intérêt sont non marquées (Lin⁻). Grâce à des cocktails d'anticorps visant les antigènes spécifiques des différentes lignées hématopoïétiques (CD2, CD3, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b, glycophorine A et parfois les CD36, CD38 et CD45RA), la population Lin⁻ (*lineage minus*) ainsi obtenue est dépourvue de cellules engagées, et est donc est relativement immature. Cette méthode est le premier recours dans la sélection des CSH murines (Park et al., 2002).

I.C.1.2.2- L'antigène CD38

Ce marqueur n'est en réalité pas exprimé sur les CSH mais seulement lors de la différenciation cellulaire. La sélection négative pratiquée sur la population CD34⁺ afin d'éliminer les cellules CD38⁺ est souvent réalisée dans le but d'obtenir une population humaine CD34⁺ CD38⁻ enrichie en CSH (Novelli et al., 1998). Cependant l'expression de CD38 est réversible selon les conditions de culture (Tajima et al., 2001). Comme c'est le cas avec le marqueur CD34, l'intérêt de l'antigène CD38 pour sélectionner une population primitive s'affaiblit pendant la culture *ex vivo*, contrairement aux cellules fraîchement isolées. Ainsi, une quantité très importante de cellules CD34⁺ CD38⁻ peut être obtenue sans que cela soit corrélé avec un potentiel fonctionnel (Dorrell et al., 2000).

Cependant, une étude en 1996 a montré que des cellules très primitive peuvent être présentes au sein de la population c-kit⁺ Sca-1⁺, lin^{faible/-} qui est CD38⁺ (Randall et al., 1996) bien que ce soient des cellules d'origine murine.

I.C.1.2.3- La molécule HLA-DR (*Human Leukocyte Antigen*)

Elle est absente sur les CSH, et son utilisation est en combinaison avec les autres marqueurs.

I.C.2- Caractérisation métabolique des CSH

I.C.2.1- L'activité de l'enzyme Aldéhyde Déshydrogénase (ALDH)

ALDH est une enzyme intracellulaire détoxifiante responsable de l'oxydation des aldéhydes en acides carboxyliques. L'isoforme principale est l'ALDH1-A1 qui est exprimée dans les CSH/CPH conférant ainsi à ces cellules la capacité de résistance aux agents alkylants comme le cyclophosphamide par la désactivation de ses métabolites (von Eitzen et al., 1994).

Le niveau d'activité de l'ALDH est considéré comme un marqueur de cellules souches, car cette enzyme est exprimée dans les cellules souches de différents tissus notamment hématopoïétiques, mésenchymateux, neuronaux et endothéliaux (Gentry et al., 2007; Hess et al., 2008). Elle est également exprimée dans certaines cellules cancéreuses.

L'activité de l'ALDH1A1, présente dans le cytoplasme cellulaire, a été décrite dans certaines études comme l'acteur clé de la fonction « souche » (Sharkis et al., 1997). La fraction de cellules montrant la plus haute activité de l'ALDH (ALDH^{fort}) contient le plus grand nombre de cellules CD34⁺ CD38^{faible/-} (CSH/CPH), elle comprend également des cellules primitives CD34⁻, ce qui suggère que le compartiment ALDH^{fort} est hétérogène, au moins phénotypiquement.

Chute JP a montré en 2006 que le *diethylaminobenzaldehyde* (DEAB) (inhibiteur d'ALDH), à travers la diminution du taux de l'acide rétinolique (obtenue suite à l'action d'ALDH sur le rétinol), contribue à améliorer l'auto-renouvellement et l'expansion des CSH humaines (Chute et al., 2006).

La population ALDH^{High} Ling^{neg} a été isolée dans toutes les sources de CSH (MO, CSP et placentaire) et a permis la prise de greffe à long terme chez la souris (Hess et al., 2006). Chez l'Homme, il a été montré que la réussite de l'autogreffe à long terme était corrélée avec l'activité de l'ALDH présente au sein des greffons après la cytophérèse (Fallon et al., 2003). De façon plus importante, l'activité de l'ALDH s'est montrée considérablement plus fiable par rapport au marqueur CD34 pour refléter la fonctionnalité du greffon hématopoïétique (Fallon P et al., 2003). En effet, Jones et al ont réussi à isoler une population cellulaire murine ALDH⁺ enrichie en cellules souches LHSC (*LymphoHematopoietic Stem Cells*) (ayant la capacité de reconstituer à long terme l'hématopoïèse de souris létalement irradiées) qui est pourtant négative pour l'antigène CD34 (Jones et al., 1996).

Il faut noter qu'il n'existe pas, à notre connaissance, d'études portant sur l'activité d'ALDH que présentent les CSH après la culture.

I.C.2.2- L'activité des molécules ROS (*Reactive Oxygen Species*)

Nos cellules d'organisme aérobie utilisent l'oxygène pour produire de l'énergie et cet oxygène est, en réalité, l'accepteur final des électrons produits lors de ce phénomène. La réduction des molécules d'oxygène en eau est catalysée par le cytochrome oxydase qui est la dernière enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale. Lorsqu'une petite fraction de cet oxygène échappe à cette réduction, elle forme un anion de superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui sont relativement inactifs et pris en charge par d'autres systèmes enzymatiques spécifiques. Au cours de certaines circonstances physiopathologiques, ces systèmes arrivent à débordement et l'équilibre redox est donc rompu ce qui fait que la cellule se retrouve en situation de stress oxydatif.

Il a été montré que ces molécules ROS auraient un effet très négatif pour la survie cellulaire, notamment sur les cellules souches (Ito et al., 2006; Lombard et al., 2005). Yahata et al ont très récemment constaté que l'accumulation des dommages de l'ADN des CSH causés par les ROS conduit à la sénescence prématurée des CSH qui est traduite par l'échec de la greffe hématopoïétique en série chez la souris (Yahata et al., 2011).

D'autres auteurs sont allés plus loin en démontrant que les cellules hématopoïétiques les plus primitives possèdent un taux de ROS très faible et en corrélation avec la primitivité cellulaire (Jang et al., 2007; Ito et al., 2004).

I.C.2.3- Le phénotype *Side population*

Ce sont les cellules identifiées par leur capacité d'exclusion des colorants à travers une pompe membranaire d'efflux. La première protéine impliquée dans la résistance du cancer du sein, *ATP-binding cassette G2* (ABCG2), est le déterminant moléculaire du phénotype *Side Population* (Zhou et al., 2001). Ce transporteur est un membre de la sous-famille des protéines G qui se trouve dans une grande variété de tissus de mammifères. Elle joue un rôle actif dans l'exclusion d'un large spectre de molécules y compris des métabolites, des toxines, des médicaments et des colorants (Staud and Pavlek, 2005). Par conséquent, les cellules souches hématopoïétiques (Goodell, 2002) pourraient être identifiées et purifiées sur la base de l'exclusion de *Hoechst 33342* (colorant fluorescent vital se fixant spécifiquement aux molécules d'ADN et l'ARN) (Lin and Goodell, 2006) et la Rhodamine-123 (fixant les mitochondries) ce qui reflète la capacité proliférative de la cellule (phase de cycle cellulaire G0/G1). En effet, les

cellules *Side Population* dotées d'une fluorescence basse de *Hoechst* présentent un phénotype membranaire et une capacité proliférative cellulaire correspondant à des cellules très primitives distinctes des cellules ayant une fluorescence forte de *Hoechst* (Robinson et al., 2005) (Figure 4). Tandis que le compartiment *Side Population* correspond à une entité fonctionnelle, il présente une certaine hétérogénéité phénotypique. Ces cellules issues du sang placentaire contiennent à la fois des cellules CD34⁺ et CD34⁻ alors que dans la moelle osseuse ce sont des cellules CD34⁻ (Cheung, 2006). Chez la souris, elles sont pour la quasi-totalité négatives en CD34 (Bonnet, 1999).

Enfin, il faut noter que la purification des CSH sur les critères *Side Population* est couramment utilisée chez la souris alors qu'elle est toujours controversée chez l'Homme à l'inverse de l'activité d'ALDH qui serait plus corrélée avec la primitivité des cellules hématopoïétiques chez l'Homme (Pearce and Bonnet, 2007).

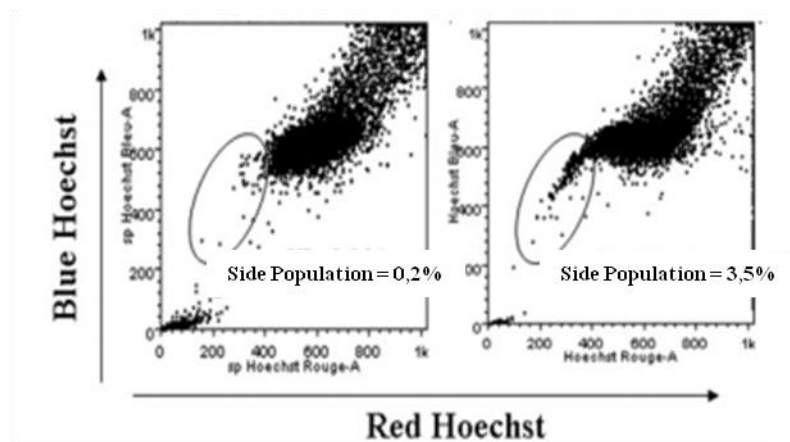


Figure 4 : Analyse par Cytométrie en Flux du phénotypage *Side Population* sur des CMN Lin- médullaires humaines. Ce phénotype *Side Population* est lié à leur capacité à expulser le colorant *Hoechst* 33342. Le contrôle (à gauche) représente les cellules traitées avec du Vérapamil, inhibiteur du transporteur de *Hoechst*. (D'après Pierre-Louis et al., 2009).

I.C.2.4- Le cycle cellulaire

Nous avons précédemment précisé que les colorants *Hoechst* 33342 et la Rhodamine-123 peuvent être utilisés pour déterminer les phases du cycle cellulaire dans lesquelles se trouve la cellule, phase G0/G1 dans le cas de CSH. La pyronine Y qui détermine le contenu en ARN est également parmi les agents utiles afin d'isoler des cellules CD34⁺ en phase G0/G1 (Gothot et al., 1997).

L'état de quiescence de CSH est caractérisé par une diminution de l'activité transcriptionnelle et de la synthèse protéique ce qui conduit à une baisse (ou disparition) de marqueurs de prolifération comme Ki 67 (Holyoake et al., 1999). Des protéines qui sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire P27 (Guitart et al., 2011; Eliasson et al., 2010), P21 (Cheng et al., 2000b) ont également été étudiées, sachant qu'elles ont pour fonction d'arrêter rapidement le cycle cellulaire en inhibant les cdk (*Cyclin-Dependent Kinase*).

La coloration avec le CFSE (*CarboxyFluorescéine Succinimidyl Ester*) est un moyen très fréquent d'étude de la prolifération des CSH. Ayant une toxicité cellulaire très basse (utilisation *in vivo*), il rentre librement pour rester fixé à long terme dans le cytoplasme cellulaire. Puis, quand la cellule marquée se divise, sa descendance possède la moitié du nombre de molécules de carboxyfluorescéine étiquetées et donc la division cellulaire peut être évaluée en mesurant la diminution correspondante de la fluorescence des cellules par cytométrie en flux (Ko et al., 2011).

Le BrdU (*5-Bromo-2'-deoxyUridine*) est un analogue de la thymidine qui s'incorpore à l'ADN cellulaire pendant la phase S du cycle cellulaire et est révélé par immunohistochimie. Cette molécule permet donc de mettre en évidence un progéniteur en phase S (synthèse de l'ADN) (Bradford et al., 1997). En réalité, la cellule souche quiescente est identifiable par sa capacité de rétention de cet intercalant de l'ADN (le BrdU) (Passegué et al., 2005). Grâce à un seuil de toxicité convenable, le BrdU a été testé *in vivo* chez la souris. Après injection, les cellules en prolifération incorporent le BrdU à leur ADN et au fur et à mesure de leur division cellulaire vont perdre le BrdU alors que les cellules quiescentes ayant une prolifération cellulaire lente vont le retenir plus longtemps. Ainsi, ce moyen a rendu possible l'estimation approximative du taux de CSH qui sont en phase G0 ainsi que leurs cinétique de prolifération (Passegue et al., 2005).

Enfin, les agents antimétaboliques comme 5-FU (Fluorouracile) qui est toxique pour les cellules en phase active du cycle (toutes les phases sauf G0) permet d'éliminer les progéniteurs matures et garder les populations hématopoïétiques primitives dormantes (en phase de G0) et résistantes (Lerner and Harrison, 1990).

I.C.3- Caractérisation fonctionnelle

A l'heure actuelle, les tests fonctionnels sont le seul recours fiable qui permet, même a posteriori, de conférer le caractère « souche » à une population cellulaire hématopoïétique (Zipori, 2004). Ce sont des tests *in vivo* et *iv vitro* qui prennent en considération la capacité proliférative des cellules (*in vitro*) et la prise de greffe (*in vivo*).

I.C.3.1- Tests *In vitro*

Avant d'entamer la discussion sur les cellules primitives mises en évidence *in vitro* ainsi que la procédure, il faut d'abord définir les **CFC** (*Colony Forming Cell*). Les **CFC** sont les progéniteurs formant des colonies détectées dans la culture en milieu semi-solide (agar, méthylcellulose ou collagène) et en présence des facteurs de croissance (SCF, IL(Interleukine)-3, IL-6, EPO (Erythropoïétine), G/GM-CSF et TPO (Thrombopoïétine)). Elles ont été décrites pour la première fois au milieu des années 60 par Bradley et Metcalf (Bradley and Metcalf, 1966) qui ont établi les termes : *Colony Forming Cells* (CFC), *Colony Forming Unit* (CFU) ou *Burst Forming Unit* (BFU). Ainsi, nous pouvons distinguer plusieurs sortes de colonies reflétant les progéniteurs dont elles sont originaires (Figure 5) : CFU-MK), CFU-E ou BFU-E, CFU-GM ou (CFU-G et CFU-M). Il existe également des progéniteurs (CFC) plus primitifs à l'origine de colonies composées de plusieurs types cellulaires, donc issues de progéniteurs plus immatures (CFU-Mix ou CFU-GEMM) (Morrison et al., 1997). Le nombre de cellules formant la colonie, leurs types et le temps de culture nécessaire pour que la colonie contienne des cellules matures reflètent le niveau de primitivité du progéniteur dont la colonie est issue. En réalité, la génération de ces différents types de colonies est également liée aux conditions de culture ainsi qu'aux facteurs de croissance et aux cytokines du milieu.

L'évaluation de la présence d'un type particulier de progéniteurs primitifs nommés **Pré-CFC** (*Pre-Colony Forming Cell*) au sein d'une population cellulaire avec des tests *in vitro* est réalisable avec une étape de culture liquide préalable à la culture en milieu semi-solide (Figure 5). Cette culture permet la prolifération et la différenciation des Pré-CFC grâce aux facteurs de croissance pour arriver, finalement, au stade de CFC permettant leur identification directe en milieu semi-solide (les colonies) (Ivanovic et al., 2000; 2002; Kovacević-Filipović et al., 2007).

Le niveau de primitivité cellulaire est ainsi mesuré de façon semi-quantitative : en fonction de la quantité des colonies produites et la durée de la culture. Ainsi, la population la plus primitive est celle qui génère les colonies les plus grosses (en densité de cellules), sur un délai plus important et constituée de plusieurs lignées cellulaires.

Les **LTC-IC** (*Long Term Culture- Initiating Cell*) sont proches des pré-CFC au sein de la hiérarchie hématopoïétique (Figure 5). Elles ont été décrites par Dexter qui a réalisé une culture liquide sur une longue période de plusieurs semaines (souvent 5 semaines) permettant la disparition des précurseurs et des progéniteurs engagés et surtout la différenciation des progéniteurs immatures en CFC. La détermination de la fréquence de LTC-IC au sein d'une population enrichie en cellules hématopoïétiques primitives, nécessite la réalisation des cultures en dilutions limites.

Cette culture est effectuée sur une couche de cellules stromales nourricières permettant de « mimer » le micro-environnement médullaire. Le stroma peut être issu de moelle osseuse fraîche (Dexter et al., 1977b) ou de lignées stromales murines pour la plupart, type MS-5 (Issaad et al. 1993). Ces cellules fournissent à la population hématopoïétique d'intérêt des facteurs de croissance, des cytokines et présentent des molécules d'adhésion nécessaires à leur prolifération. Ce système de cultures a été appelé: « cultures de Dexter ». Il a permis à l'équipe de Eaves CJ de mettre au point chez l'Homme le test LTC-IC qui vise à identifier les progéniteurs immatures ayant l'activité LTC-IC (Sutherland et al., 1990). Cette activité est en effet dépendante de la fréquence des CFC (produits par les LTC-IC) évaluée systématiquement au cours de la culture par implantation dans un milieu semi-solide.

Le test **CAFC** (*Cobblestone Area Forming Cell*) est une miniaturisation de la culture à longue terme (Figure 5). Ce sont des progéniteurs primitifs multipotents capables, après une longue culture en dilution limite sur une couche de cellules stromales irradiées, de développer des colonies juste sous le stroma (de Haan et al., 1997). Ces colonies sont comptées à l'aide d'un microscope inversé à contraste de phase. En principe, les cellules stromales suffisent pour induire la formation de colonies (Schrezenmeier et al., 1996), toutefois, certaines équipes ajoutent des cytokines exogènes (Breems et al., 1994).

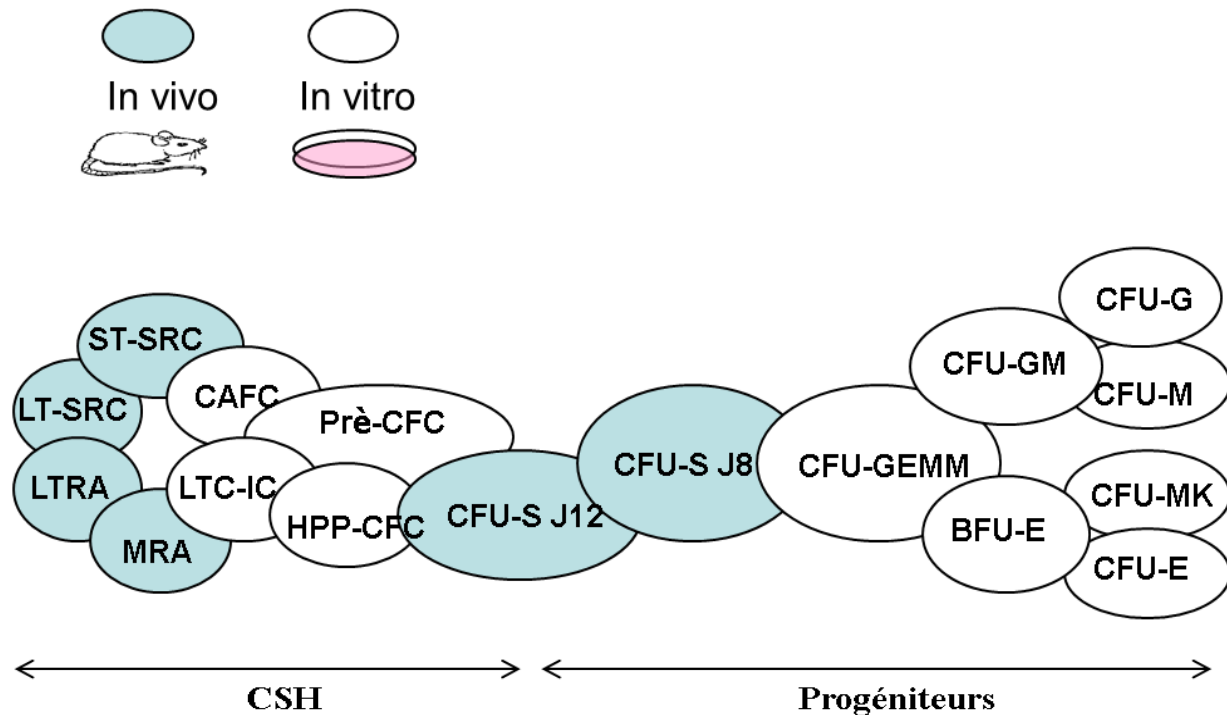


Figure 5 : Hiérarchie des CSH et des progéniteurs en fonction de la méthode de détection.

LT-SRC : Long Term SCID Repopulating Cell ; LTRA : Long Term Repopulating Ability ; CAFC: Cobblestone Area Forming Cell ; ST-SRC : Short Term SCID Repopulating Cell; MRA : Marrow repopulating ability; Prè-CFC: Pre-Colony Forming Cell ; LTC-IC : Long Term Culture Initiating Cell; HPP-CFC : Colony Forming Cells with High Proliferative Potential ; CFU-S : Colony Forming Unit in the Spleen; CFC : Colony Forming Cell; CFU-GEMM: CFU-Granuleuse/Erythrocytaire/Macrophagique/Mégacaryocytaire ; CFU-G : CFU-Granulocytaire; CFU-GM: CFU-Granulo-Macrophagique ; BFU-E : Burst Forming Unit-Erythroïde ; CFU-Baso: CFU-Basophile ; CFU-Eo : CFU-Eosinophile ; CFU-M : CFU-Macrophagique ; CFU-MK: CFU-Mégacaryocytaire ; CFU-E : Colony Forming Unit Erythroïde.

(Adapté d'après Brunet de la Grange, 2004).

I.C.3.2- Tests *In vivo*

Aucun des tests *in vitro* classiques (test identifiant les CFC ou les cellules plus primitives LTC-IC) ne permet d'évaluer avec certitude le compartiment des cellules souches primitives. L'analyse de la reconstitution hématopoïétique *in vivo* après transplantation de cellules hématopoïétiques constitue le seul test capable de démontrer sans ambiguïté l'existence des cellules souches les plus primitives. Dans ce but, différents groupes ont transplanté des cellules humaines dans des modèles animaux : fœtus de mouton (Zanjani et al., 1996), de lapin, de porc, de singe et des souris immunodéficientes (Dick, 1996).

Le modèle dominant dans ce domaine est effectivement la souris grâce à laquelle la pratique des tests *in vivo* a pris de plus en plus d'ampleur. En effet, outre une certaine spécificité de son système immunologique, la possibilité de créer des souris immuno-modifiées rend le modèle murin privilégié pour la recherche en immunologie. Les souris immunodéficientes permettent d'accepter des cellules xénogéniques (xénogreffe des cellules et tissus humains en l'occurrence) du fait de la réduction de leur barrière immunologique.

Ces modèles de xénogreffe permettent de mettre en évidence le critère principal de la cellule souche hématopoïétique à savoir, la reconstitution à long terme du système hématopoïétique après un conditionnement adéquat du receveur.

Le développement de modèles murins immunodéficients (comme la souris NOG/SCID : NOD/LtSz-scid IL2 γ -/-), qui représentent les meilleurs hôtes pour les CSH, a révolutionné la caractérisation des CSH humaines par xénogreffe (Shultz et al., 2007; Kamel-Reid and Dick, 1988).

- Les souris immunodéficientes humanisées

A la fin des années 80, les premières xénogreffes de cellules hématopoïétiques humaines ont été réalisées en utilisant la souris SCID (*Severe Combined ImmunoDeficiency*). Mosier DE est le premier à avoir réalisé une injection péritonéale des cellules humaines (Mosier et al., 1988); la transplantation des cellules hématopoïétiques par voie intraveineuse a, quant à elle, été réalisée par l'équipe de JE Dick. Les souris SCID sont radiosensibles et ne possèdent ni réponse humorale, ni réponse cellulaire T, ce qui a permis de greffer des cellules hématopoïétiques humaines (Kamel-Reid and Dick, 1988). Toutefois, le chimérisme humain ne représente qu'un faible pourcentage de la moelle totale du receveur murin. L'administration aux souris de certaines cytokines et facteurs de croissance humaines (IL-3, EPO, SCF, GM-CSF ...etc) assure le développement et la différenciation des cellules humaines (Lapidot et al., 1992).

Par la suite, les cellules souches humaines capables de coloniser et d'établir une vraie hématopoïèse humaine au sein de la moelle osseuse murine après injection intraveineuse porteront une appellation dérivée de ce modèle de souris SCID : *Scid-Repopulating Cell* (SRC) qui représentent les cellules du chimérisme humain.

Devant la difficulté à obtenir un repeuplement médullaire satisfaisant avec le modèle SCID, la souris NOD/SCID (*Non Obese Diabetic/SCID*) s'est montrée plus permissive au développement hématopoïétique humain et a permis d'obtenir de meilleurs niveaux de greffe puisqu'en plus de l'absence de lymphocytes B et T, cette souris présente une déplétion accrue en cellules NK, macrophages et une absence de complément actif (Shultz et al., 1995) chez cette souris. Cette souris a été utilisée et validée avec des greffons de différents types : lymphocytes T humains, CSH isolées à partir du sang placentaire (Pflumio et al., 1996), de cellules de la moelle osseuse (Cashman et al., 1997) et de cellules de sang périphérique mobilisé (Hogan et al., 1997). Cependant, la présence résiduelle, chez cette souris NOD/SCID, de cellules NK et de macrophages inactifs constitue encore un facteur limitant de la prise de greffe. Ceci a abouti au développement de protocoles afin d'éliminer ces cellules et reposant sur l'administration d'un anticorps anti-asialo GM1 (Yoshino et al., 2000) ou d'un anticorps anti-CD122 (chaîne β du récepteur à l'IL-2) ce qui a pour effet d'en améliorer le repeuplement à partir des cellules du donneur.

De nouveaux modèles murins ont été par la suite développés dans le but de rendre ces animaux encore plus immunodéficients et de permettre une étude à très long terme de l'hématopoïèse : la souris NOD/SCID/ $\beta 2m^{-/-}$ où le gène $\beta 2$ de la microglobuline est absent. Le développement des souris humanisées ayant été mutées sur le locus de la chaîne γ du récepteur à l'interleukine 2 a représenté une grande avancée dans ce domaine (Ito et al., 2002 ; Shultz et al., 2005) puisque la chaîne γ est un composant crucial dans la liaison et la transduction du signal des interleukines : IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21 (Sugamura et al., 1996). Grâce à cette mutation, une nouvelle génération de souris a été obtenue, la souris NOG/SCID (NOD/LtSz-scid IL2 γ null) (Shultz et al., 2005). Dans cette souris, les fonctions des lymphocytes B et T sont supprimées, la fonction des macrophages et des cellules dendritiques est réduite, l'activité des NK est éliminée et finalement la production cytokinique est remarquablement réduite. Ceci a contribué à ce que la greffe de CSH dans ces souris soit plus efficace que dans les lignées précédentes, permettant ainsi de diminuer le nombre de CSH nécessaires à la greffe. Ce modèle permet également la différenciation des CSH en progéniteurs des différents lignages hématopoïétiques (Shultz et al., 2005). De plus, les souris IL2 $\gamma^{-/-}$ rendent possible l'analyse des *Short Term-* et *Long Term-Repopulating Stem Cells*, mises en évidence dans le modèle de la NOD/SCID (Guenechea et al., 1999; Mazurier et al., 2003).

Différents modes d'injections des CSH ont permis de mieux les caractériser, et notamment d'étudier le rôle du micro-environnement également appelé « niche ». Ainsi, Mazurier et al ont pu mettre en évidence une nouvelle population cellulaire de CSH : les R-SRC (*Rapid-Scid Repopulating Cells*) détectées après seulement 15 jours de la greffe dans les souris NOG/SCID (Mazurier et al., 2003). En effet, l'injection par voie intra-fémorale, effectuée par l'auteur, a permis aux cellules de « se nicher » directement dans la moelle osseuse évitant ainsi leurs séquestrations massives (notamment pulmonaire) suite à l'injection intraveineuse classique. L'injection de cellules humaines est toujours précédée par un conditionnement approprié des souris soit par l'irradiation corporelle soit par l'injection intrapéritonéale de Busulfan (Robert-Richard et al., 2006) (sous différents protocoles). Il faut noter que la xénogreffe dans les souris NOG/SCID n'a pas besoin de l'administration de cytokines pour favoriser la prise de greffe comme c'est le cas avec les souris NOD/SCID (Bonnet et al., 1999). Ces différentes données confirment l'intérêt des souris NOG/SCID comme modèle d'étude du micro-environnement médullaire et le comportement des CSH.

Les populations mises en évidence lors des tests *in vivo* :

Les **CFU-S** (*Colony Forming Unit in the Spleen*) décrite par Till et McCulloch (Till and McCulloch, 1961; Milenković et al., 1983) dans les années 60, elles représentent une population plus primitive que les précurseurs reconnaissables morphologiquement et les progéniteurs engagés mais moins primitive que les « vraies » cellules souches (Figure 5). Elles ont été détectées dans les souris irradiées létalement et injectées avec des cellules médullaires provenant d'une souris syngénique ; elles sont présentes dans les colonies macroscopiques développées en 1 à 2 semaines au niveau de la rate et capables de reconstituer l'hématopoïèse murine déficiente (Siminovitch et al., 1963; Till et al., 1964). Ceci indique que cette population CFU-S est assez hétérogène car elle contient également une minorité des cellules primitives.

Les cellules Pré-CFU-S, ou les cellules ayant le potentiel de repeupler la moelle **MRA** (Ploemacher and Brons, 1989; Hodgson and Bradley, 1979) et **LTRA** (*Marrow Repopulating Ability* et *Long Term Repopulating Ability*) sont de vraies cellules souches murines qui s'auto-renouvellent et reconstruisent rapidement l'hématopoïèse.

Elles se distinguent par un auto-renouvellement limité (MRA) ou prolongé (LTRA) (Morrison and Weissman, 1994) (Figure 5).

Les **LT-SRC** et **ST-SRC** (*Long Term SCID Repopulation Cell* ou *Short Term SCID Repopulation Cell*) sont des CSH humaines qui reconstituent l'hématopoïèse, seulement pendant une durée limitée à environ 3 mois (pour les ST-SRC) ou tout au long de la vie (pour les LT-SRC). Dans le modèle murin, les cellules LT-SRC sont distinguées des ST-SRC par leur capacité à initier la greffe en série alors que les ST-SRC greffent rapidement le premier receveur mais elles perdent cette capacité dans le deuxième receveur (Guenechea et al., 2001) (Figure 5).

II. Micro-environnement Médullaire et Cellules Souches/Stromales Mésenchymateuses

Le micro-environnement médullaire désigne l'ensemble formé par la matrice extracellulaire et les cellules médullaires constituant, d'une part, le stroma médullaire et, d'autre part, les molécules et les facteurs solubles produits par ces cellules.

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) résident dans la niche située près de l'endoste dans la cavité médullaire et son interaction avec les différents acteurs de ce micro-environnement hématopoïétique est sans doute cruciale pour déterminer le sort de CSH : auto-renouvellement, apoptose, mobilisation de la niche, engagement dans le processus de différenciation. Les interactions incluent l'adhérence aux cellules du stroma médullaire qui secrètent des facteurs de croissance et présentent sur leurs membranes des protéines de la matrice extracellulaire. En réalité le terme micro-environnement médullaire fait référence à la « niche » des CSH qui constitue le milieu étroit des CSH. Certains auteurs considèrent la niche comme synonyme du micro-environnement médullaire, toutefois, pour la plupart, elle est seulement une partie de ce micro-environnement.

II.A- La niche hématopoïétique

La niche hématopoïétique est constituée de plusieurs types cellulaires interagissant avec la matrice extracellulaire grâce à la fibronectine et au collagène. La niche permet aux cellules souches d'être au contact avec la matrice extracellulaire, des différents récepteurs cellulaires et des cytokines. Ces interactions ont pour but le maintien de l'immaturité des CSH et la régulation de leur migration.

Friedenstein (Friedenstein et al., 1970) a constaté que les CSM injectées sous la capsule rénale, produisant des tissus fibreux de l'os ou des trabécules osseux, forment des foyers d'hématopoïèse dont les cellules hématopoïétiques sont originaires du receveur. Ces observations ont suggéré l'existence d'une niche pour les CSH circulantes qui trouvent des sites d'ancrage et de développement favorables dans des colonies issues des CFU-F.

Le concept de niche a été ensuite approfondi par Schofield (Schofield, 1978) qui a émis l'hypothèse que les CSH ne pouvaient maintenir leur «souchitude» (équilibre entre auto-renouvellement et détermination vers les lignages hématopoïétiques) qu'en gardant un contact physique avec un stroma approprié consistant en des cellules stromales associées à leur matrice extracellulaire.

La niche peut ainsi être définie comme le milieu biologique particulier constitué de l'ensemble de contacts et de signaux solubles issus des cellules et de la matrice extracellulaire du micro-environnement médullaire ; l'interaction entre ces différents acteurs contrôle la survie, la quiescence, l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches (Spradling et al., 2001).

La notion de «niche» est actuellement approuvée et appliquée sur la plupart des cellules souches. En effet, il existe des points communs dans toutes les niches : interaction avec des cellules de soutien médiée par des molécules d'adhésion transmettant les signaux via des protéines de signalisation.

Cependant, une trentaine d'années après les travaux de Dexter (Dexter et al., 1977b), en dépit d'un nombre considérable d'expérimentations, on ne connaît toujours pas précisément la composition exacte de cet environnement qui en fait le support indispensable à l'expression des propriétés des CSH. Beaucoup de molécules, de ligands, certains composants de la matrice extracellulaire, certaines cytokines transmembranaires et des molécules d'adhérence ont été identifiés comme des régulateurs importants des cellules souches identifiées *in vivo*, mais leurs contributions respectives et leurs cinétiques d'expression dans un réseau tridimensionnel extrêmement complexe et fluctuant sont inconnues.

Parmi les questions qui ne sont pas complètement résolues figure celle de l'existence d'une ou de plusieurs niches hématopoïétiques. En effet, deux types de niches de CSH ont été suggérées: (1) **la niche ostéoblastique** (endostéale) dans laquelle résident les CSH en contact étroit avec l'endoste de l'os trabéculaire (Askmyr et al., 2009) (*elle sera discuté dans le paragraphe II.B.1.1.2- P. 45*).

(2) **la niche vasculaire**, où les CSH sont attachées aux CE des sinusoides médullaires (Askmyr et al., 2009) (*elle sera discutée dans le paragraphe II.B.1.2.2- P. 47*) (Figure 6).

L'état actuel des connaissances concernant la contribution de ces deux niches montre que la niche endostéale serait probablement un réservoir à long terme de CSH qui protégerait et garderait ces cellules en état quiescent (niche quiescente) (Trumpp et al., 2010). Une étude récente a même trouvé que cette niche serait la niche principale car après l'injection de *Hoechst 33342 in vivo* et l'analyse des cellules hématopoïétiques obtenues, Winkler a constaté que les cellules les plus primitives (Lin^- , Sca1^+ , c-Kit^+ , CD148^- , CD150^+) sont localisées dans la niche endostéale où les

basses concentrations d'O₂ (BC-O₂) joueraient un rôle primordial (Winkler et al., 2010). La niche vasculaire étant plus riche en nutriments, en facteurs de croissances et en oxygène, elle favoriserait plutôt la prolifération (niche proliférative), la différenciation (Avecilla et al., 2004) et la mobilisation des CSH et des progéniteurs pour finalement les transférer dans la circulation systémique une fois arrivées à maturation (Kopp et al., 2005 ; Lataillade et al., 2008).

A coté de ces deux niches principales, il en a été proposé une troisième : **la niche stromale réticulaire** où les CSH sont associées aux cellules stromales réticulaires qui entourent les CE sinusoïdales ou qui se trouvent près de l'endoste (Nagasawa et al., 2011) (Figure 6). L'implication de chacune de toutes ces cellules dans la régulation de l'hématopoïèse et dans le devenir des CSH est détaillée ci-après.

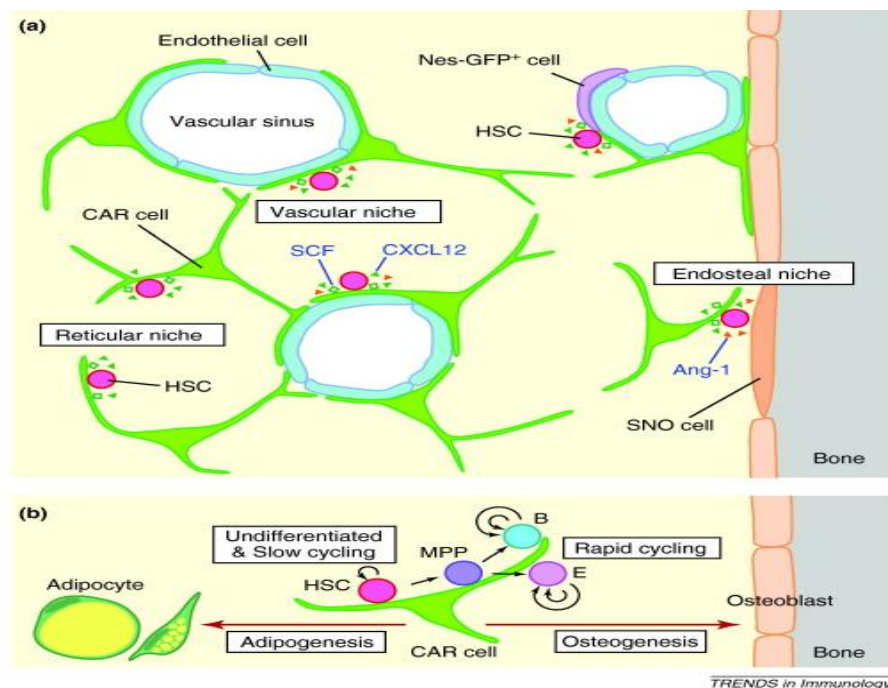


Figure 6 : Niches réticulaires créées par les progéniteurs mésenchymateux pouvant maintenir et réguler les CSH. (a) Un modèle montrant la localisation des CSH et leur association avec les différentes niches hématopoïétiques. La plupart des CSH sont en contact avec le processus des cellules CAR (*CXCL-12 Abundant Reticular Cells*) produisant le CXCL12 et le SCF (des facteurs essentiels pour le maintien des CSH). De nombreuses CSH sont en contact avec les cellules qui entourent les CE sinusoïdales. Une petite population de CSH est en contact avec des cellules SNO (*Spindle-Shaped Ncadherin⁺ CD45⁻ osteoblastic cells*) ainsi que des cellules CAR. La relation entre les cellules subendothéliales Nes-GFP⁺ avec des cellules CAR et les CSM subendothéliales Sca-1⁺ reste à dévoiler. (b) les cellules CAR sont des progéniteurs adipo-ostéogéniques et sont nécessaires pour la prolifération des progéniteurs érythroïdes et lymphoïdes ainsi que les CSH, et le maintien de CSH dans un état indifférencié. MPP, les progéniteurs multipotents. (D'après Nagasawa et al., 2011).

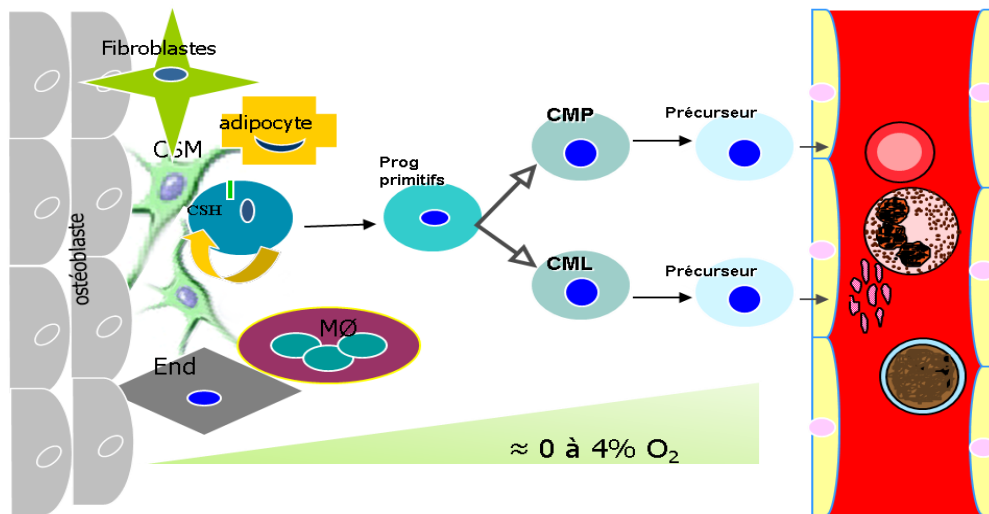


Figure 7 : Illustration abrégée de l'hématopoïèse.

La CSH dans sa niche interagit avec la matrice extracellulaire et avec les différentes cellules constituant son micro-environnement : ostéoblaste, CE, réticulocyte, fibroblaste, adipocytes, macrophage (MØ) et des CSM, sous oxygénation proche de zéro. Le résultat de cette interaction est exprimé soit par l'auto-renouvellement ou soit par l'engagement dans les voies de différenciation.

II.B- Composants et régulation du micro-environnement médullaire

Le micro-environnement médullaire est donc constitué d'un composant cellulaire, d'une matrice extracellulaire et de facteurs solubles.

La description des mécanismes régulant les interactions entre les CSH et leur milieu ainsi que les différents acteurs de leur micro-environnement est très importante afin d'expliquer la logique de notre travail et notre choix du modèle. Le rôle de $BC-O_2$ qui est un paramètre primordial incontournable dans la constitution de ce milieu physiologique sera discuté dans le chapitre IV.

Malgré la complexité des interactions dans le micro-environnement médullaire, certains mécanismes régulateurs peuvent être identifiés : (1) mécanismes cellulaires intrinsèques combinés (Tie2/angiopoïétin-1, Notch/Jagged, Frizzled/Wnt, sonic Hedgehog signaling, etc.), (2) interactions des molécules d'adhésion (VLA-4 (*Very Late Activation Antigen*), VLA-5, CD44, N-cadhérine, etc.), et de la (3) matrice extracellulaire avec des éléments environnementaux comme le calcium, les concentrations d'oxygène, les hormones (hormone parathyroïdienne (PTH)), BMP-2/-4 (*Bone Morphogenic Proteins*), cytokines (FGF-4 (*Fibroblast Growth Factor*), SCF,

VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), TPO, etc), et chimiokines (CXCL12, IL-8, etc.) (Arai and Suda, 2007; Lataillade et al., 2008).

II.B.1- Le composant cellulaire

Il s'agit majoritairement de cellules stromales non hématopoïétiques (origine mésenchymateuse) : les ostéoblastes, les réticulocytes, les adipocytes et les CSM (Wilkins and Jones, 1995). Cependant, des cellules d'origine hématopoïétique y participent également activement ; c'est le cas des cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes, monocytes), des ostéoclastes et des Cellules Endothéliales (CE). Toutes ces cellules sont capables de sécréter des facteurs de croissance, mais aussi des facteurs inhibiteurs de l'hématopoïèse.

II.B.1.1. Cellules d'origine mésenchymateuse

II.B.1.1.1- Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM)

Les CSM sont parmi les composants critiques qui participent à la création du micro-environnement nécessaire à l'hématopoïèse et à la régulation des CSH (Kiel and Morrison, 2008). Lévesque et Winkler appellent « niche mésenchymateuse/ostéoblastique », la niche endostéale en insistant sur le rôle essentiel des CSM dans la niche hématopoïétique (Lévesque and Winkler, 2011). Récemment, Méndez-Ferrer a clairement démontré la participation directe des CSM à la formation de la niche *in vivo* et, en conséquence, au maintien des CSH (Méndez-Ferrer et al., 2010). En culture à long terme, les CSM participent à la formation d'un environnement où les cellules hématopoïétiques immatures survivent, prolifèrent et se différencient sur plusieurs semaines grâce à un effet anti-apoptotique et inducteur de la prolifération de la part des CSM (Majumdar et al., 2003; Mourcin et al., 2005).

Il existe actuellement des données suggérant que les CSM seraient localisées autour des vaisseaux parmi les cellules péricytes (Sacchetti et al., 2007; Crisan et al., 2008; Méndez-Ferrer et al., 2010). Les péricytes sont présentes dans tous les tissus et ont pour fonction la stabilisation du réseau vasculaire en contrôlant la prolifération des CE et en assurant la contractilité des microvaisseaux. Ces péricytes humaines CD146⁺, après injection chez la souris, favorisent le développement d'une hématopoïèse murine (Sacchetti et al., 2007). La ressemblance avec les CSM notamment en termes de phénotype, de capacité de différenciation et de l'absence des marqueurs hématopoïétiques et endothéliales a incité certains auteurs à considérer les péricytes comme l'origine des CSM (Crisan et al., 2008).

De plus, les CSM sont à l'origine des fibroblastes qui représentent en réalité une fraction importante des cellules stromales et sont connues comme étant des cellules du tissu conjonctif. Ces cellules sont essentielles à la production des protéines complexes qui créent le réseau de soutien formé de fibres de réticuline, fibronectine, laminine et de fibres de collagène de type I, III et IV. Elles sont donc responsables de la synthèse et du maintien des constituants de la matrice extracellulaire. De plus, certains auteurs confèrent à ces cellules une capacité de maintien de l'hématopoïèse *in vitro* (Moreau et al., 1993) ou même d'induction de la prolifération et la maturation des progéniteurs hématopoïétiques (Lisovsky et al., 1996). Cependant, ces dernières capacités restent un sujet controversé.

(Le rôle de CSM sera détaillé dans le chapitre III Introduction- P. 64).

II.B.1.1.2- Les Ostéoblastes

L'architecture spatiale particulière de la moelle osseuse chez les mammifères montre une distribution des CSH essentiellement à proximité de la surface endostéale (Nilsson et al., 2001) et un nombre croissant de cellules différenciées au fur et à mesure que l'on s'approche de l'axe longitudinal central de l'os. Il a été montré que les CSH isolées de la région endostéale sont plus primitives que celles résidant dans la région médullaire centrale (Grassinger et al., 2010). Cette organisation non aléatoire de la moelle osseuse a suggéré, il y a longtemps, une relation possible entre les CSH et les ostéoblastes tapissant la surface endostéale et ayant pour fonction principale la formation de l'os. Récemment, une population des ostéoblastes exprimant fortement la molécule d'adhésion N-Cadhérine à leur surface et appelée SNO (*Spindle-shaped N-cadherine⁺ CD45- Osteoblastic*) a été identifiée comme régulatrice principale de la niche ostéoblastique et de l'hématopoïèse. Plusieurs travaux ont montré leur rôle primordial *in vivo* dans la régulation du nombre des CSH (Nagasawa et al., 2011; Zhang et al., 2003).

Dans un modèle murin, *in vivo*, les auteurs ont essayé de modifier le nombre d'ostéoblastes via des mutations du gène codant pour le récepteur BMP1 et la surexpression du récepteur de PTH et ont ensuite analysé l'impact sur les CSH. Ils ont trouvé que l'augmentation des ostéoblastes s'accompagnait d'une augmentation simultanée du nombre de CSH. Dans ces études, l'implication de certaines molécules d'adhésion notamment la N-cadhérine (exprimée sur les ostéoblastes immatures) avec la β -caténine a été observée (Zhang et al., 2003).

De même, des expériences réalisées *in vitro* montrent que le stroma riche en ostéoblastes favorise le maintien de l'activité CSH à long terme en impliquant la N-cadhérine (Nakamura et al., 2010; Hosokawa et al., 2010; Taichman et al., 1996).

L'effet paracrine des ostéoblastes, tout comme le contact cellulaire, est impliqué dans ce processus. En effet, ces cellules secrètent constitutivement un panel très large de cytokines, le G-CSF, GM-CSF (*Granulocytic/Macrophagic- Colony Stimulating Factor*), TGF- β (*Transforming Growth Factor*), TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*), IL-6, IL-11 et SCF (Taichman and Emerson, 1994; Calvi et al., 2003). Une autre étude a également révélé une implication importante de SDF-1 α dans l'effet des ostéoblastes sur l'hématopoïèse (Mishima et al., 2010).

L'équipe de RS Taichman (Jung et al., 2005) a ensuite constaté que le contact cellulaire est critique pour la survie et l'activité des progéniteurs hématopoïétiques cultivés avec les ostéoblastes, et que l'implication de VLA-4, de son ligand VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule*) et de VLA-5 est primordiale.

Différentes voies de signalisation sont impliquées dans la communication des ostéoblastes vers les cellules hématopoïétiques, parmi lesquelles :1) la voie de la BMP avec N-Cadhérine et la β -Caténine (Zhang et al., 2003) 2) la voie de Notch1- Jagged (Calvi et al., 2003) 3) La voie de Tie2/Ang-1 (Arai et al., 2004).

Cependant, cette communication peut également se faire dans le sens opposé (cellules hématopoïétiques vers le micro-environnement) puisque Jung et al (Jung et al., 2008) ont montré qu'après un stress myélo-toxique, les CSH seraient capables d'orienter la différenciation de cellules mésenchymateuses vers la lignée ostéoblastique et ainsi de diriger l'aménagement de leur niche via l'activation de la voie BMP.

II.B.1.1.3- Les Cellules Réticulaires

Ce sont les cellules qui forment la niche réticulaire. Une petite population médullaire minoritaire appelée CAR (*CXCL-12 Abundant Reticular Cells*) qui entourent les CE sinusoidales et expriment le VCAM-1, le CXCL12 et le SCF qui sont essentiels pour le maintien des CSH (Omatsu et al., 2010). L'analyse immuno-histochimique a montré que presque toutes les CSH (CD150⁺ CD48⁻ CD41⁻) sont en contact avec les cellules CAR pour former la niche réticulaire (Tokoyoda et al., 2004; Sugiyama et al., 2006). Les données suggèrent que les cellules CAR sont des progéniteurs adipo-ostéogéniques importants pour le maintien de l'état indifférencié des CSH

et la prolifération des progéniteurs B et érythroïdes (Figure 6 et 7) (Tokoyoda et al., 2004; Sugiyama et al., 2006).

II.B.1.1.4- Les Adipocytes

Constituant un élément essentiel du micro-environnement de la moelle osseuse, les adipocytes médullaires semblent jouer un rôle important dans l'hématopoïèse. Ils constituent une réserve en métabolites énergétiques nécessaires à l'hématopoïèse (Hussain et al., 1989). Après l'identification des CSM à partir des tissus adipeux, le rôle des adipocytes dans l'hématopoïèse est facilement défendable. En réalité, l'adipocyte médullaire, par ses propriétés endocrines et, en particulier, sa capacité de sécréter la leptine et l'adiponectine, joue un rôle direct dans la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques (Yokota et al., 2003) et peut diriger les progéniteurs immatures vers une différenciation complète (Corre et al., 2004). Cette propriété semble opposée à celle des ostéoblastes alors qu'il existerait une possibilité de conversion phénotypique entre ces deux types cellulaires, reflétant l'origine commune, à savoir les CSM (Laharrague et al., 1999).

II.B.1.2. Cellules d'origine hématopoïétique

II.B.1.2.1- Les Ostéoclastes

Ce sont des cellules d'origine hématopoïétique (issues de la différenciation des macrophages) ayant pour fonction principale, la résorption du tissu osseux et donc son modelage (Nakamura et al., 2012). Il a été montré que ces cellules jouent un rôle crucial dans la pathogénicité des cellules de Myélome Multiple (MM) en produisant des facteurs de croissance appartenant à la superfamille TNF (Moreaux et al., 2004).

II.B.1.2.2- Les Cellules Endothéliales (CE)

Ce sont les cellules qui forment la partie interne de parois des sinusoides médullaires. Les CE sont activement impliquées dans les mécanismes qui favorisent le passage des éléments cellulaires de la moelle osseuse vers le sang. Les CE reposent sur une fine membrane basale constituée de différentes molécules de la matrice extracellulaire et notamment de laminine, de fibronectine et de collagène de type IV (Rafii et al., 1997). Il est probable qu'elles ont une origine

commune avec les CSH (l'hémangioblaste) (Choi et al., 1998) ou peuvent même être produites par des CSH.

Dans le micro-environnement hématopoïétique, quelle que soit leur origine (le sac vitellin, le foie fœtal ou la moelle osseuse), les CE micro-vasculaires fournissent le contact cellulaire et sécrètent un grand nombre de cytokines et de facteurs de croissance qui permettent la préservation de la stabilité de l'hématopoïèse. Parmi ces molécules il y a les cytokines spécifiques des lignées comme G-CSF, GM-CSF, M-CSF, C-Kit-ligand et les facteurs inhibiteurs leucémiques ... etc. (Rafii et al., 1997). Ces CE expriment les marqueurs CD34 et CD31 et sont positives pour le facteur de Willebrand. Elles contribuent à créer la niche vasculaire des CSH où elles représentent l'élément principal (Askmyr et al., 2009; Li et al., 2004) sans lequel l'hématopoïèse est gravement affectée (Avecilla et al., 2004). Il y a quelques années, grâce à la famille des récepteurs SLAM (*Signaling Lymphocyte Activation Molecule*) dont l'expression pourrait distinguer les CSH des progéniteurs, Kiel JM et al ont pu confirmer la présence de la niche vasculaire où les CSH sont en contact avec des CE sinusoïdales (Kiel et al., 2005).

La co-culture *ex vivo* de CE primaires et de CSH favorise l'expansion de ces dernières et augmente leur capacité de greffe en transplantation compétitive (Li et al., 2003b). De même, une population médullaire de CE s'est montrée capable de préserver la primitivité (auto-renouvellement) des CSH après une co-culture *ex vivo* avec une implication primordiale de la voie Notch (Butler et al., 2010).

Cependant, toutes les CE primaires issues d'organes non hématopoïétiques ne permettent pas de favoriser le maintien de la capacité de greffe des CSH (Li et al., 2004).

II.B.1.2.3- Les Macrophages

Les macrophages médullaires sont également considérés comme faisant partie du stroma. Contrairement aux autres cellules stromales, les macrophages expriment des marqueurs hématopoïétiques et monocytaires spécifiques: CD45, CD11b, CD14. Mais ils ne sont pas impliqués dans la synthèse du collagène. Ils sont facilement identifiables par leur activité phagocytaire, disposés à proximité des capillaires sinusoïdes en position adventitielle. Ils apparaissent nécessaires à la maturation des cellules hématopoïétiques en particulier les érythroblastes où ils occupent le centre des îlots érythroblastiques permettant notamment l'énucléation du noyau, et des lymphocytes (Perkins and Fleischman, 1988).

L'équipe de Winkler a rapporté un rôle important des macrophages dans la niche. Dans cette étude chez la souris, elle a montré que la déplétion des macrophages induit la mobilisation des CSH suite à la diminution des ostéoblastes ainsi que les cytokines trophiques à l'endoste (Winkler et al., 2010).

II.B.2- La Matrice Extracellulaire

C'est un réseau complexe de fibres et de protéines, dont le collagène, la laminine et de la fibronectine auxquels viennent adhérer les cellules hématopoïétiques. Cette adhérence est probablement capitale compte tenu de l'important réservoir en facteurs de croissance que possède cette matrice.

Hosokawa et al ont montré que la N-cadhérine a une place primordiale dans le rétablissement de l'hématopoïèse dans la niche médullaire après transplantation (Hosokawa et al., 2010). D'autres molécules telles que le CD44 et l'acide hyaluronique sont des composants cruciaux de la matrice extracellulaire. Elles sont fortement exprimées sur les CE sécrétant SDF-1 et leur implication dans le *homing* de CSH a été décrite (Avigdor et al., 2004).

II.B.3- Facteurs de croissance et cytokines

L'étude des cellules souches par culture de CSH *in vitro* a montré la nécessité de "facteurs de croissance hématopoïétiques" pour la survie, la multiplication, la différenciation et la maturation des cellules hématopoïétiques. Ces facteurs sont principalement produits par des cellules médullaires stromales ou des cellules matures dans le sang. Depuis 10 ans, les cytokines recombinantes sont identifiées, clonées et produites, ce qui a facilité notre compréhension de l'hématopoïèse.

Leur action, par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques, peut être paracrine (cellules proches), endocrine (cellules ou tissus distants (comme le cas de l'EPO sécrétée par le rein) et rejoignant la cible médullaire par la circulation générale), juxtacrine (cellules en contact) ou autocrine (sur la cellule productrice ou une cellule proche du même type).

Il est effectivement extrêmement compliqué de parler des fonctions distinctes de chaque cytokine, car l'hématologie expérimentale a montré que l'effet de chaque cytokine est lié aux conditions de culture et que la variation d'un seul des nombreux composants de culture suffit pour obtenir des résultats complètement différents (Douay, 2001). Ainsi, en utilisant plusieurs

types de cytokines dans une expérience le résultat peut montrer un effet redondant, synergique et même contraire.

II.B.3.1- Les cytokines stimulantes

Il existe de nombreuses cytokines ayant une action stimulante sur l'hématopoïèse primitive ou pouvant être spécialisées sur certaines lignées hématopoïétiques. L'effet peut également être très étendu.

II.B.3.1.1- *Stem Cell Factor* (SCF) ou C-kit Ligand (KL)

C'est une cytokine exprimée principalement par des cellules stromales médullaires. Elle exerce son effet en se liant au c-Kit qui est un récepteur tyrosine kinase exprimé sur toutes les CSH. Le défaut de l'expression de c-Kit conduit à une diminution des CSH «greffables» (Ikuta and Weissman, 1992).

Bien que le SCF ne soit pas essentiel pour la génération de CSH (Ikuta and Weissman, 1992), de nombreuses études (Hassan and Zander, 1996) ont montré qu'il pourrait prévenir leur apoptose. En réalité, presque toutes les combinaisons de cytokines utilisées à ce jour pour la culture de CSH comprennent le SCF. Cette cytokine potentialise l'auto-renouvellement symétrique en culture de CSH du foie fœtal mais aussi de CSH adultes (Bowie et al., 2007) ; cette activité a probablement besoin de la coopération des autres facteurs de croissance. Il a été montré que la forme transmembranaire du SCF fonctionne comme une molécule d'adhésion des CSH à leur environnement médullaire. Ainsi, le clivage de cette forme de SCF par le récepteur activateur du facteur nucléaire (NF)-kappa B (RANK) ligand et la cathepsine K (Kollet et al., 2006) ou par MMP-9 (métalloprotéinase-9) augmente la mobilisation CSH (Kollet et al., 2006). Pour conclure, le SCF a un rôle crucial dans la survie, la mobilité et l'auto-renouvellement des CSH en culture ainsi que dans les niches.

II.B.3.1.2- Flt-3 Ligand (FL)

Cette cytokine appartient à une petite famille hématopoïétique incluant le M-CSF et KL, qui est spécifique pour les récepteurs tyrosine kinase 3 (Lyman and Jacobsen, 1998). Son action sur l'hématopoïèse primitive est médiée essentiellement par son récepteur Flt-3 qui est exprimé principalement sur les CSH primitives.

FL joue un rôle moins important que KL dans la régulation de la myélopoïèse et de l'érythropoïèse ; en revanche, il intervient dans la production des cellules dendritiques et des cellules B (Lyman and Jacobsen, 1998). Bien que cette cytokine, comme le cas de KL, ne permette qu'une faible expansion des CSH lorsqu'elle est utilisée seule, elle présente un effet synergique lorsqu'elle est combinée avec KL ainsi qu'avec d'autres cytokines (Luens et al., 1998). Dans les modèles d'expansion *ex vivo* des greffons hématopoïétiques, le FL est fréquemment présent dans les cocktails cytokiniques, notamment en association avec le SCF et la TPO (Andrade et al., 2010).

II.B.3.1.3- Thrombopoïétine (TPO)

La TPO est la cytokine principale qui régule le développement des mégacaryocytes et des plaquettes. Avec son récepteur Mpl, elle exerce des effets profonds sur les cellules hématopoïétiques primitives. Toutes les souris knock-out pour TPO ou Mpl présentent une diminution du nombre de CSH «greffables» (Solar et al., 1998). Des études de culture *in vitro* (Matsunaga et al., 1998) indiquent aussi un rôle important de la TPO dans la préservation de la survie des CSH à long terme (Kaushansky, 2005).

Une étude récente (Tong et al., 2007) sur des souris a révélé un rôle pivot d'un signal inconnu émanant de la région membranaire à proximité du récepteur Mpl ou de JAK2 (*Janus Kinase*) qui est essentiel pour le maintien de l'activité CSH.

La TPO sécrétée par les cellules stromales peut également induire la stabilisation de HIF-1 α (*Hypoxia Inducible Factor*) (induction non hypoxique de HIF) qui est un régulateur principal de la fonction des CSH ; le HIF, à son tour, va stimuler la sécrétion de VEGF (Kirito et al., 2005). D'autre part, la surexpression de TPO et FL sur une lignée de CSM médullaire favorise clairement l'expansion *ex vivo* des cellules CD34⁺ du sang placentaire. Un effet important sur les cellules primitives LTC-IC et SRC a été également noté (Xie et al., 2005).

La TPO a un rôle important dans les protocoles d'expansion de CSH (greffe de CSH). Chez la souris, la TPO permet l'expansion des cellules hématopoïétiques les plus immatures dans une culture en milieu liquide (Yagi et al., 1999). En revanche, chez l'Homme, il a été montré que la TPO seule n'est pas suffisante pour activer les cellules CD34⁺ du SP et est donc combinée avec d'autres cytokines dans les protocoles cliniques (Reiffers et al., 1999; McNiece et al., 2000).

(*L'effet de TPO sur la quiescence de CSH est discuté dans II.B.4.3.3- P. 61*).

II.B.3.1.4- L'Interleukine 6 (IL-6)

L'IL-6 est un membre de la famille IL-6 qui comprend, entre autres, l'IL-11 et le LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*). Les récepteurs de cette famille partagent tous au moins une sous-unité de la protéine gp 130 (Kishimoto et al., 1995). L'IL-6 est un facteur doté d'une activité biologique extrêmement large et d'une action complexe sur l'hématopoïèse. Il existe deux formes de récepteur de l'IL-6 : récepteur soluble et membranaire.

(Le rôle de l'IL-6 sera détaillé dans III.C.1.1.5 - p. 73).

II.B.3.1.5- Colony Stimulating Factors (CSF)

Les CSFs sont capables de stimuler les CSH pour donner des colonies de cellules hématopoïétiques. Ainsi, elles sont indispensables pour le test CFC *in vitro* et font partie intégrante des cytokines utilisées pour estimer le nombre de CFC en milieux semi-solides. Certaines de ces molécules agissent sur des progéniteurs précoces et ne sont pas spécifiques d'une lignée donnée (GM-CSF, IL-3). D'autres ont une action restreinte à une lignée donnée et sont nécessaires à l'acquisition des caractères de différenciation spécifiques des cellules matures (EPO, IL-5).

Le **GM-CSF** (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*): Son action est plus restreinte que celle de l'IL-3 avec une activité sur la plupart des progéniteurs et sur les cellules matures des lignées granulo-monocytaires et éosinophiles. Non seulement il active la multiplication cellulaire, mais favorise aussi l'acquisition des fonctions de ces cellules (phagocytose, adhésion...) (Hayashida et al., 1990).

Le **G-CSF** (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*): C'est un facteur essentiellement actif sur la lignée granuleuse, y compris sur les cellules les plus matures.

Le **M-CSF** (*Macrophage Colony Stimulating Factor*) seul n'a pratiquement aucune activité CSFs. Il semble avoir besoin de GM-CSF à très faible concentration pour être stimulant. Il semble constituer le facteur de régulation de tout le système des phagocytes mononucléés (facteur de survie et d'activation des monocytes et des macrophages).

II.B.3.1.6- L'Interleukine 3 (IL-3)

Produite par des lymphocytes, l'IL-3 agit pendant les temps précoces de presque toutes les lignées hématopoïétiques et permet la formation de toutes sortes de colonies. Toutefois, il faut lui

associer de l'EPO pour obtenir une stimulation maximale de la formation de colonies érythroïdes. L'IL-3 peut également induire le développement de la lignée B. En effet, les cellules CD34⁺ placentaires humaines expansées *ex vivo* ont pu générer chez la souris des lymphocytes T et NK de façon dépendante de la présence de l'IL-3 dans la culture (Choi et al., 2008). Astori G a déjà montré que l'IL-3 est indispensable (notamment en association avec la TPO) pour obtenir une expansion satisfaisante des cellules CD34⁺ placentaires (Astori et al., 2001).

Il a été souvent montré que cette cytokine stimule la prolifération et la différenciation des cellules souches et des progéniteurs primitifs. Cette conclusion a été initialement obtenue sur la base d'une expérimentation dans un milieu contenant du sérum animal ou humain (Beshlawy et al., 2009). Les résultats de cette action aboutissent à l'épuisement des cellules souches au cours de la culture *ex vivo*. Il a été montré que l'IL-3 peut avoir un effet stimulateur de l'auto-renouvellement de CSH murines en synergie avec KL, FL et MGDF (*Megakaryocyte Growth and Development Factor*) (Bryder and Jacobsen, 2000), effet similaire à celui d'IL-11 (Yonemura et al., 1997). De façon très importante, les auteurs rapportent que l'expansion de greffon était également très importante dans un milieu contenant 10% SVF (Sérum de Veau Fœtal), en dépit d'une forte perte de l'activité de reconstitution. Dans ce sens, des expériences plus récentes effectuées avec du milieu sans sérum ont permis de mettre en évidence le fait que les deux effets de l'IL-3 (stimulant de la prolifération et de la différenciation des cellules souches) ne sont pas obligatoirement associés. En effet de très faibles doses d'IL-3 stimulent la prolifération mais pas la différenciation, alors que de fortes doses associent obligatoirement ces deux effets. Ainsi, un milieu bien adapté peut permettre de mettre en valeur l'effet positif de l'IL-3 à faibles doses sur l'amplification des cellules souches. Ces effets sont d'ailleurs hautement dépendants de la présence et de la concentration d'autres cytokines dans la culture qui interagissent dans la plupart des cas de façon synergique (Ivanovic, 2004a; Ivanovic and Boiron, 2009a). Yao CL et al, en suivant une méthodologie statistique, ont trouvé que l'effet de l'IL-3 sur l'expansion de CMN (Cellules Mononuclées) placentaires peut être atteint dans une dose très faible, entre 0,5 à 2 ng/mL, (loin de 20 à 50 ng/mL correspondent aux doses couramment utilisées) dans un milieu sans sérum (Yao et al., 2004).

L'effet de l'IL-3 peut être lié à la stimulation du transporteur transmembranaire du glucose (Ivanovic, 2004a). Selon le type cellulaire (McCoy et al., 1997), l'IL-3 induit l'expression ou

augmente l'affinité du transporteur dans certaines cellules (Ahmed and Berridge, 1997) alors qu'elle perd cette faculté sur d'autres cellules.

Enfin, l'IL-3 est capable d'agir en synergie avec des facteurs tels que le SCF le G-CSF assurant la survie et la prolifération des cellules les plus primitives. Une étude récente a montré que l'IL-3 tout comme l'IL-6 est indispensable à côté de SCF, FL, TPO pour une bonne expansion de cellules CD133⁺ *ex vivo* (Bordeaux-Rego et al., 2010).

II.B.3.1.7- L'Erythropoïétine (EPO)

Contrairement aux autres facteurs de croissance, l'EPO est synthétisée majoritairement au niveau du rein par les cellules endothéliales péritubulaires et faiblement au niveau hépatique. Dans le système hématopoïétique, elle constitue le facteur spécifique de la lignée érythroïde en agissant tardivement au cours de la différenciation érythroïde (les colonies BFU-E étant résistantes à l'EPO au contraire des CFU-E).

II.B.3.1.8- L'interleukine 5 (IL-5) agit sur les polynucléaires éosinophiles matures dont elle augmente la survie et les fonctions.

II.B.3.1.9- Autres facteurs stimulateurs

L'IL-17

Elle est sécrétée par un nouveau type de lymphocytes appelé Th17 (différentes de Th1/Th2) qui exerce ses activités biologiques sur de nombreux types cellulaires impliqués dans la réaction inflammatoire (Bettelli et al., 2007; Wang and Liu, 2008). L'IL-17 stimule la granulopoïèse, le trafic de neutrophiles et l'érythropoïèse (Jovcić et al., 2004). Les effets d'IL-17 sur les CSH sont indirects via la sécrétion des cytokines GM-CSF, G-CSF, IL-6 et chimiokines par les cellules stromales (Schwarzenberger and Kolls, 2002).

FGF-1 c'est un facteur de croissance sécrété par des cellules hépatiques fœtales qui pourrait être impliqué dans la préservation des cellules hématopoïétiques primitives *ex vivo* (de Haan et al., 2003).

L'IL-4, est une cytokine anti-inflammatoire produite par certaines cellules comme les basophiles et les lymphocytes T. Elle exerce son effet sur la lignée basophile et les lymphocytes B.

II.B.3.2- Les cytokines inhibitrices

Plusieurs facteurs ayant une fonction de régulation négative ont cependant été caractérisés.

II.B.3.2.1- Transforming Growth Factor β (TGF- β) est une protéine multifonctionnelle qui contrôle plusieurs processus cellulaires liés au développement et à l'auto-renouvellement des cellules somatiques (Fortunel et al., 2003). La voie de transduction du TGF- β est complexe, elle implique les protéines SMAD (*Mothers Against Decapentaplegic Homolog*) et MAP-kinase. Elle est un inhibiteur de l'entrée en cycle cellulaire des progéniteurs primitifs stimulés par les cytokines SCF, FL, TPO et IL-6. Néanmoins, son action est variable en fonction de l'état de différenciation des cellules et de l'interaction avec d'autres cytokines (Kim and Letterio, 2003). Certaines études ont montré qu'il induit la quiescence en augmentant l'expression de p21 et p57 (Scandura et al., 2004).

Il a été finalement démontré que le TGF- β sécrété par les CSM possède une activité immuno-modulatrice (Di Nicola et al., 2002).

II.B.3.2.2- L'Interleukine 10 (IL-10)

Cette cytokine est produite par des lymphocytes et a un rôle principalement négatif sur l'hématopoïèse. (*Le rôle de l'IL-10 sera plus détaillé dans III.C.1.1.4- P. 73*).

II.B.3.2.3- Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) est une cytokine multifonctionnelle qui est produite principalement par les macrophages et lymphocytes activés. Il agit en fait de manière différente (action inhibitrice ou stimulante) suivant les facteurs de croissance utilisés en culture pour stimuler la prolifération. Son rôle a été évoqué dans différents syndromes cliniques d'insuffisance ou de dysfonctionnement médullaire comme la réaction du greffon contre l'hôte, le rejet post-greffe ou l'aplasie médullaire suggérant ainsi son rôle inhibiteur de l'hématopoïèse (Reimold, 2002).

II.B.3.2.4- Platelet Factor 4 (PF4), inhibiteur de la thrombopoïèse.

II.B.3.2.5- *Macrophage-Inflammatory-Protein 1α* (MIP-1α), c'est un facteur qui prévient l'entrée en cycle des CSH et la prolifération des progéniteurs mais il stimule les précurseurs.

II.B.4- Autres facteurs intervenant dans la régulation de l'hématopoïèse

II.B.4.1- Les Chimiokines

Les chimiokines sont une famille de protéines de bas poids moléculaire qui ont une activité chimioattractante. Elles gouvernent le mouvement des leucocytes dans l'organisme aussi bien chez le sujet sain qu'au cours des pathologies inflammatoires, hématologiques et immunitaires. Elles jouent également un rôle important pour d'autres fonctions, comme le développement, la prolifération, la survie et la migration des CSH humaines et murines (Son et al., 2006).

Le **SDF-1** (*Stromal Cell-Derived Factor 1*) ou CXCL-12 est une chimiokine produite par les cellules stromales de la moelle et qui se fixe au récepteur CXCR-4 (CD184). La fixation du SDF-1 à son récepteur CXCR-4 sur des cellules CD34⁺ médullaires primitives induit une signalisation impliquant JAK2 et aboutissant à une réorganisation des protéines du cytosquelette. SDF-1 est chimiotactique et chimiokinétique pour les CSH médullaires, un gradient de SDF-1 induisant leur migration vers les fortes concentrations (Peled et al., 2000). Comme nous l'avons évoqué précédemment, les cellules CAR dans l'endothélium des sinusoides médullaires expriment une quantité importante de SDF-1. Ce SDF-1 active les intégrines VLA-4, VLA-5 et LFA-1 (*Lymphocyte Function Associated Antigen-1*) à la surface des cellules hématopoïétiques, ce qui favorise l'adhérence et puis le *homing* des CSH dans la niche. D'autres molécules telles que le CD44 et l'acide hyaluronique (un composant crucial de la matrice extracellulaire), seraient également fortement impliquées dans cet effet de SDF-1 (Avigdor et al., 2004). En outre, le SDF-1 joue un rôle important dans la mobilisation des cellules hématopoïétiques (Peled et al., 2000). Il a même été constaté une relation inverse entre la quantité de cellules CD34⁺ collectées par cytophérèse et l'intensité de leur expression de CXCR-4. En effet, le nombre de ces cellules décroît de façon exponentielle avec l'augmentation de l'intensité de l'expression de CXCR-4 (Voermans et al., 2001 ; Carion et al., 2003). L'équipe de Domenech a mis en évidence une augmentation des taux plasmatiques de MMP-9 chez les patients mobilisés alors que ce n'est pas le cas pour les taux de SDF-1 endogène (Carion et al., 2003). Dans cette étude, les concentrations de SDF-1 n'ont pas présenté de conversion entre la moelle et le sang périphérique.

A côté de son rôle mobilisateur, il existe des données montrant une implication directe de SDF-1 dans l'hématopoïèse. En effet, Lataillade et al ont démontré que cette chimiokine augmente la prolifération des cellules CD34⁺ du sang mobilisé en stimulant le cycle cellulaire (Lataillade et al., 2000). Elle améliore également l'expansion des cellules CD34⁺ en agissant en synergie, de manière dose dépendante, avec le cocktail de cytokines utilisé.

Une autre étude a également prouvé que la capacité des CSH Lin⁻ placentaires (proliférant sous l'action de FL, KL, IL-3, IL-6 et G-CSF en milieu sans sérum) à coloniser la souris NOD/SCID est augmentée par l'action de SDF-1 (Glimm et al., 2002). En revanche, le SDF-1 apparaît dans cette étude comme une molécule inhibant l'entrée en cycle des CSH humaines.

Dans ce sens, il a été montré que la délétion de CXCR-4 conduirait à l'épuisement des CSH primitives suite à une induction massive de la prolifération (Nie et al., 2008).

Enfin, selon certains auteurs, l'axe CXCL-12/CXCR-4 pourrait jouer un rôle dans la migration des CSM médullaires et placentaires (Son et al., 2006; Wang et al., 2008b).

L'IL-8 est une chimiokine qui peut être sécrétée par différents types cellulaires, neutrophiles, monocytes, cellules stromales et progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺. Elle est impliquée dans la chimioattraction des neutrophiles, l'angiogenèse et la mobilisation des CSH/PH (Majka et al., 2001). Elle serait impliquée de façon directe dans la survie et la prolifération des CE (Li et al., 2003a). Hussein et al. ont observé un niveau élevé d'IL-8 chez les nouveau-nés souffrant d'asphyxie cérébrale suggérant qu'elle peut avoir un effet protecteur (Hussein et al., 2010). D'autre part, elle est considérée par plusieurs auteurs comme agissant négativement sur l'hématopoïèse (de Vasconcellos et al., 2011). Une étude de la production cytokinique endogène chez des donneurs sains après l'injection de G-CSF a mis en évidence une augmentation de l'IL-8 sanguine. Cette concentration d'IL-8 était corrélée avec le nombre de cellules CD34⁺ circulantes et avec la quantité de cellules hématopoïétiques prélevées par cytophérèse. La sécrétion d'IL-8 endogène pourrait donc jouer un rôle dans la mobilisation des CSH et des progéniteurs induite par le G-CSF (Watanabe et al., 1999).

II.B.4.2- Les molécules d'adhésion

Elles représentent de grands médiateurs impliqués dans le contrôle de l'hématopoïèse par le stroma. Il peut s'agir de cytokines liées à la membrane soit directement (SCF, M-CSF), soit à

travers une liaison avec une molécule de la membrane stromale (le sulfate d'héparine liant l'IL-3 et le GM-CSF). Ces molécules peuvent également être membranaires proprement dites appartenant à la classe des intégrines ($\alpha\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$) (Coulombel et al., 1997), à la superfamille des immunoglobulines (ICAM-1, VCAM-1, HCA) ou du CD44 (Wagner et al., 2008), ligand de l'acide hyaluronique ou d'autres molécules des MEC (Simmons et al., 1997).

Les interactions à travers ces molécules permettent le maintien des CSH dans la moelle osseuse, mais également la transmission de signaux modulant la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire.

La molécule VLA-4 a prouvé *in vivo* son implication dans la myélopoïèse, l'érythropoïèse et son rôle majeur dans la lymphopoïèse B dans les modèles de souris invalidées pour cette molécule (Arroyo et al., 2000). *In vitro*, une étude utilisant des peptides bloquants pour inhiber l'interaction des progéniteurs avec le stroma a montré que l'adhésion par VLA-4 bloque l'entrée en phase S du cycle cellulaire, inhibant ainsi la prolifération et la différenciation des CSH maintenues par le stroma dans un état de quiescence (Jiang et al., 2000). Par contre, les souris privées de VLA-5 ne montrent pas de dysfonctionnement au cours de l'hématopoïèse, suggérant ainsi que le rôle de VLA-5 est plus restreint que celui de VLA-4 (Arroyo et al., 2000).

Bien que les phénomènes de migration de CSH vers la MO appelés domiciliation ou *homing* (au cours de la transplantation) et hors de la MO appelés mobilisation, soient régulés par des chimiokines (notamment le SDF-1) (Levesque et al., 2001), leurs acteurs directs restent des récepteurs d'adhérence exprimés par les CSH. Ces molécules sont notamment VLA-4/VCAM-1 exprimées sur les CSH et les CE respectivement pour la mobilisation et les deux familles de récepteurs d'adhésion : les $\beta 1$ intégrines (VLA-4 et VLA-5) et les sélectines (L-sélectine ou CD62L) (Cho and Spangrude, 2011).

Il a été montré que l'exposition aux cytokines peut améliorer l'expression et la fonction de ces différentes molécules précédemment citées, conduisant ainsi à une domiciliation plus rapide suivant la transplantation (Moore, 2002).

La molécule LFA-1 s'est montrée importante pour le maintien des CSH (Wilkins and Jones, 1995) car son blocage *in vitro* dans les cellules CD34⁺ humaines diminue significativement leur capacité de greffe (Peled et al., 2000).

Très récemment, deux molécules de la famille des intégrines ont été identifiées comme marqueurs désignant les CSH : $\alpha 2$ intégrine (CD49b) (Wagers and Weissman, 2006) et $\alpha 6$ intégrine (CD49f) (Notta et al., 2011).

In vitro, les systèmes de co-culture de cellules hématopoïétiques avec les différents types de cellule stromales ont confirmé l'importance du contact direct via les molécules d'adhésion pour la fonctionnalité des CSH. Dans ce sens, il a été montré que les progéniteurs adhérant au stroma prolifèrent moins que les non adhérents, indiquant que la prolifération des progéniteurs est induite soit par une absence d'interaction avec les intégrines soit par des cytokines (Cashman et al., 1998).

II.B.4.3- Signalisations impliquées dans la régulation de l'hématopoïèse

II.B.4.3.1- Les voies morphogènes

Parmi les voies de signalisation qui se sont révélées essentielles dans le contrôle de l'équilibre entre l'auto-renouvellement et la différenciation des CSH, figurent les voies morphogènes : Wnt, *Sonic hedgehog* (Shh) et Notch. Leur rôle dans l'auto-renouvellement des CSH pendant le développement embryonnaire est bien connu.

L'activation de **Notch** *ex vivo* par son ligand agit sur les CSH en favorisant le maintien de leur multipotence au détriment de la différenciation (Varnum-Finney et al., 2000). Suzuki et al, en ajoutant une faible quantité du ligand Delta like1, ont pu obtenir une amélioration de maintien des CSH à partir de cellules de SP stimulées fortement *ex vivo* avec les cytokines (Suzuki et al., 2006). De même, la surexpression de Jagged1 (ligand de Notch) par les ostéoblastes a entraîné une augmentation du nombre de CSH (Calvi et al., 2003). Toutefois, l'absence de Jagged1 dans des souris *knockout* n'a pas affecté leur hématopoïèse ce qui signifie probablement une redondance fonctionnelle au niveau de différentes formes de ligands et isoformes Notch (Mancini et al., 2005).

Lors du processus de différenciation, il a été observé une diminution de l'expression de Notch qui a joué un rôle inhibiteur de la différenciation (Duncan et al., 2005). Delaney C et al, en stimulant la voie Notch *in vitro* dans des greffons du SP, ont pu obtenir une expansion importante qui a donné un résultat clinique remarquable avec un raccourcissement de l'agranulocytose post-greffe même si la longévité de greffon (liée aux cellules primitives) n'a pas été démontrée

(Delaney et al., 2010). Il faut noter malgré tout qu'il s'agit d'une approche très complexe car deux unités ont été greffées dont une seule qui persiste à long terme celle qui est amplifiée *ex vivo*. L'auteur avait déjà mis en évidence un effet dose-dépendant du ligand Delta-like 1 sur la capacité de repoplement *in vivo* en observant en même temps que des concentrations élevées pourraient supprimer cet effet (Delaney et al., 2005). Un travail récent a montré qu'un niveau élevé de Notch1 serait un critère pour identifier des CSH primitives (Panepucci et al., 2010).

La voie **Hedgehog** (Shh) a été proposée comme impliquée dans la régulation de l'auto-renouvellement.

La stimulation de cette voie dans une population CD34⁺ Lin⁻ CD38⁻ humaine augmente son auto-renouvellement à travers la régulation des BMP (Bhardwaj et al., 2001). Une étude sur des embryons de poissons zèbres mutants pour la voie HH ou traités à la cyclopamine montre des défauts dans la formation de CSH adultes mais pas dans l'hématopoïèse primitive (Gering and Patient, 2005). Le blocage de la voie par l'ajout d'un anticorps anti-HH permet le maintien du nombre initial de SRC ensemencées en culture *ex vivo* tandis que l'ajout de SHH ou la culture au contact de cellules stromales exprimant IHH (*Indian Hedgehog*) amplifie *ex vivo* le nombre de SRC (Bhardwaj et al., 2001 ; Kobune et al., 2004).

Les voies Notch et Shh sont également impliquées dans l'auto-renouvellement d'autres types de cellules souches adultes (Spradling et al., 2001).

La voie morphogène **Wnt** est également un régulateur de l'auto-renouvellement et de l'oncogenèse dans différents organes, notamment dans le système hématopoïétique (Luis and Staal, 2009). L'activation de ce signal a même augmenté l'expression de Notch 1 et de HoxB4 impliqués dans l'auto-renouvellement de CSH (Reya et al., 2003). Il a été montré que les ligands Wnt stimulent la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques médullaires humains et l'auto-renouvellement des CSH (Van Den Berg et al., 1998; Willert et al., 2003), tandis que l'expression d'Axin (inhibiteur de la voie Wnt) conduit à une mort des CSH ainsi qu'une nette réduction de leur capacité de greffe (Van Den Berg et al., 1998). De même, Cheng X et al. ont trouvé que Wnt3 qui est stimulé seulement au cours du contact cellulaire représente l'intermédiaire indispensable pour l'expansion *ex vivo* de cellules CD34⁺ en co-culture avec les cellules stromales (Cheng et al., 2007).

En plus des voies morphogènes, la voie de signalisation JAK/STAT est importante pour la régulation de l'hématopoïèse. En effet, des études ont montré que STAT3 et STAT5 sont des régulateurs positifs de l'auto-renouvellement des CSH (Chung et al., 2006).

II.B.4.3.2- L'axe Tie2/Ang-1 et Cdh2/integrin β 1/c-MYC

Les CSH et les ostéoblastes expriment le récepteur tyrosine kinase Tie-2 et son ligand, l'angiopoïétine-1, respectivement. Cette voie de signalisation favorise la quiescence des CSH (Arai et al., 2004).

In vitro le signal Ang-1/Tie2 est nécessaire à la liaison des CSH aux ostéoblastes et permet le maintien de la primitivité ainsi que la survie des CSH par l'activation de l'intégrine β 1. De plus, l'ajout d'Ang-1 au milieu de culture augmente l'expression de la N-Cadhérine qui est exprimée sur les deux types cellulaires et participe *in vivo* à l'adhésion des CSH dans la niche ostéoblastique (Zhang et al., 2003; Hosokawa et al., 2010). *In vivo* l'axe Ang-1/Tie2-N-Cadh/ β -integrin permet l'ancrage des CSH à la niche endostéale ce qui limite ainsi les divisions des CSH en préservant leurs capacités de greffe à long terme. D'autre part, l'Ang-1 (*Angiopoïétine*) a permis le maintien en culture de SRC humaines CD34 négatives (Nakamura et al., 2007).

A l'inverse, la surexpression de c-Myc dans les CSH diminue l'expression des molécules d'adhésion N-Cadh et β -intégrine et induit une perte des capacités d'auto-renouvellement et un épuisement des CSH (Wilson et al., 2004).

II.B.4.3.3- Le signal TPO/Mpl dans les CSH

La TPO est exprimée par les cellules stromales médullaires notamment les ostéoblastes qui se trouvent à la surface de l'endoste et son récepteur Mpl est exprimé sur les CSH (Yoshihara et al., 2007). Dans la moelle osseuse, les LT-CSH qui expriment Mpl sont quiescentes et associées dans la niche aux ostéoblastes qui produisent la TPO (Arai et al., 2009). Le signal transmis dans les CSH par le couple TPO/Mpl augmente l'expression de l'intégrine β 1 et de l'inhibiteur de CDK p57KIP2. De plus, l'utilisation d'un anticorps anti-Mpl, l'AMM2, provoque une diminution du nombre de CSH. L'espace ainsi libéré dans la niche permet la greffe de MO sans pré-conditionnement des animaux (Arai et al., 2009). L'ensemble de ces résultats place le signal TPO/Mpl comme un élément crucial dans la régulation de la niche ostéoblastique.

II.B.4.3.4- Les protéines BMP

Les CSH humaines primitives expriment les récepteurs de BMP type I, SMAD-1, -4 et -5 (Bhatia et al., 1999) à travers lesquels ces cellules sont capables de répondre aux BMP notamment BMP-4. Des effets variables de BMP-4 sur la différenciation des cellules CD34⁺ dans les différentes lignées sanguines ont été rapportés. Dans une étude, BMP-4 augmenterait significativement le nombre de BFU-E mais pas de CFU-GM à partir des cellules CD34⁺ de SP cultivées sans sérum (Fuchs et al., 2002). Toutefois, d'autres équipes ont bien montré que BMP-4 est non seulement impliqué dans la spécification hématopoïétique des CSE (Chadwick et al., 2003) mais il l'est également dans la régulation cellulaire du stroma des CSH embryonnaires définitives (Durand et al., 2007) ainsi que CSH adultes *in vivo* (Goldman et al., 2009).

II.B.4.3.5- Les facteurs de transcription

Un grand nombre de facteurs de transcription impliqués dans l'hématopoïèse a été mis en évidence. Certains de ces facteurs sont détaillés ci-dessous.

Les **GATA** (*GATA-binding protein*) : il existe 3 membres de cette famille ayant un rôle dans l'hématopoïèse : GATA-1, GATA-2 et GATA-3 impliqués dans les différenciations érythroïdes et mégacaryocytaires, dans la fonction de CSH et dans la lymphopoïèse, respectivement (Ting et al., 1996).

Les **Hox** (*Homeobox*) sont impliqués dans le maintien du pool de CSH notamment les protéines Hoxa9, Hoxb3, Hoxb4 (Magnusson et al., 2007a; Sauvageau et al., 1994; Antonchuk et al., 2002) et Hoxa10 (Magnusson et al., 2007b). En effet, la surexpression de HoxB4 (transduction) *in vitro* a induit une expansion massive de CSH en augmentant leur auto-renouvellement (Antonchuk et al., 2002).

PU.1 (Spi-1), facteur de transcription qui participe à la différenciation des cellules souches en progéniteurs (DeKoter and Singh, 2000).

Le facteur **Runx1** (*Runx-related transcription factor 1*) joue un rôle dans la maturation des plaquettes, la différenciation lymphoïde durant le développement embryonnaire (Wang et

al., 1996). Il a été démontré qu'il serait un régulateur négatif de la quiescence des CSH (Ichikawa et al., 2008).

Ik (Ikaros) est un facteur exprimé dans les cellules hématopoïétiques primitives. Il est impliqué dans l'engagement des cellules lymphoïdes ce qui pourrait être lié à l'expression de certains récepteurs (Nichogiannopoulou et al., 1999).

C/EBP α (CCAAT/*Enhancer-Binding Protein α*) est un facteur de transcription qui régit la myélopoïèse. Sa délétion chez la souris conduit à un blocage de la granulopoïèse avec une perte des CFU-G (Zhang et al., 1998).

Bmi.1 appartient à la famille des Polycomb (inhibiteurs transcriptionnels impliqués dans la croissance cellulaire). Son absence entraîne une mort rapide de la souris suite à la cytopénie et les CSH $bmi-1^{-/-}$ perdent leur potentiel de greffe à long terme (Park et al., 2003).

III. Les Cellules Stromales Mésenchymateuses (CSM)

Ce sont des cellules souches tissulaires multipotentes ayant la morphologie de fibroblastes et générant les différents tissus conjonctifs du squelette (Pittenger et al., 1999). Elles pourraient aussi donner naissance, selon certains auteurs, aux CE, aux cellules musculaires sarcomériques (squelettiques, cardiaques (Orlic, 2003; Toma et al., 2002) et lisses vasculaires (Delorme et al., 2009)) voire à des cellules d'origine non mésodermique à savoir, les hépatocytes (endodermique) (Shu et al., 2004) et des cellules neurales (ectodermique) (Khoo et al., 2008). Des phénomènes de transdifférenciation et de fusion cellulaire sont proposés comme explications. Néanmoins, des incertitudes existent encore quant à la réalité d'une différenciation de CSM au-delà des tissus squelettiques et de son feuillet mésodermique d'origine.

Possédant des caractéristiques immunomodulatrices (l'absence de leur rejet) (Noël et al., 2007), actuellement, les CSM représentent un outil considérable dans la médecine régénératrice et l'immuno-oncologie (Ex : traitement de GVHD (*Graft Versus Host disease*) (Le Blanc et al., 2004)). Elles sont utilisées au même titre qu'un médicament, ainsi, un seul donneur pourrait traiter plusieurs receveurs ayant différentes pathologies.

Ces cellules ont été mises en évidence depuis les années 1960 avec les travaux d'A. Friedenstein (Friedenstein et al., 1976) qui a observé, chez le lapin, l'apparition de colonies de cellules adhérentes au plastique, allongées et d'apparence fibroblastique provenant de progéniteurs médullaires. Il a ensuite constaté que les cellules de ces colonies (appelées *Colony Forming Unit - Fibroblasts* (CFU-F)) sont capables de donner naissance à des tissus fibreux et de l'os. Le pouvoir d'auto-renouvellement et de différenciation (caractéristique des cellules souches) a été démontré par la suite dans différents travaux (Friedenstein et al., 1987). Il a fallu attendre les années 1990 pour que ces cellules prennent la dénomination de cellules souches mésenchymateuses et qu'elles puissent être caractérisées par Caplan (Caplan, 1991). Ainsi, il a été décrit que cette population non homogène est à l'origine notamment du stroma médullaire, de l'os, du cartilage, des tendons, des fibroblastes et des muscles. Pourtant, comme le nombre de cellules à caractère souche (produisant des CFU-F) est très faible au sein de la population sélectionnée *ex vivo* (environ 1 à 10 CFU-F pour 10^5 cellules (Sensébé et Bourin, 2005)) (sachant qu'elles représentent entre 0,001% et 0,01% des cellules mononucléées médullaires *in vivo* (Pittenger et al., 1999)), nous, comme d'autres, préférons appeler cet outil thérapeutique : **cellules**

stromales mésenchymateuses. Par la suite, cette capacité de différenciation vers ces différents tissus, issus du feuillet mésodermique, a été clairement établie avec notamment les travaux de Pittenger MF (Pittenger et al., 1999).

III.A- Sources et caractéristiques des CSM

Depuis l'identification des CSM pour la première fois, la source principale exploitable en clinique reste toujours la moelle osseuse (MO) bien que maintenant leur présence soit admise dans la plupart des tissus. Ces dernières années, les tissus adipeux (Wagner et al., 2005) sont apparus comme des sources intéressantes de CSM et constitueraient même une alternative potentielle à la moelle osseuse. En effet, ces tissus sont mieux accessibles techniquement et sont plus riches par rapport à la MO. D'autre part, les CSM de tissus adipeux (ASCs) (*Adipose Stromal Cells*) sont équivalentes aux CSM médullaires en termes de potentiel et de caractère immunomodulateur et de profil sécrétoire (Kilroy et al., 2007). Les CSM ont été également identifiées dans : l'os trabéculaire, le cordon ombilical, le placenta, la membrane et le liquide amniotiques, le foie fœtal, les tendons les muscles, le cartilage, des angioblastes médullaires et difficilement dans le sang périphérique et ombilical (Jones et al., 2010; Salingcarnboriboon et al., 2003; Robinson et al., 2011; Kogler et al., 2004).

Les CSM sont dotées d'une propriété d'adhérence au plastique qui est souvent utilisée pour les isoler (Dominici et al., 2006) (Tableau 1). Cependant, certaines autres cellules présentent cette capacité d'adhérence ce qui justifie la répétition des passages pour exclure « la contamination ». Ceci justifie également le recours systématique au phénotypage de CSM avant l'utilisation. En effet, les CSM expriment plusieurs marqueurs qui, pris séparément, ne sont pourtant pas spécifiques tels le CD73, le CD90, le CD105, STRO-1 (Simmons and Torok-Storb, 1991) et au moins une vingtaine d'autres antigènes de surface. D'autre part, elles n'expriment pas les marqueurs hématopoïétiques (CD45, CD34, CD133, CD14) ni endothéliaux (CD31, CD36) ni HLA-DR (Pittenger et al., 1999).

Selon l'ISCT (*International Society for Cellular Therapy*) le potentiel de différenciation multipotent *in vitro* dans des conditions standards vers les trois voies mésenchymateuses : ostéoblastes, chondroblastes et adipocytes, fait partie des caractéristiques des CSM.

Tableau 1: Résumé des critères d'identification des CSM. (D'après Dominici et al., 2006)

1- Adhérence au plastique dans des conditions de culture standards

2- Phénotype	Positive ($\geq 95\% +$)	Négative ($\leq 2\% +$)
	CD105	CD45
	CD73	CD34
	CD90	CD14 ou CD11b
		CD79 α ou CD19
		HLA -classe II

3- Différenciation *in vitro*: ostéoblastes, adipocytes, chondroblastes

Pourtant, les CSM restent une population cellulaire loin d'être homogène d'autant plus que le potentiel prolifératif et différenciateur (comportement *in vivo* après l'injection) est imprévisible. Il faut noter dans ce domaine, le débat concernant le choix de l'utilisation des CSM natives (fraichement isolées), ayant un potentiel prolifératif plus important mais qui sont en faibles quantités et difficiles à identifier, ou des CSM cultivées faciles à obtenir et en grandes quantités. Plusieurs études ont mis en évidence certains marqueurs corrélés avec une capacité proliférative importante (primitivité) des CSM. C'est le cas de : STRO-1, CD271 (Jones et al., 2010; Quirici et al., 2002), CD90, SSEA-4, ganglioside GD2, CD49a, CD146 et CD200 qui semblent parmi les marqueurs permettant d'identifier des CSM natives primitives (Delorme et al., 2008; Jones et al., 2002; Sacchetti et al., 2007). C'est le cas également des récepteurs associés à l'interaction avec la matrice extra-cellulaire et entre cellules (Intégrines, ICAM 1 et 2 (*InterCellular Adhesion Molecule-1*), L-selectines) (Tableau 2). Cependant, à l'heure actuelle, l'obstacle majeur devant cette méthode de sélection est la quantité des CSM obtenues qui reste médiocre.

Tableau 2 : Marqueurs des CSM humaines natives de la moelle osseuse. (D'après Pontikoglou, 2011).

Marqueur	Propriété - Fonction
Stro-1	Antigène inconnu
GD2	Ganglioside
SSEA4	<i>Stage-Specific Embryonic Antigen</i>
CD49a	Intégrine $\alpha 1$
CD73 (SH3/SH4)	Ecto-5-endonucléase
CD90	Thy-1
CD105 (SH2)	<i>Transforming Growth Factor-β Receptor III</i> (TGF- β RIII)
CD106	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i> (VCAM-1)
CD133	<i>Prominin</i> (AG133)
CD140b	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor-β</i> (PDGF-R β)
CD146	<i>Melanoma-Cell Adhesion Molecule</i> (Mel-CAM)
CD166	<i>Activated Lymphocyte Cell Adhesion Molecule</i> (ALCAM)
CD200	OX-2
CD271	<i>Neural Growth Factor Receptor</i> (NGFR)

III.B- Les propriétés des CSM

Ces cellules possèdent de nombreuses caractéristiques qui leur sont propres et qui ont ouvert des champs d'application diversifiés dans tous les domaines de médecine régénératrice.

- Adhérence au plastique (TCPS (*Tissue Culture Polystyrene Surface*))

Les CSM sont classiquement isolées en se servant de leur adhérence sélective sur les surfaces en plastique où elles prennent une forme allongée d'apparence fibroblastique (Pittenger et al., 1999). Toutefois, bien que cette capacité ait été exploitée pour définir les CSM, elle n'est pas restreinte à ces cellules. En effet, certaines cellules d'origine hématopoïétique sont également adhérentes, telles que les progéniteurs pré-cellules B, les précurseurs monocytiques/granulocytiques, les macrophages, les CE, les lymphocytes et les cellules musculaires lisses (Deans and Moseley, 2000). C'est également le cas des cellules médullaires différenciées telles que les ostéoblastes, les adipocytes ou les CE. Cependant, ces cellules ne prolifèrent pas pendant la

culture de CSM dans un milieu nutritif standard contenant de 10% de sérum de veau fœtal, évitant ainsi leur « contamination ».

Les avantages des CSM sont :

- la facilité d'isolement et d'expansion *in vitro* à travers plusieurs générations en conservant leur capacité à se différencier (Pereira et al., 1995), bien que cette expansion soit variable en fonction de l'âge du donneur, de sa condition physique et des techniques de prélèvement (Colter et al., 2000) ;
- les faibles inquiétudes éthiques et légales (stabilité *in vitro* sans transformation oncogène). Dans ce sens, Tarte K et al ont démontré que les CSM cultivées à long terme pourraient présenter une aneuploïdie sans toutefois que cela ne conduise à une transformation néoplasique. Ils suggèrent que cette aneuploïdie est un signe de sénescence (Tarte et al., 2010) ;
- possibilité de cryopréservation à long terme, pouvoir prolifératif élevé (sous l'influence de mitogènes tels que le PDGF, le FGF-2 et l'IGF-1 (Colter et al., 2000) ;
- multipotentialité (génération de tissus squelettiques) ;
- plasticité (génération de tissus d'autres feuillets embryonnaires) ;
- propriétés immunomodulatrices par différents mécanismes notamment la sécrétion de TGF- β 1 et HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) (Di Nicola et al., 2002) ;
- manipulation génétique facile (Deans and Moseley, 2000).

D'autre part, concernant la capacité d'auto-renouvellement, les CSM sont capables de se diviser pendant plusieurs générations sans changement de morphologie ni perte de leur pouvoir de différenciation, la spécialisation étant modulable et contrôlable avec certains facteurs (Carlo-Stella et al., 1993).

Tous ces avantages ont conduit à accroître le nombre d'essais cliniques portant sur les CSM. Cela est rendu possible notamment grâce à l'utilisation du lysat plaquettaire humain qui constitue une source très riche en facteurs de croissance lui permettant de se substituer au sérum animal contre-indiqué pour les applications chez l'Homme (Tarte et al., 2010).

L'effet paracrine médié par les facteurs solubles (Gnecchi et al., 2005; Eaves, 1988) et le contact membranaire cellulaire direct, constituent les deux principaux mécanismes d'influence des CSM. Il existe néanmoins d'autres mécanismes qui ont été décrits comme étant impliqués dans l'action

des CSM : la fusion cellulaire, le transfert de mitochondries, la libération de microparticules et de microvésicules riches en microRNA et la sécrétion de médiateurs solubles protéiques ou gazeux (Spees et al., 2006). Toutefois, ces derniers mécanismes restent un sujet controversé.

III.C- Le rôle des CSM dans l'hématopoïèse *in vivo* et *ex vivo*

Le rôle de cellules stromales médullaires comme soutien de l'hématopoïèse en culture est bien connu depuis les travaux de Friedenstein et Dexter. Les caractérisations phénotypiques des CSM ont en effet révélé qu'elles expriment des molécules de surface dont les ligands sont présents sur les cellules des lignées hématopoïétiques, incluant ICAM-1 (CD54), ICAM-2, VCAM-1 (CD106), CD72, LFA-3 et ALCAM, et soulignant ainsi l'étroite interaction entre ces deux types cellulaires (Majumdar et al., 2003).

Les CSM contribuent fortement *in vivo* et *ex vivo* à la création de l'environnement convenable pour le développement des cellules hématopoïétiques primitives à travers ses effets anti-apoptotiques et stimulateurs de la prolifération (Majumdar et al., 2003; Mourcin et al., 2005).

Il a été montré que les CSM expriment l'ARN messager pour la TPO impliquée dans la mégacaryopoïèse (Cheng et al., 2000a) et que les cellules CD34⁺ cultivées avec les CSM s'engagent dans la voie érythroïde jusqu'au stade terminal de cellules énucléées (Vlaski et al., 2009). Étant donné l'impact délétère de la chimiothérapie sur le micro-environnement médullaire, certaines équipes ont procédé à la co-injection des CSM avec des CSH autologues pour obtenir finalement un raccourcissement important de la durée d'aplasie post-greffe (Koç et al., 2000). Une étude française intéressante effectuée sur le babouin a décrit que les cellules CD34⁺ endommagées par l'irradiation peuvent greffer le babouin irradié létalement si elles ont été préalablement cocultivées et ensuite cogreffées avec des CSM (Drouet et al., 2005). Quelques années plus tard, Muguruma et al ont également constaté que l'administration de CSM contribue à la reconstitution du micro-environnement hématopoïétique indispensable pour développer l'hématopoïèse humaine au sein de la moelle murine (Muguruma et al., 2006). La même équipe s'est intéressée aux mécanismes par lesquels les CSM peuvent maintenir les CSH. En effet, elle a montré que les CSM se différencient pour donner des cellules CAR sécrétant fortement le SDF-1 et interagissent avec les CSH primitives dans la région endostéale (Yahata et al., 2008).

L'équipe de Wagner a comparé la capacité de soutien de l'hématopoïèse des CSM de différentes origines : (MO) moelle osseuse, (SP) sang placentaire et tissus adipeux (TA) (Wagner et al.,

2007b). Il a trouvé que les CSM de MO et de SP ont une capacité meilleure à préserver la primitivité des cellules hématopoïétiques que celle de CSM de TA.

Récemment, il a été décrit que les CSM agissent en synergie avec certaines cytokines, notamment la TPO et le SCF, pour stimuler la prolifération de CSH sans compromettre la capacité SRC de ces cellules (Walenda et al., 2011).

III.C.1- Mécanismes d'action de CSM dans l'hématopoïèse

Au départ, le stroma cellulaire en général a été considéré essentiellement pour son rôle trophique pour les cellules dépendantes du stroma qu'elles soient médullaires (Eaves, 1988; Majumdar et al., 2000) ou d'autres types cellulaires (ex : lignée MS-5 pour les cellules dendritiques), ceci étant le premier mécanisme proposé. Au fur et à mesure avec le développement des connaissances sur la complexité et la richesse de ce stroma et après l'identification des CSM, les modes d'action principaux sur l'hématopoïèse ont été révélés : effet paracrine médié par les facteurs solubles et contacts membranaires cellulaires directs.

III.C.1.1- Sécrétion de cytokines par les CSM

Dans les années 80, dans un modèle de co-culture, l'équipe de Eaves a décrit la production de TGF- β , MIP-1 α , G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IL-6 et l'IL-1 β par le stroma médullaire en indiquant que cette activité serait importante pour le rôle de soutien du stroma aux progéniteurs hématopoïétiques (Eaves, 1988). Toutefois, la population stromale ainsi que la population hématopoïétique étaient très hétérogènes dans ces travaux, il était donc difficile d'attribuer cet effet aux CSM.

Après l'identification des CSM dans les années 90, leur profil sécrétoire assez riche a été décrit. En effet, les CSM synthétisent une vaste palette de cytokines (IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14 et IL-15) et de facteurs de croissance (M-CSF, FL, SCF) impliqués dans l'auto-renouvellement, la différenciation et la maturation des différentes populations de cellules hématopoïétiques (Kim et al., 2005). Elles peuvent également produire le facteur LIF (Majumdar et al., 1998; 2000), le HGF (Di Nicola et al., 2002), le TGF- β , la PG-E2 (prostaglandine), l'IDO (indole dioxygénase), le HLA-G, le VEGF, le GM-CSF, le FGF et le PDGF (Noël et al., 2007). Une autre étude a également montré la production de TPO ainsi que du ligand de Notch, Jagged-1 (Yamaguchi et al., 2002b).

En réponse à un traitement avec la cytokine inflammatoire IL-1 α , les CSM augmentent le taux d'expression des cytokines IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-11, G-CSF, GM-CSF et LIF. A l'inverse, l'expression de l'IL-7, IL-12, IL-14, IL-15, M-CSF, FL et SCF ne semble pas être modifiée (Majumdar et al., 1998). Les CSM dérivées du sang de cordon ombilical ont le même profil cytokinique que les CSM de moelle osseuse (Jang et al., 2006). Toutefois, une équipe coréenne a trouvé que seules les CSM d'origine médullaire produisent le SDF-1 en comparaison avec celles originaires du placenta ou du cordon ombilical (Hwang et al., 2009). Ce large panel de facteurs multifonctionnels (anti-apoptotiques, facteurs de croissance immunomodulateurs, chimiokines, etc.) explique l'importance de l'effet paracrine des CSM. En effet, certaines études montrent que cet effet est aussi important que le contact cellulaire durant la co-culture de CSM et de cellules CD34⁺ (mobilisées) (Li et al., 2007). Les ASCs ont également montré une sécrétion importante de VEGF, TGF- β , HGF et de faibles quantités de GM-CSF et FGF-2 (Rehman et al., 2004).

Des cytokines sécrétées par les CSM et ayant un effet hématopoïétique :

III.C.1.1.1- VEGF-A (*Vascular Endothelial Growth Factor A*)

Facteur angiogénique sécrété par les CSM (Potier et al., 2007) et sous la régulation de la voie STAT3 (Wang et al., 2007). Il a été montré par plusieurs travaux que le facteur HIF-1 α (induit par les BC-O₂ ou par transduction) régule positivement la production du VEGF-A par les cellules stromales (Okuyama et al., 2006; Rehn et al., 2011; Lee et al., 2009). La TPO, en stimulant le HIF-1 α , favoriserait la synthèse de VEGF-A à travers lequel il exerce partiellement son effet sur l'hématopoïèse (Kirito et al., 2005). Lévesque et al ont prouvé un rôle de VEGF-A dans la mobilisation de CSH/PH en constatant un niveau médullaire élevé de VEGF-A ainsi que de HIF-1 α (Lévesque et al., 2007).

III.C.1.1.2- FGF-2 (ou bFGF *basic Fibroblast Growth Factor*)

Facteur angiogénique sécrété par les CSM et augmenté par les BC-O₂ (Lee et al., 2009). Le FGF-2 paraît être la cytokine majeure des CSM car dans toutes les conditions de culture il augmente considérablement la prolifération des CSM tout en maintenant voire augmentant leur multipotentialité (Bianchi et al., 2003). Le FGF-2 apparaît donc comme cytokine essentielle dans

la production de CSM à grande échelle, permettant l'obtention plus rapide de nombres élevés de CSM sans léser leur potentiel souche ni leurs propriétés biologiques (Auletta et al., 2011).

Actuellement, ce facteur est systématiquement utilisé pour la culture de CSM à des doses faibles dont la plus fréquente est 1 ng/mL (Bourin et al., 2005).

D'autre part, le FGF-2 posséderait des activités sur l'hématopoïèse. *In vivo*, il participe à rétablir la niche hématopoïétique lésée après l'irradiation à travers l'expansion des ostéoblastes- N-cadhérine⁺, ce qui contribue à la réorganisation indirecte de l'hématopoïèse (Dominici et al., 2009). *In vitro*, il faisait partie des cocktails cytokiniques dans certains protocoles d'expansion de CSH. En effet, dans une culture de cellules médullaires à long terme, le FGF-2 à faible dose (0,2-2 ng/mL) augmenterait le nombre de progéniteurs myéloïdes (Wilson et al., 1991). Le FGF-2 possède également des propriétés stimulatrices de certaines étapes de l'hématopoïèse notamment sur les mégacaryocytes (indirectement à travers l'induction de la sécrétion de certains facteurs surtout l'IL-6) (Bruno et al., 1993).

III.C.1.1.3- HGF (*Hepatocyte Growth Factor*)

Il a déjà été montré que les CSM sécrètent HGF (Weimar et al., 1998) et que celui-ci serait impliqué dans la fonction immunomodulatrice des CSM (Di Nicola et al., 2002; Noël et al., 2007). Le HGF a des propriétés anti-apoptotiques et pourrait stimuler l'hématopoïèse (Kuroiwa et al., 2001). En effet, l'injection intraveineuse de HGF chez la souris, en plus de son effet contre la GVHD aiguë, conduit à l'expansion des CSH développées dans les sites extramédullaires (hépatiques) (Kuroiwa et al., 2001). L'expansion de l'hématopoïèse peut être liée à la suppression de l'IFN- γ et le TNF- α (inhibiteurs de l'hématopoïèse) médiée par le HGF. Ceci suggère que la sécrétion de HGF peut être impliquée dans le mécanisme d'action des CSM sur l'expansion des CSH. La sécrétion de HGF par les CSM pourrait être un facteur important régulant l'adhésion, la survie et la prolifération des CSH/PH dans le micro-environnement médullaire (Weimar et al., 1998). Enfin, il a été montré que le HGF induit la différenciation des progéniteurs mégacaryocytes et qu'il coopérerait avec le SCF pour influencer la prolifération des CSH/PH (Sugiura et al., 2007).

III.C.1.1.4- IL-10

Le rôle de l'IL-10 est largement étudié et présenté comme immunosuppresseur à côté du TGF- β . Ainsi, cette cytokine est connue comme médiateur de l'action des lymphocytes T régulatrices qui peuvent être, à leur tour, parmi les médiateurs de l'effet immuno-modulateur de CSM. Il est donc bien établi que les CSM orientent les lymphocytes vers la production d'IL-10, en revanche, elles ne synthétisent d'IL-10 qu'après la stimulation par certains facteurs. En effet, il a été prouvé que la toxine anthrax influence négativement l'hématopoïèse *in vitro* en parti via la stimulation de sécrétion de l'IL-10 et de CCL3 à partir des cellules stromales (Liu et al., 2009b; Rameshwar et al., 2012).

III.C.1.1.5- IL-6

Produite principalement par des cellules immunitaires activées, il est bien établi actuellement que les CSM participent à la production d'IL-6 (Van Snick, 1990; Kim et al., 2005). L'IL-6 s'est montrée primordiale comme intermédiaire de la fonction de support hématopoïétique joué par les cellules stromales médullaires (Rodríguez et al., 2004). Ceci a été ensuite confirmé avec le travail de Li N et al qui ont co-cultivé les cellules CD34⁺ avec des CSM *ex vivo* et ont finalement montré que l'IL-6 était le médiateur principal dans l'effet des CSM (Li et al., 2007). Ils ont également constaté que cet effet est aussi important que le contact cellulaire.

En réalité, le signal de la glycoprotéine 130 activée par le complexe de l'IL-6 et son récepteur soluble sIL-6R agit plus efficacement en combinaison avec le signal c-Kit ou Flk2/Flt3 et en synergie avec l'IL-3, le SCF et la TPO pour optimiser l'expansion des CSH humaines (Nakahata, 2001; Bordeaux-Rego et al., 2009).

Dans des expériences réalisées au début des années 90 sur un modèle de culture de moelle murine à long terme (culture de Dexter), la neutralisation de l'IL-6 a entraîné une diminution de la production des cellules myéloïdes matures et des cellules progénitrices capables de former des colonies dans les cultures à long terme (Hauser et al., 1997).

III.C.1.1.6- SDF-1

Les CSM sont capables de sécréter le SDF-1 (Guiducci et al., 2011; Hwang et al., 2009). La contribution de SDF-1 à l'interaction entre les CSM et les cellules hématopoïétiques primitives a été établie *in vitro*. En réalité, au cours d'une co-culture avec des CSM, l'axe SDF-1/CXCR-4 a

amélioré l'expansion des cellules CD34⁺ de sang placentaire via la stimulation de la sécrétion de l'IL-6, l'IL-11, le GM-CSF et la protéine-1 chimioattractant des monocytes (MCP-1) (Van Overstraeten-Schlögel et al., 2006). Dans un autre travail, des cellules stromales humaines ont pu générer du SDF-1 α suite à l'induction par la toxine anthrax (Rameshwar et al., 2012). Dans ce travail, le SDF n'avait pas été détecté sans stimulation. (*Le rôle de SDF-1 est détaillé dans le paragraphe II.B.4.1- P. 55*).

III.C.1.1.7- IL-8

Plusieurs études ont montré que les CSM produisent de l'IL-8 qui pourrait être l'un des médiateurs de leur rôle de soutien de l'hématopoïèse (Kim et al., 2005). Par ailleurs, les CSM du cordon ombilical ont présenté une capacité à sécréter des quantités abondantes d'IL-8 (Liu and Hwang, 2005). (*Le rôle d'IL-8 est détaillé dans le paragraphe II.B.4.1- P. 57*).

III.C.1.1.8- TGF- β

Comme nous l'avons évoqué précédemment, il s'agit d'un facteur inhibiteur de l'entrée en cycle cellulaire des CSH (Glimm et al., 2002). Il a été montré que l'induction de l'expansion des cellules CD34⁺ par SDF-1 requiert l'utilisation d'un inhibiteur de TGF- β afin de permettre aux cellules primitives de sortir de quiescence (Lataillade et al., 2000). Le TGF- β exerce un effet inhibiteur sur les progéniteurs érythroïdes de type BFU-E mais n'a pas d'action à un stade de différenciation plus avancé sur les éléments de cette lignée. Il inhibe également la mégacaryopoïèse. (*Le rôle de l'IL-6 sera détaillé dans le paragraphe II.B.3.2.1- P. 55*).

III.C.1.2- Interaction directe CSM/CSH (contact cellulaire)

Les cellules stromales et notamment les CSM synthétisent et assemblent de nombreuses molécules de MEC : fibronectines, laminines, collagènes, tenascines, glycosaminoglycanes. Les molécules de MEC forment ainsi une architecture permettant l'ancrage des CSH et servent de réservoir à un grand nombre de cytokines hématopoïétiques. Il existe ainsi de nombreuses interactions entre molécules d'adhésion et cytokines, reflétant un contrôle complexe de l'hématopoïèse par le stroma et notamment les CSM. Ces interactions permettraient le maintien des CSH dans la moelle osseuse, mais également la transmission de signaux modulant la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire.

Les expériences réalisées sur l'expansion *ex vivo* des greffons hématopoïétiques ont souvent montré que la stimulation avec les facteurs de croissance hématopoïétiques aboutit à la perte des cellules primitives. En revanche, la co-culture avec des CSM permet souvent d'abolir cette perte et de préserver la capacité de greffe (Breems et al., 1998; da Silva et al., 2010). En utilisant les cellules CD133⁺ du sang périphérique mobilisé dans la co-culture, il a été montré que les cellules adhérentes aux CSM possèdent un caractère plus primitif, ainsi qu'un potentiel clonogénique et une capacité de repeuplement plus importants. Ces cellules hématopoïétiques adhérentes possèdent également une capacité migratoire plus importante en comparaison avec les non-adhérentes, ce qui souligne l'importance du contact cellulaire direct (Alakel et al., 2009; Freund et al., 2006). Cette équipe (Jing et al., 2010) a ensuite montré que le stroma représente une véritable niche pour réguler l'hématopoïèse *ex vivo*. En effet, les cellules adhérentes aux CSM ont un profil plus primitif par rapport aux cellules en suspension, ce qui suggère un mécanisme de production des cellules sanguines comparable à celui *in vivo*.

L'équipe de Wagner a montré l'implication de la fibronectine-1, Cadérine-11, VCAM-1, Connexine-43, intégrine β -1 et le TGF- β dans l'adhésion CSM/CSH *in vitro* (Wagner et al., 2007a). Elle a ensuite trouvé un rôle primordial de la molécule d'adhésion CD44 dans cette interaction (Wagner et al., 2008; Walenda et al., 2010).

L'équipe de Paul Frenette a prouvé le rôle essentiel des CSM dans le maintien de CSH *in vivo* et *in vitro*. En effet, elle a trouvé que l'ablation des souris transgéniques en CSM nestine⁺ réduit de 50% la quantité de CSH/PH. L'ablation de CSM chez le receveur diminue de 90% le *homing* des CSH dans la niche (Méndez-Ferrer et al., 2010). Elle a prouvé finalement que 60% des CSM sont colocalisées avec les CSH dans la niche (Méndez-Ferrer et al., 2010).

La molécule N-cadhérine exprimée par les CSH serait impliquée dans le contact CSH/CSM qui assure la primitivité des CSH. *In vitro*, le blocage de cette molécule conduit à la perte de l'activité LTC-IC lors de la co-culture CSH/CSM (Wein et al., 2010). *In vivo*, Hosokawa et al. ont également démontré le rôle primordial de la N-cadhérine pour rétablir l'hématopoïèse dans la niche médullaire après la transplantation (Hosokawa et al., 2010).

Enfin, une autre étude a révélé que les molécules CD133, CXCR-4 ainsi que ICAM-1 sont concentrées dans la région membranaire responsable du contact (les prolongations membranaires) (Freund et al., 2006), suggérant ainsi un rôle de ces différentes molécules dans ce contact.

III.C.1.2.1- Rôle de l'adhésion médiée par VCAM-1/VLA-4

La VCAM-1 est exprimée de façon constitutive par les cellules stromales médullaires et pourrait médier l'interaction entre celles-ci et les CSH (Simmons et al., 1992; Wagner et al., 2007a). Dans le modèle de culture de Dexter, il a été montré que la neutralisation de VCAM-1 ou de VLA-4 inhibe le développement tant des progéniteurs myéloïdes que lymphoïdes (Miyake and Weissman, 1991). Dans la co-culture *ex vivo* de CSM et CSH, VCAM-1 peut médier le contact direct (Wagner et al., 2007a). En réalité, la rétention des CSH *in vivo* dans le micro-environnement médullaire fait intervenir le couple VCAM-1/VLA-4 et la neutralisation de VCAM-1 chez la souris receveuse diminue l'implantation médullaire des CSH lors d'expériences de transplantation (Papayannopoulou et al., 1995). De façon très importante, cette même équipe a constaté que, chez l'Homme, le traitement avec l'anti-VLA-4, Natalizumab, entraîne une élévation des taux de CSH/PH dans le sang périphérique (Bonig et al., 2008). Ces phénomènes ont ensuite été observés dans d'autres modèles de xénogreffes à partir de CSH humaines (Peled et al., 2000).

III.C.1.2.2- Rôle des voies morphogènes (détails dans le paragraphe II.B.4.3.1- P. 59)

Les molécules impliquées dans la voie de signalisation **Notch** sont exprimées par les progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ (Milner et al., 1994) et par les CSM, notamment Jagged1 et Notch1 (Fernández-Sánchez et al., 2011).

Quant à la voie **Hedgehog**, les cellules hématopoïétiques et les CSM expriment les gènes IHH, SHH, PTCH, SMO et GLI ce qui suggère que ces cellules sont capables de transduire le signal HH (Bhardwaj et al, 2001; Kobune et al., 2004). L'effet de support des CSM sur le potentiel de greffe de cellules CD34⁺ placentaires a été amplifié en surexprimant l'IHH, ce qui montre l'intérêt de cette voie (Kobune et al., 2004).

Concernant, la voie Wnt, les CSM expriment plusieurs molécules de cette famille notamment Wnt et β -caténine (Etheridge et al., 2004). Dans l'activité de support des CSM sur l'hématopoïèse, le Wnt3 semble jouer un rôle très important (Chiba et al., 2004; Luis et al., 2009).

IV. Influence des Basses Concentrations d'O₂ (BC-O₂) sur les Cellules Souches

IV.A- Introduction

L'oxygène est indispensable pour la survie des organismes utilisant la respiration aérobie. Cette respiration qui est apparue il y a environ 500 millions d'années a permis l'accumulation de l'énergie sous forme de «phosphates à haute énergie » conduisant ainsi à l'évolution de la vie avec le développement des organismes ayant des structures et fonctions complexes, comme les vertébrés. Chez les eucaryotes, l'oxygène est métabolisé au niveau de la membrane intérieure des mitochondries où il participe à l'oxydation du glucose pour assurer la synthèse d'ATP. Bien qu'indispensable, le métabolisme d'oxygène doit être régulé de façon cruciale. En effet, le fonctionnement de la chaîne respiratoire peut conduire à la production excessive de radicaux libres oxygénés (stress oxydatif) capables d'oxyder les protéines, l'ADN et les membranes des cellules, mettant ainsi en jeu la survie cellulaire. Les organismes eucaryotes ont donc mis en place des systèmes adaptatifs leur permettant de maintenir l'homéostasie de leur niveau d'oxygène. Une augmentation ainsi qu'une diminution du taux d'oxygène dans l'environnement cellulaire appelées respectivement, hyperoxie et hypoxie, pourraient causer la perturbation de cette homéostasie.

IV.B- Hypoxie/Normoxie *in situ*

A la base, la relation entre « l'hypoxie » et l'hématopoïèse a été connue et marqué par l'observation du phénomène de polyglobulie secondaire. Il s'agit d'une hyper-activation de l'érythropoïèse secondaire en réponse à une stimulation excessive de l'EPO qui résulte le plus souvent d'une hypoxie tissulaire provoquée par certaines pathologies ou dans des circonstances naturelles comme la vie à haute altitude (l'hypoxie hypobare). Afin d'explorer ce phénomène, des modèles murins exposés à un environnement hypoxique simulant la situation en haute altitude ont démontré l'influence de l'hypoxie sur l'érythropoïèse (Murphy and Lord, 1973).

Toutefois, le terme d'hypoxie (par rapport aux concentrations atmosphériques (20-21% O₂ (160 mm Hg)) considérées comme « la normoxie ») a été ensuite utilisé de façon inappropriée pour désigner les BC-O₂ utilisées en culture cellulaire. En effet, considéré comme « normoxie » et suffisant pour la croissance cellulaire (Shooter and Gey, 1952), l'oxygène de l'air ambiant a été le milieu référent dès le début de l'aire de la culture cellulaire et ceci, sans tenir compte de la

particularité métabolique de type cellule cultivé. Pourtant dès 1958, Cooper ainsi que Zwartouw et Westwood ont décrit que certaines cellules prolifèrent plus rapidement à des tensions d'oxygène inférieures à celles retrouvées dans l'atmosphère (Cooper et al., 1958 ; Zwartouw and Westwood, 1958).

En tout état de cause, cette binaire hypoxie versus normoxie a été le sujet d'un vaste débat depuis deux décennies. L'hypoxie est définie comme une situation anormale par rapport à la normoxie. Cependant, ce qui est souvent appelé « hypoxie » correspond en réalité à une concentration physiologique en O_2 pour un tissu ou une cellule et correspond donc à une situation normale, rendant le terme « hypoxie » inapproprié. Toutefois, les concentrations d' O_2 étant différentes d'un tissu à un autre, il a été proposé le terme de normoxie *in situ* désignant le taux physiologique d' O_2 pour chaque type cellulaire (Guitart et al., 2010; Ivanovic, 2009b).

Pour éviter toute confusion, cette notion ne prend pas en compte les situations pathologiques (aiguës ou chroniques) comme c'est le cas au cours des syndromes ischémiques (pathologies vasculaires, infarctus, etc.) qui peuvent être définis comme « dysoxie ».

IV.C- Les concentrations d' O_2 dans l'organisme humain

A la fin des années 1960, des mesures directes dans les embryons ont révélé de très basses tensions d'oxygène tissulaire (Mitchell and Yochim, 1968).

Certains auteurs estiment que la tension moyenne en oxygène dans les tissus sains se situe à environ 7% (Jiang et al., 1996b). Simon et Keith ont récemment décrit les concentrations en oxygène comprises entre 2% et 9% comme étant la normoxie physiologiques (Simon and Keith, 2008). Cependant, il demeure particulièrement difficile dans ce domaine, de donner des précisions et généraliser pour tous les tissus de l'organisme.

En réalité, dans l'organisme humain, les concentrations d' O_2 varient considérablement selon les tissus, voire au sein du même tissu. Ainsi, les concentrations d' O_2 de l'air ambiant inspiré (20-21% O_2) et celles des tissus sont très différentes. La concentration d' O_2 de l'air qui pénètre dans les poumons diminue progressivement au fur et à mesure de l'avancement dans les différents tissus de l'organisme pour arriver à presque zéro dans certaines régions. Ces concentrations d' O_2 locales dépendent du statut métabolique de chaque type cellulaire auquel ces cellules doivent physiologiquement être adaptées dans le corps. Ainsi, dans le parenchyme pulmonaire et en circulation (McKinley and Butler, 1999; Johnson et al., 2005; Wild et al., 2005), ainsi que dans

les organes parenchymateux bien irrigués comme le foie, les reins, le cœur (Jungermann and Kietzmann, 1997; Roy et al., 2003; Mik et al., 2004), les concentrations d'O₂ sont comprises entre 14% et 4%. En d'autres tissus, relativement moins irrigués, ces concentrations sont encore plus faibles: dans le cerveau, elles varient de 0,5% à 7% (Erecinska and Silver, 2001; Hemphill et al., 2005), dans l'oeil (rétine, corps vitré) elles sont de 1 à 5% (Yu and Cringle, 2005). Dans la moelle osseuse, siège de l'hématopoïèse, le niveau d'O₂ se situe entre 0,1% près de l'endoste et augmente à 4-5% près des sinus vasculaires (Tondevold et al, 1979; Chow et al., 2001) (Figure 8)

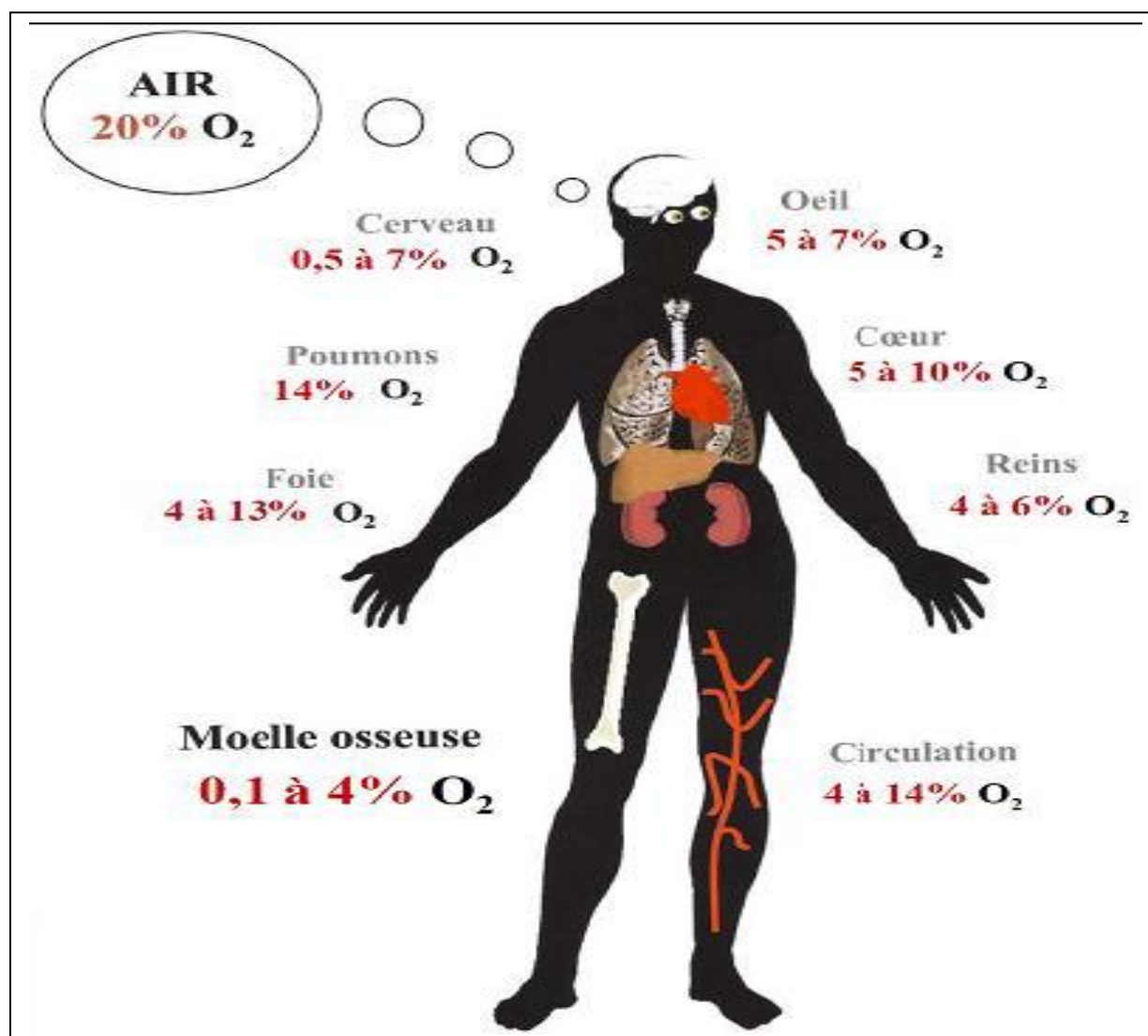


Figure 8 : Concentration en oxygène dans les principaux organes du corps humain.
(D'après Hermitte, 2005 et Rouault, 2010)

IV.D- Rôle de l'oxygène dans les cellules souches

Afin de détailler ce rôle des faibles oxygénations sur les cellules souches quelle que soit leur origine, nous allons dans un premier temps nous arrêter sur le facteur principal à travers lequel s'exprime majoritairement cet effet, le *Hypoxia Inducible Factor* (HIF).

IV.D.1- Les Facteurs de transcription HIF

HIF permet la régulation de la réponse et l'adaptation aux BC-O₂. C'est un complexe protéique qui accroît l'expression de gènes spécifiques en présence de faibles concentrations d'oxygène (Wang and Semenza, 1993). Le HIF a été identifié lors d'études de la régulation du gène codant l'érythropoïétine (EPO). Il a également un rôle décisif dans la sécrétion de VEGF qui est impliqué dans l'angiogenèse et la croissance tumorale. Il faut noter que 89% des gènes dont l'expression est augmentée lors de la culture à BC-O₂ sont dépendants du facteur de transcription HIF-1 (Greijer et al., 2005) ; outre l'angiogenèse, ces gènes sont impliqués dans divers processus cellulaires tels que le métabolisme du glucose, la survie, la prolifération cellulaire et l'apoptose.

Le HIF a été isolé pour la première fois en 1993 et ses composantes protéiques ont été identifiées en 1995 (Wang et al., 1995). Il est activé de manière exponentielle à mesure que diminue la pression en oxygène dans des cultures cellulaires (Jiang et al., 1996b). Il active la transcription en se liant aux éléments de réponse de l'ADN présentant la séquence nucléotidique consensus 5'-BRCGTGV-3'. A l'heure actuelle, trois facteurs de la famille HIF ont été découverts : HIF-1, HIF-2 et HIF-3. Chacun de ces facteurs est formé de deux protéines (appartenant à la famille bHLH-PAS (*basic Helix-Loop-Helix ; Per-ARNT-Sim*)) : une sous-unité alpha sensible aux variations d'oxygène (sauf HIF-3 α) et une sous-unité beta insensible aux variations d'oxygène également appelée ARNT (*Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*) et retrouvée constitutivement dans le noyau des cellules.

Le **HIF-1** est le complexe le plus actif de ce système car il est exprimé dans tous les tissus et est le plus étudié. Il appartient à la famille des protéines bHLH-PAS, senseurs environnementaux qui lient des séquences HRE (*Hypoxia Response Element* 5' - TACGTGC- 3') situées dans les promoteurs ou dans les séquences *enhancer* des gènes cibles. HIF-1 est un hétérodimère composé de deux sous-unités HIF-1 α et HIF-1 β (ou ARNT). En réalité, il a été montré que HIF1- α se stabilise avec la décroissance de concentration d'O₂ à partir de 5% (Jiang et al., 1996b),

suggérant ainsi que l'effet significatif des faibles teneurs en O₂ se manifeste en descendant en-dessous du seuil de 5% d'O₂.

IV.D.1.1- Les sous unités α

IV.D.1.1.1- HIF-1 α

La protéine HIF-1 α a été décrite comme ayant une très courte demi-vie. Elle est dégradée en moins de 5 minutes suite à la réoxygénation ce qui rend difficile l'expérimentation dans ce domaine. En 1997, une étude a démontré que l'accumulation de cette protéine n'était pas due à une induction de sa traduction mais plutôt à une inhibition de sa dégradation par le protéasome en condition de faible oxygénation (Salceda and Caro, 1997).

Chez l'Homme comme chez la souris, la transcription du gène *hif-1 α* est forte et ubiquitaire dans tous les organes (Wenger et al., 1996).

La protéine HIF-1 α est accumulée en conditions de BC-O₂ et n'est pratiquement pas détectable en condition d'oxygénation atmosphérique (20% O₂). En effet, à 20% d'O₂, l'hydroxylation des prolines 402 et 564 contenues dans le domaine de dégradation dépendant de l'oxygène de HIF-1 α (*oxygen dependent degradation* (ODD)) est médiée par les protéines PHD (*Prolyl Hydroxylase Domain proteins* (PHD1-3)). Ces hydroxylations conduisent au recrutement de la protéine pVHL (*Von Hippel-Lindau protein*). Cette dernière appartient au complexe E3 ubiquitine ligase qui va initier l'ubiquitinylation de la protéine HIF-1 α et, de ce fait, l'adresser au protéasome 26S en vue de sa dégradation. En hypoxie, le manque d'oxygène rend l'hydroxylation de la protéine HIF-1 α impossible, ce qui permet son accumulation rapide dans la cellule.

La protéine HIF-1 α contient dans sa partie amino-terminale un domaine bHLH et deux domaines PAS, appelés PAS-A (latéral) et PAS-B (médial). Le domaine bHLH intervient dans la fixation de la sous-unité HIF-1 α à l'ADN, ainsi que pour sa dimérisation avec HIF-1 β , avec le concours des domaines PAS, pour former le facteur de transcription HIF-1 (Jiang et al., 1996a).

La protéine HIF-1 α contient d'autres domaines importants à sa fonction de régulateur de la transcription au cours de la réponse à la faible oxygénation ; ce sont deux domaines de transactivation situés dans la partie carboxy-terminale et appelés N-TAD (*N-Terminal Transactivation Domain*) et C-TAD (*C-Terminal Transactivation Domain*) (pour le médial et le latéral respectivement). Ces deux domaines fonctionnent de manière synergique, puisqu'un variant d'épissage privé du domaine C-TAD a été décrit comme étant capable de dimériser avec

HIF-1 β , de lier les séquences HRE et de transactiver les gènes cibles mais avec des efficacités inférieures à celles mesurées avec l'isoforme pleine taille (Gothie et al., 2000).

Il existe entre ces deux domaines, un domaine inhibiteur de la transcription dont la délétion progressive dans des protéines de fusion s'accompagne d'une augmentation proportionnelle de l'activité transcriptionnelle testée en normoxie (Pugh et al., 1997; Jiang et al., 1996a).

Le facteur HIF-1 α contient deux séquences de localisation nucléaires NLS (*Nuclear Localization Signal*). La première est située dans le domaine bHLH et réprimée par le domaine PAS-B, ce qui conduit à une rétention cytoplasmique de la protéine HIF-1 α . La seconde séquence assure la nucléarisation de HIF-1 α sous faible taux d'O₂ (Kallio et al., 1998).

IV.D.1.1.2- HIF-2 α et HIF-3 α

Les deux autres facteurs de transcription appartenant à la famille HIF sont HIF-2 α et HIF-3 α . Comme pour HIF-1 α , le gène *hif-2 α /epas1* est transcrit de manière constitutive alors que la protéine HIF-2 α est accumulée en condition de faible oxygénation. Cependant, contrairement à HIF-1 α , HIF-2 α n'est pas exprimée de façon ubiquitaire.

De façon similaire à HIF-1 α , HIF-2 α contient un domaine bHLH suivi de deux domaines PAS et un domaine ODD ainsi que deux domaines de transactivation N-TAD et C-TAD avec une homologie très importante.

Il existe de plus plusieurs gènes communs régulés par HIF-1 et HIF-2 et très récemment, un rôle capital a été attribué à HIF-2 α dans le maintien de la fonction souche (SRC) des CSH autant voire plus que HIF-1 α .

Quant à HIF-3 α , sa transcription est également régulée par l'oxygène, toutefois sa fonction reste à élucider (Makino et al., 2007).

IV.D.1.2- Les sous unités β

IV.D.1.2.1- HIF-1 β

Comme cité précédemment, l'expression de la sous-unité HIF-1 β est constitutive tant au niveau de son messager qu'au niveau de la protéine (Reyes et al., 1992).

Comme HIF-1 α , la protéine HIF-1 β contient un domaine bHLH dans sa partie amino-terminale et deux domaines PAS, A et B. Elle contient également un domaine TAD dans sa partie carboxy-terminale sans pour autant intervenir dans la transactivation en réponse à la BC-O₂.

IV.D.1.2.3- Il existe également **HIF-2 β** et **HIF-3 β** (ARNT 2, 3) qui sont exprimées d'une manière restreinte indépendamment de l'oxygène (Takahata et al., 1998).

IV.D.1.3- Les cibles de HIF

Le facteur de transcription HIF-1 permet aux cellules de s'adapter aux BC-O₂ par la mise en place d'une réponse adaptée permettant le maintien d'un environnement propice à la survie cellulaire. Actuellement, il existe une centaine de gènes cibles, contenant des sites fonctionnels HRE, dont l'expression est régulée par HIF-1. Ces gènes codent pour de nombreuses protéines impliquées dans certaines voies métaboliques comme par exemple :

- La glycolyse qui permet aux cellules de basculer vers le métabolisme anaérobie afin d'assurer les besoins énergétiques lorsque les apports en oxygène sont réduits.
- L'angiogenèse, notamment via la stimulation du VEGF.
- La survie, la prolifération et l'apoptose (Semenza, 2003).

IV.D.2- Les cellules souches et les basses concentrations d'O₂ - Introduction

Avant de décrire la relation entre les BC-O₂ et les cellules souches, il est très important de décrire les niveaux d'oxygénation dans « la terre- mère » des cellules souches, c'est-à-dire la Niche de cellules souches.

En réalité, les mesures des concentrations d'O₂ tissulaire ont montré que les régions abritant les cellules souches possèdent des niveaux d'O₂ bas. Ceci a soulevé la question de savoir si un tel environnement était nécessaire pour le maintien et la préservation des cellules souches dans leurs niches (Cipolleschi et al, 1993; Erecinska and Silver, 2001) (Figure 9).

Il existe plusieurs données indiquant un avantage sélectif adapté au rôle biologique particulier de ces concentrations physiologiques d'O₂. En effet, ces oxygénations seraient protectrices envers les cellules souches du stress oxydatif qui est nuisible pour l'ADN cellulaire.

Aujourd'hui, après qu'un certain nombre d'expériences aient été effectuées à différentes concentrations d'O₂, l'effet positif des BC-O₂ sur le maintien et la préservation des cellules souches embryonnaires, cancéreuses, neurales, mésenchymateuses ainsi que hématopoïétiques (Mohyeldin et al., 2010) a clairement été établi, notamment, du fait de l'identification du facteur principal impliqué dans cet effet, l'HIF.

La possibilité d'isoler et de cultiver des cellules souches *in vitro* a considérablement fait progresser notre compréhension du rôle crucial de la niche dans certains systèmes de culture de cellules souches. Comme toutes les autres lignées cellulaires, les cellules souches ont été généralement cultivées à la concentration d'O₂ atmosphérique sans tenir compte du statut du micro-environnement naturel et du milieu métabolique de ces cellules. Ceci a pour conséquence la presque totalité des connaissances actuelles relatives à l'action des cytokines et des facteurs de croissance sur les cellules et sur la réponse cellulaire (Metcalf, 2008) est basé sur des expériences réalisées à 20-21% d'O₂, ce qui représente en réalité des conditions très hyperoxiques (Scadden, 2006).

Toutefois, depuis une quinzaine d'années, différentes équipes ont expérimenté *in vitro* les effets de différentes concentrations d'O₂ sur des cultures cellulaires et ont montré que les faibles concentrations ont un impact majeur sur la biologie des CSE et CS adultes (Eliasson and Jonsson, 2010; Silvan et al., 2009).

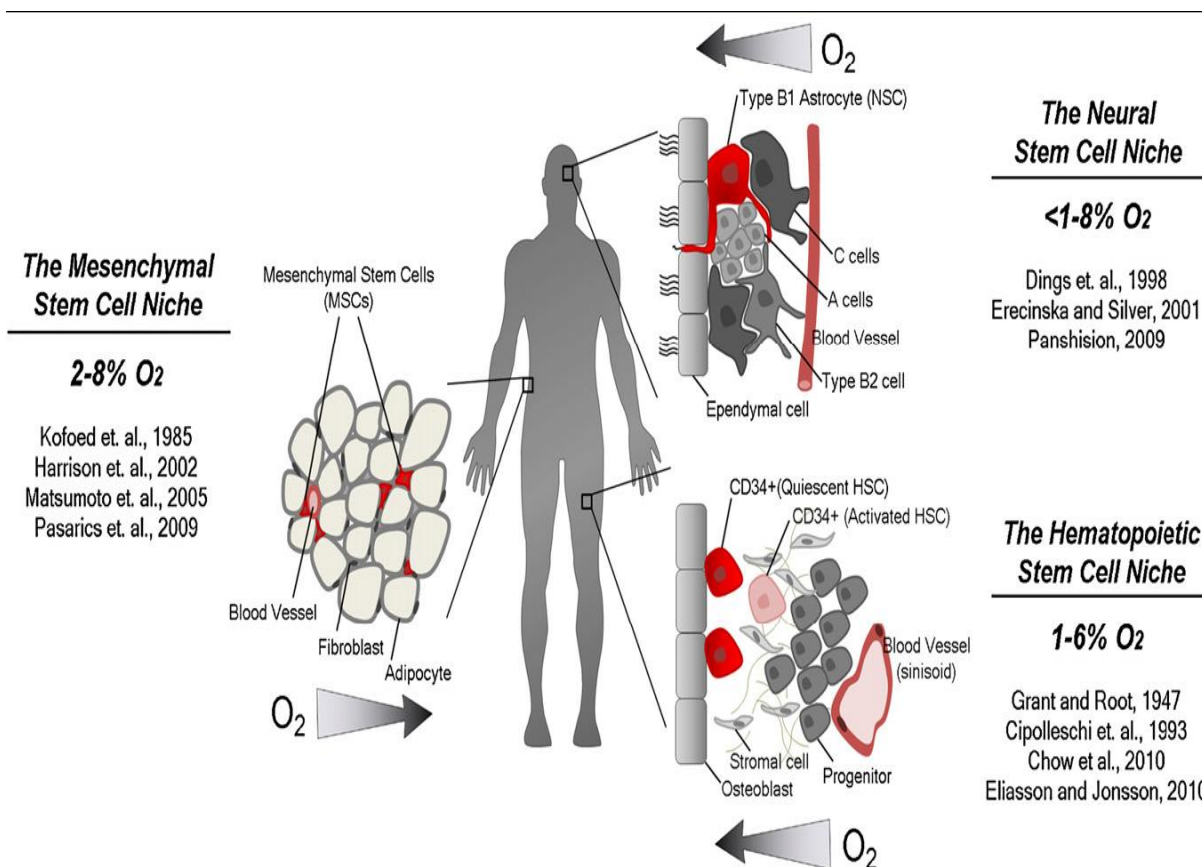


Figure 9 : Les niches de certaines cellules souches avec leurs concentrations physiologiques d'O₂. (D'après Mohyeldin et al., 2010)

IV.D.3- Cellules souches embryonnaires (CSE) et Oxygène

L'embryogenèse est fortement influencée par les gradients d'oxygène. La preuve directe de cette constatation a été faite suite à la mesure des tensions d'oxygène au sein de l'endomètre et des tissus trophoblastiques en début de la grossesse (Mitchell and Yochim, 1968; Brahimi-Horn and Pouyssegur, 2007). Il a été montré que le développement précoce des mammifères se produit dans un environnement relativement pauvre en oxygène. Cette idée a été renforcée à l'issue de la découverte du facteur HIF. En effet, la déficience (*knockout*) homozygote en sous-unités de HIF-1 α , HIF-2 α et HIF- β s'est montrée létale pour l'embryon, identifiant ainsi un rôle essentiel pour la voie HIF au cours du développement (Iyer et al., 1998; Ryan et al., 1998).

Des données concernant la culture de CSE humaines ont démontré qu'aux BC-O₂, leur différenciation est considérablement réduite alors qu'elles se différencient spontanément à 21% d'oxygène, même en présence d'une couche nourricière (Ezashi et al., 2005). Un effet favorisant l'auto-renouvellement et la pluripotence ainsi que la formation de corps embryonnaires a également été rapporté durant la culture aux BC-O₂ (Ezashi et al., 2005). Ezashi a montré que les taux d'oxygène de 3 et 5%, tout en maintenant la pluripotence des CSE, ne compromettent pas leur prolifération alors qu'une concentration plus faible (1%) conduit à une diminution de la prolifération, ce qui suggère l'importance des gradients de tensions d'oxygène pour la régulation de la prolifération et de la quiescence des cellules souches (Ezashi et al., 2005).

En réalité, l'effet positif des BC-O₂ sur les CSE peut également être indirect. En effet, Ji et al ont trouvé que les cellules stromales de foie fœtal humain exprimant le facteur HIF-1 α permettant de préserver l'auto-renouvellement et la pluripotence des CSEh en co-culture (Ji et al., 2009). La sécrétion de facteurs solubles, en particulier SDF-1 et FGF-2, ainsi que le contact cellulaire sont les principaux mécanismes décrits. Ces observations soutiennent l'hypothèse que les faibles tensions en oxygène jouent un rôle crucial dans la culture de CSE directement ou via son micro-environnement.

IV.D.4- Cellules souches pluripotentes induites (iPSC) et Oxygène

Récemment, dans la recherche de nouvelles thérapies cellulaires autologues et afin d'éviter la question éthique de l'expérimentation sur l'embryon humain, la génération de iPSC (*induced Pluripotent Stem Cells*) à partir de cellules différenciées a été réalisée par la transfection de

quatre facteurs de transcription (Oct3/4, Sox2, Klf-4 et c-Myc) (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Comme l'embryogenèse précoce se déroule dans un environnement pauvre en oxygène, il a été proposé que l'efficacité de la reprogrammation serait plus importante aux BC-O₂ (Yoshida et al., 2009). Pour tester cette hypothèse, Yoshida et al. ont introduit les facteurs évoqués ci-dessus dans des fibroblastes embryonnaires murins et des cellules somatiques humaines à 21%, 5% et 1% d'O₂. Ils ont ainsi pu montrer que la reprogrammation et la génération d'iPSCs est plus efficace et plus rapide à 5% d'O₂ en comparaison à 21% et 1% d'O₂. De plus, les auteurs ont également été en mesure de générer des iPSCs avec seulement deux des facteurs de transcription (Oct3/4 et KLF-4) lorsque la programmation a été faite aux BC-O₂ (Yoshida et al., 2009).

IV.D.5- Cellules souches neurales (CSN) et Oxygène

Dans le cerveau de souris, la pression partielle d'oxygène (pO₂) est considérablement inférieure à celle de l'air ambiant variant de 0,5% dans le mésencéphale à 7% à la surface du cerveau (Erecinska and Silver, 2001). Dans le cerveau humain la pO₂ varie d'environ 3% à 22-27 mm de profondeur de la dure-mère, à 4% à 7-12 mm de la dure-mère (Dings et al., 1998), démontrant ainsi un gradient d'oxygène physiologique qui est plus élevé dans l'espace alvéolaire et plus faible dans les tissus. Prenant ces mesures en considération, il est concevable que les CSN dans le cerveau soient situées dans un environnement très peu oxygéné.

Les CSN s'auto-renouvellent, prolifèrent et se différencient en astrocytes, oligodendrocytes et neurones (Laywell et al., 2007). Elles résident dans la zone sous-ventriculaire où se trouve la principale niche neurogénique dans le cerveau adulte des mammifères, et dans l'hippocampe (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002). Ces cellules sont capables de répondre aux stimuli hypoxiques/ischémiques dans d'autres régions du cerveau (Yamashita et al., 2006). Les CSNs implantées dans les zones pauvres en oxygène du cerveau ont permis le maintien de la viabilité des cellules neurales environnantes grâce à la sécrétion de facteur de croissance VEGF régulé par HIF-1 α (Harms et al., 2010).

Des améliorations de la survie et de la prolifération des CSNs dans les conditions de faibles taux d'O₂ ont également été mises en évidence (Morrison et al., 2000).

Enfin, une étude (Copin et al., 2000) très importante a rapporté que les astrocytes déficientes du superoxyde dismutase survivent grâce à l'incubation à 5% d'O₂ alors qu'à 20% l'oxydation de

l'ADN ne le permet pas, ce qui souligne l'intérêt de ces concentrations physiologiques dans la protection contre le stress oxydatif.

IV.D.6- Cellules souches mésenchymateuses et Oxygène

L'intérêt des CSM dans la médecine régénératrice a été confirmé ces dernières années, notamment dans le domaine de pathologies vasculaires où l'hypoxie et l'ischémie tissulaire représentent la problématique principale à prendre en considération pour une thérapie cellulaire réussie. Les résultats encourageants, pourtant instables, obtenus avec les applications des CSM dans la cardiopathie ischémique ont conduit plusieurs équipes à poser la question de l'effet de BC-O₂ sur les CSM. De plus, les différents tissus où se trouvent les CSM possèdent de très faibles taux d'oxygène (Harrison et al., 2002; Kofoed et al., 1985; Matsumoto et al., 2005). Il est donc logique de penser qu'un environnement pauvre en oxygène soit favorable pour le développement des CSM.

IL a été montré que les CSM de rats étaient capables de résister aux concentrations très basses en O₂ mais seulement en présence de sérum (Zhu et al., 2006 ; Potier et al., 2007 Tissue Eng). En effet, les CSM semblent utiliser la voie glycolytique pour maintenir leur viabilité à BC-O₂ (Grayson et al., 2007). Grâce à ce genre de métabolisme anaérobie, les CSM peuvent résister même à l'hypoxie sévère (pO₂ <1%) pendant au moins 48 h contrairement à d'autres types cellulaires comme les cardiomyocytes (moins de 4 h) (Mylotte et al., 2008; Potier et al., 2007).

Enfin, d'autres travaux ont rapporté que les CSM pré-conditionnées en milieu pauvre en oxygène accroissent leurs capacités à survivre dans les tissus ischémiques (Hu et al., 2008). Cet effet semble obtenu suite à la stimulation des facteurs anti-apoptotiques Bcl-2 et bcl-xl accompagnée par la diminution de l'activation de caspase-3. L'augmentation de la production de facteurs pro-angiogéniques (VEGF et IL-6) serait également fortement impliquée.

IV.D.6.1- La prolifération

Au niveau de la prolifération, il a été proposé que la culture des CSM sous tension d'oxygène physiologique puisse influencer leur prolifération. Lennon et al ont trouvé que la culture des CSM médullaire à 5% d'O₂ entraîne une augmentation du nombre de cellules obtenu (Lennon et al., 2001). Un autre travail a montré qu'une culture à cette même concentration d'O₂ permet aux CSM de développer un programme génétique qui contribue au maintien de l'état

indifférencié et de multipotence, assurant une capacité proliférative plus importante (Basciano et al., 2011). Grayson et al. ont obtenu un résultat comparable après une culture à 2% d'O₂ même après plusieurs passages (Grayson et al., 2007). D'autre part, D'Ippolito et al. ont montré qu'une concentration de 3% d'O₂ diminue le temps de doublement des CSM médullaires (D'Ippolito et al., 2006). Ces résultats semblent en concordance avec d'autres études rapportant une rapide prolifération des cellules mononucléées médullaires à 5% d'O₂ (Carrancio et al., 2008) et des CSM à 8% d'O₂ (Ren et al., 2006). Il a également été montré une progression du cycle cellulaire plus rapide suite à l'exposition à 1,5% d'O₂ même à court terme, expliquant ainsi la prolifération accrue des CSM dans cette condition (Martin-Rendon et al., 2007).

En réalité, la culture des CSM à 20% d'O₂ (hyperoxie) conduirait à l'accumulation des molécules ROS ayant un rôle néfaste bien connu, provoquant l'apoptose et le vieillissement cellulaire prématuré (Bertram and Hass, 2008). En effet, les CSM exposées à des taux élevés d'oxygène subissent une sénescence prématurée et une réduction de l'expansion en comparaison avec celles cultivées à 2% (Grayson et al., 2007; Dos Santos et al., 2010) et à 1% d'O₂ (Jin et al., 2010; Peterson et al., 2011; Tsai et al., 2011). Ceci est le résultat du raccourcissement des télomères conduisant à la réduction du nombre de divisions cellulaires (Bertram and Hass, 2008).

L'expansion améliorée de CSM dans des conditions pauvres en O₂ ne semble pas compromettre leur primitivité ni leur potentiel multilignée. Au contraire, celui-ci semble même augmenter comme en témoignage de l'expression du gène embryonnaire Oct-4 (Grayson et al., 2007). Ce gène qui est considéré comme un «marqueur» de la pluripotence pourrait être régulé en amont par l'HIF-2 α (Grayson et al., 2007) ou l'HIF-1 α (D'Ippolito et al., 2006).

IV.D.6.2- La différenciation

Le rôle des CSM dans la réparation des tissus squelettiques est parmi les applications prometteuses de ces cellules. En réalité, « l'hypoxie » tissulaire est bien présente dans les pathologies touchant ce tissu étant donné que le cartilage est un tissu essentiellement acellulaire non vascularisé et que les tissus osseux peuvent être mal irrigués suite à certaines affections (ex : les fractures). Il convient donc bien d'étudier l'effet des BC-O₂ sur le potentiel de différenciation des CSM en particulier vers les ostéoblastes, les chondrocytes et les adipocytes.

Dans plusieurs travaux, les CSM médullaires humaines cultivées sous faibles taux d'O₂ ont montré une diminution de la différenciation ostéogénique et adipocytaire, soutenant ainsi l'idée

que la faible tension d'oxygène favorise un état indifférencié de ces cellules souches (Holzwarth et al., 2010; D'Ippolito et al., 2006; Fehrer et al., 2007). En effet, (Tamama et al., 2011) ont mis en évidence l'implication du facteur HIF dans la diminution de la différenciation ostéogénique au profit de l'état indifférencié des CSM. Dans ce travail la diminution de la différenciation adipocytaire sous BC-O₂ était indépendante de HIF.

Le tissu adipeux est une source importante de CSM du fait de son accessibilité grâce à des procédures minimalement invasives. Les effets de BC-O₂ sur les CSM des tissus adipeux sont comparables avec ceux observés sur les CSM d'origine médullaire. Des auteurs rapportent que la culture à faibles tensions d'O₂ de CSM des tissus adipeux améliore leur potentiel chondrogénique tout en diminuant leur prolifération (Wang et al., 2005). De plus, pour certains auteurs, la culture en structure 3-D serait essentielle pour induire la différenciation chondrocytaire sous faible tension d'O₂ et en présence de certains facteur solubles (ex : TGF- β) (Wang et al., 2005; Müller et al., 2011). Pourtant, un potentiel ostéogénique et chondrogénique diminué a été détecté par Malladi quand ces cellules sont différenciées sous une tension d'O₂ de 2% (Malladi et al., 2006). Cet effet de BC-O₂ sur les CSM adipeux serait médiée par HIF-1 α car l'inhibition de ce facteur conduit à une diminution du potentiel chondrogénique tout en améliorant le potentiel adipogénique (Malladi et al., 2007). Ces données confirment le rôle de la tension d'oxygène comme facteur déterminant du caractère souche et du destin cellulaire des CSM adipeux et médullaires en augmentant, en général, le potentiel chondrogénique et en diminuant le potentiel l'ostéogénique et adipocytaire.

IV.D.6.3- La migration

Le mécanisme régulant la mobilisation des CSM dans la circulation sanguine n'est pas encore entièrement identifié à ce jour. Rochefort et al ont montré pour la première fois, sur un modèle de rats élevés pendant 3 semaines dans une chambre hypoxique (hypoxie chronique), que les CSM ont été mobilisées dans la circulation périphérique (Rochefort et al., 2006). Les cellules purifiées en circulation possédaient bien des caractéristiques (immunophénotype et multipotentialité) de CSM. Cet effet de l'hypoxie était relativement spécifique aux CSM car les progéniteurs hématopoïétiques n'ont pas été mobilisés de la MO.

La capacité des CSM implantées à migrer vers l'organe endommagé a été montrée dans les fractures osseuses, les défauts cartilagineux (Murphy et al., 2003), l'infarctus du myocarde

(Barbash et al., 2003) et les lésions cérébrales (Ji et al., 2004; Omori et al., 2008). Toutefois, la question reste de savoir comment les CSM sont dirigés vers les sites endommagés. Ce processus de migration peut impliquer différentes chimiokines, cytokines et des molécules d'adhésion. Parmi les chimiokines, l'axe SDF-1/CXCR-4 a été rapporté comme étant exprimé constitutivement dans une grande variété de tissus (Ma et al., 1998). Le SDF-1 et son récepteur CXCR-4 sont cruciaux pour la domiciliation (après transplantation), mobilisation et la migration des cellules souches. Bien que la domiciliation des cellules souches de la moelle osseuse soit médiée par le SDF-1 en se liant au CXCR-4 exprimé sur les cellules circulantes, la régulation de SDF-1 et son rôle physiologique dans la réparation des tissus périphériques restent à explorer. Une étude française a montré que l'implication des chimiokines dans la migration des CSM stimulée par des cytokines inflammatoires, était moins importante par rapport à celle de certains facteurs de croissance comme le PDGF-AB et l'IGF-1 (Ponte et al., 2007).

Zhu et al ont rapporté l'implication indispensable de la fractalkine (CX3CL-1) et son récepteur CX3CR-1 dans la migration des CSM transplantées par voie intraveineuse vers une région ischémique du cerveau (Zhu et al., 2009). Annabi et al ont montré *in vitro* que la migration des CSM est un phénomène dépendant de la MMP (Annabi et al., 2003).

En réalité, les CSM exposées à des conditions de culture pauvre en O₂ montrent un phénotype plus migrateur que celles maintenues en concentrations d'O₂ atmosphériques (Rosova et al., 2008). Ces conditions de culture induisent l'activation de signalisation de Akt, la régulation positive de c-Met (le récepteur de HGF) (Rosova et al., 2008), l'expression de VEGF, la phosphorylation de la focal adhésion kinase (FAK) (Lee et al., 2010) et l'expression de certains récepteurs aux chimiokines tels que CXCR-4 et CX3CR-1 (Hung et al., 2007b). L'hypoxie ou l'ischémie tissulaire sont connues comme inducteurs de plusieurs cytokines et chimiokines dans différentes maladies. Les CSM étant sensibles à ces facteurs humoraux, elles sont recrutées par eux dans les sites de lésions par un gradient de concentration (Rafii and Lyden, 2003). Après le recrutement, ces cellules répondent au micro-environnement local en exprimant des facteurs angiogéniques (Potier et al., 2007).

IV.D.6.4- La sécrétion des facteurs solubles : Rôle Endocrine/paracrine

En dehors de leurs capacités liées à l'effet direct par contact cellulaire, les CSM peuvent jouer un rôle indirect important dans divers processus via la sécrétion de facteurs solubles. Ceci a

été mis en évidence dans plusieurs situations et les BC-O₂ pourraient influencer un large spectre de ces facteurs. Ohnishi et al, décrit que de nombreux gènes sont surexprimés lors de la culture de CSM de rat à 1% d'O₂ pendant 24h (Ohnishi et al., 2007). En se focalisant sur les gènes codant des protéines sécrétées, ils décrivent la régulation positive de plusieurs molécules impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire, tels que le VEGF-D, le PLGF (facteur de croissance placentaire), le PBEF1 (*Pre-B-cell colony- Enhancing Factor*), le HB-EGF (*Heparin Binding Epidermal Growth Factor*) et la MMP9. Pour certains de ces gènes, ils rapportent un effet du niveau d'O₂ et de la durée de culture. La plupart des gènes sont surexprimés à 10% d'oxygène notamment après 24 h de culture. Wu et al., a confirmé que pendant la culture de CSM humaines à 3% d'O₂ pour une durée de 4, 12, 24, 36, 48 et 72 h, la plupart des gènes influencés par cette culture sont régulés après 24 heures (Wu EH et al., 2007) alors que très peu le sont après 4 heures (augmentation de VEGF et l'expression de MT1 (MMP) et diminution de l'expression MMP2) (Annabi et al., 2003).

En réalité, l'augmentation de l'expression des ARNm n'est pas toujours combinée avec une sécrétion augmentée des facteurs dans le milieu de culture. En effet, les CSM humaines mises en culture pendant 72 h à 1% d'O₂ accroissent leur contenu en ARNm des facteurs de croissance fibroblastique (FGF-2 et FGF-7), d'IL-1 et IL-6, des facteurs de croissance placentaire, du TGF- β , du TNF- α et du VEGF. Cependant, seules les protéines VEGF, FGF-2 et IL-6 sont augmentées dans le milieu de culture (Kinnaird et al., 2004). Muir et al. ont confirmé les résultats concernant le VEGF en travaillant sur une lignée hs27 médullaire, mais ils ont cependant montré que l'expression de FGF et HB-EGF était très basse (Muir et al., 2006).

Potier et al. ont cultivé les CSM humaines, en présence de sérum, en les soumettant à une tension en oxygène qui diminue progressivement. Après 48 h de culture à une concentration d'O₂ inférieure à 1%, l'expression des ARNm du TGF- β 3 diminue tandis que ceux du FGF-2 et du VEGF augmentent. Au niveau de l'expression protéique, le VEGF est augmenté, alors qu'aucun effet n'a été trouvé pour le FGF-2. Dans cette étude, la sécrétion d'IL-6, IL-8, et MCP1 n'est pas significativement affectée (Potier et al., 2007).

Dans une autre étude où les CSM humaines ont été cultivées pendant 2 jours à BC-O₂ dans un milieu sans sérum (Potier utilisé 10% de SVF), IL-6 et MCP1, comme le VEGF, sont retrouvés en quantités nettement plus importantes en comparaison à la condition de 20% d'O₂ (Hung et al., 2007a).

Les BC-O₂ affectent non seulement la sécrétion de facteurs solubles mais régulent aussi CX3CR-1 et CXCR-4 (Hung et al., 2007b; Wang et al., 2008b) ainsi que l'expression de cMet (Rosova et al., 2008). Ces récepteurs peuvent accroître la domiciliation et la migration des CSM vers les zones endommagées. Certains auteurs trouvent que même les propriétés immuno-modulatrices des CSM peuvent être régulées (Crisostomo et al., 2008).

Les données précédentes suggèrent que le préconditionnement des CSM par les BC-O₂ peut être utilisé pour améliorer les performances de celles-ci dans les applications de la médecine régénératrice. Ceci a été prouvé dans plusieurs modèles.

En effet, le préconditionnement des CSM pendant 24 h en BC-O₂ avant l'implantation dans un modèle d'infarctus du myocarde a diminué la mort des cellules tout en augmentant leur potentiel angiogénique (Hu et al., 2008). Wang et al ont raccourci le temps de ce pré-conditionnement à BC-O₂ à 10, 20 et 30 min et ont observé qu'à partir de 10 minutes d'incubation, la viabilité et les propriétés angiogéniques commencent à s'améliorer pour atteindre des niveaux plus importants avec des durées d'incubation plus longues (Wang et al., 2008a). Par ailleurs, des études réalisées sur le cerveau ont montré que ce pré-conditionnement permet d'améliorer la migration des CSM vers les régions encéphaliques endommagées (Wang et al., 2008b). Dans cette étude, les auteurs montrent une régulation positive du CXCR-4 par les CSM suite à la culture *ex vivo* et qui va se lier au SDF-1 α exprimé dans le cerveau endommagé. Les ASCs ont également montré une régulation positive de la sécrétion du VEGF (Rehman et al., 2004).

Les divergences dans les procédures d'isolement, de culture, et de conception expérimentale (Bianco et al., 2008) avec les CSM rendent difficile les conclusions générales concernant le rôle des BC-O₂ sur la biologie de ces cellules. Cependant, la tension en oxygène est sans aucun doute un régulateur important dans la détermination de leur destin cellulaire et dans leur maintien dans un état indifférencié.

IV.D.7- Cellules souches hématopoïétiques et Oxygène

Les études portant sur l'effet de faibles teneurs en oxygène sur les CSH ont été relativement plus nombreuses par rapport aux autres types de cellules souches d'adultes, étant donné qu'elles représentent le prototype de celles-ci. Avec la capacité de purification et de

modification des CSH *in vitro* pour des applications *in vivo*, de nouveaux outils expérimentaux ont permis l'investigation directe de leur niche d'origine. Ainsi, il a été observé lors du suivi de CSH après leur transplantation qu'elles résident vraisemblablement dans les régions médullaires adjacentes à la surface osseuse (endoste) en contact avec les cellules ostéoblastiques et loin des vaisseaux sanguins (Lévesque and Winkler, 2011). Les contacts avec les ostéoblastes et les éléments du stroma sont en effet essentiels pour le maintien des CSH de la niche médullaire (Qian et al., 2007; Yoshihara et al., 2007).

Plusieurs articles publiés à partir des années 1990 ont montré que les concentrations en O₂ dans la niche médullaire sont très basses (Cipolleschi et al., 1993; Dello Sbarba et al., 1987). La tension en oxygène du sang circulant dans la moelle osseuse est plus faible que dans les autres tissus, elle est même équivalente à celle du sang de la veine jugulaire (Grant and Root, 1947). Les modèles mathématiques basés sur des données animales ont proposé que la tension d'oxygène dans la niche est inférieure à 1% (Chow et al., 2001). De plus, un gradient d'oxygène existe au sein de la moelle osseuse humaine au travers duquel les cellules hématopoïétiques se répartissent selon leur hiérarchie. Ce gradient s'étend de moins de 1% dans les niches des CSH (chow et al., 2001; Tondevold et al., 1979; Arai and Suda, 2007; Parmar et al., 2007; Wilson et al., 2008), jusqu'à environ 6% près de la cavité sinusoïdale où se trouvent les cellules matures (Eliasson and Jonsson, 2010). Des travaux très récents ont mis l'accent sur l'intérêt du profil métabolique de cellules hématopoïétiques qui reflète leur localisation spéciale dans le micro-environnement médullaire. Dans ce sens, une étude a décrit que les CSH utilisent la glycolyse qui est contrôlée par HIF-1 α afin de s'adapter à la vie dans la niche (Simsek et al., 2010). Le facteur HIF-1 α est primordial pour assurer la fonction SRC des CSH (Takubo et al., 2010) tout comme le facteur HIF-2 α . Dans ce contexte, des études ont démontré que les CSH en cycle mitotique lent sont localisées dans les zones pauvres en oxygène de la moelle, tandis que les progéniteurs ayant un cycle plus actif et une capacité limitée d'auto-renouvellement résident dans des zones beaucoup plus proches de la vascularisation (Kubota et al., 2008).

IV.D.7.1- Le cycle cellulaire des cellules hématopoïétiques primitives

Les cellules CD34⁺ cultivées à de faibles concentrations d'O₂ présentent une diminution significative de leur prolifération (Ivanovic et al., 2000; Danet et al., 2003), ce qui a été également montré avec les cellules primitives murines (LSK) (Eliasson et al., 2010). En effet,

Eliasson a rapporté une augmentation du pourcentage des cellules en phase G0 du cycle cellulaire suite à une culture de cellules LSK à 1% d'O₂ (Eliasson et al., 2010). Ce phénomène est expliqué par une surexpression des gènes inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes (P21, P27 et P57) dans la population de cellules LSK totales (encore hétérogènes pour leur potentiel souche). Cependant, il n'a pas apporté de preuve directe que ces cellules sont en quiescence (test de sensibilité au 5-FU). Dans ce sens, Jang et Sharkis ont observé que les cellules hématopoïétiques primitives présentes dans la niche hypoxique expriment des niveaux élevés de Notch-1, de télomérase et de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21 plus que les cellules proches de la vascularisation (Jang and Sharkis, 2007). Cette observation a été récemment soutenue par un travail sur un modèle de xénogreffe dans lequel des cellules humaines placentaires CD34⁺ CD38⁻ pré-cultivées à 1% d'O₂ disposent d'un potentiel de greffe très important accompagné d'une surexpression de P21 (un inhibiteur du cycle cellulaire) et d'une réduction significative de leur prolifération (Shima et al., 2009).

Toutefois, le travail de Danet a rapporté une augmentation de la phase G1 du cycle cellulaire plutôt que de la phase G0. Il y a quelques années, notre équipe a montré que les cellules pré-CFC murines dotées d'une capacité de repeuplement prolifèrent (en cycle actif) même dans la culture de 1% d'O₂, puisque 70% de ces pré-CFC sont sensibles à la toxicité du 5-fluorouracile (5-FU) ce qui se traduit par la disparition de leur capacité à générer des progéniteurs CFC en culture secondaire à 20% O₂ (Cipolleschi et al., 2000).

La purification et le repiquage des cellules CD34⁺ murines basés sur leur nombre de divisions après 8 jours de culture primaire à 1% ou à 20% d'O₂ montre que les cellules qui se divisent une fois ou plus à 1% d'O₂ génèrent beaucoup plus de progéniteurs en culture secondaire que les cellules qui ne se divisent pas et que toutes celles issues de la culture primaire à 20% O₂ (Ivanovic et al., 2002). Ce travail suggère que les cellules hématopoïétiques primitives dans leur micro-environnement (à des concentrations d'O₂ proches de 1%) peuvent se diviser sans perdre leurs primitivités. Suite à ce travail, notre équipe a réalisé une culture de 3 jours de cellules CD34⁺ placentaires humaines en diminuant la concentration d'O₂ à 0,1%. Dans cette étude, le nombre absolu de cellules en G0 augmente en fin de culture suggérant ainsi un blocage de l'entrée en cycle et une induction du retour à l'état de quiescence pour les cellules terminant leurs divisions (Hermitte et al., 2006).

Très récemment, nous avons utilisé une lignée hématopoïétique non-leucémique murine (FDCP) (*Factor-Dependent Cell Paterson*) pour étudier certaines molécules du cycle cellulaire impliquées dans la quiescence et l'auto-renouvellement des CSH (Guitart et al., 2011). Ainsi, après 3 jours de culture à 0,1% d'O₂, la majorité des cellules FDCP-mix sont retrouvées en phase de G0 et sont différenciées. Toutefois, la minorité des cellules qui, dans ces conditions, sont capables d'auto-renouvellement, de former des colonies et repeupler les cultures secondaires après repiquage à 20% d'O₂ sont quant à elles en cycle lent (reflété par leur sensibilité au 5-FU).

Les BC-O₂ représentent donc un élément crucial dans la régulation du cycle cellulaire des CSH. « L'anaérobie » (oxygène < 1%) engendrerait en effet un contexte de faible énergie mais suffisante pour la prolifération permettant l'auto-renouvellement mais empêchant l'engagement des cellules dans la différenciation qui exige beaucoup plus d'énergie (Ivanovic et al., 2009b). Des concentrations d'O₂ comprise entre 1,5% (à partir desquelles l'expansion cellulaire est possible) et 5% (la plus haute concentration de la moelle osseuse et au deçà de laquelle HIF-1 α se stabilise) pourraient permettre en effet une activation limitée et régulée de la prolifération cellulaire (Ivanovic et al., 2004b; Danet et al., 2003) (Figure 10).

IV.D.7.2- Le stress oxydatif

Lorsqu'elles résident dans une niche pauvre en O₂, les cellules souches peuvent restreindre leur prolifération tout en restant à l'abri du stress oxydatif qui émerge dans les tissus les plus exposés à l'oxygène suite à l'accumulation des molécules ROS (*Reactive Oxygen Species*) comme résultat de la respiration mitochondriale (Busuttil et al., 2003; Cipolleschi et al., 1993; Eliasson and Jonsson, 2010; Lekli et al., 2009; Jang and Sharkis, 2007; Parmar et al., 2007).

L'effet négatif de l'accumulation de ROS sur la survie et la fonctionnalité des CSH a été clairement décrit (Yahata et al., 2011; Ito et al., 2006; Carrera et al., 2010; Shao et al., 2011). Plusieurs études suggèrent que le niveau intracellulaire de ROS et les voies de signalisation associées pourraient être une pièce majeure dans le puzzle de régulation de l'auto-renouvellement et de la prolifération à long terme des CSH et, par conséquent, dans leur sénescence (Ito et al., 2004; Miyamoto et al., 2007 ; Liu et al., 2009a).

Une étude portant sur des cellules médullaires murines représentant toute la hiérarchie hématopoïétique a montré que la pré-incubation aux BC-O₂ a un effet favorable sur les cellules

primitives et négatif sur les progéniteurs engagés (Eliasson et al., 2006). En réalité, l'adaptation des CSH à des BC-O₂ est médiée par le facteur HIF. Ce facteur active des gènes qui influencent la fonction mitochondriale et dirigent la machinerie cellulaire vers la glycolyse, comme mécanisme de production de l'énergie cellulaire, via l'activation transcriptionnelle de l'enzyme pyruvate déshydrogénase kinase (PDK) -1 (Simon, 2006; Kirito et al., 2009). Ce mécanisme permettrait ainsi d'assurer la production de suffisamment d'ATP dans cette situation de BC-O₂ tout en produisant le minimum de ROS. Kim et al. ont montré que les cellules déficientes en HIF-1 ne sont pas viables en raison du stress oxydatif; en revanche, elles peuvent échapper à l'apoptose suite à la surexpression de (PDK)-1 (Kim et al., 2006).

Une culture de cellules CD34⁺ placentaires humaines à 5% d'O₂ conduit à une faible production de ROS corrélée avec une préservation des progéniteurs primitifs Pré-CFC (Fan et al., 2007; 2008) par rapport à une concentration de 20% d'O₂.

De façon importante, des données ont révélé que les cellules hématopoïétiques les plus primitives peuvent être isolées sur la base de leur faible contenu intracellulaire en ROS (Jang and Sharkis, 2007). D'autres études ont également montré qu'une partie du programme des cellules quiescentes est consacré à la détoxification (Ivanova et al., 2002; Ramalho-Santos et al., 2002), indiquant que les CSH adoptent des mécanismes métaboliques permettant de se protéger contre l'augmentation de ROS.

IV.D.7.3- L'expansion *ex vivo* des cellules souches hématopoïétiques et Oxygène

L'effet positif des BC-O₂ sur la fonctionnalité et le maintien des CSH a conduit plusieurs auteurs à tester ce facteur dans l'expansion *ex vivo* de CSH en vue de greffe.

Il existe maintenant des preuves que la culture des CSH de différentes origines sous BC-O₂ pourrait maintenir leur activité de repeuplement plus que la culture sous oxygénation atmosphérique (Cipolleschi et al., 2000; Ivanovic et al., 2000; 2002; 2004b; Kovacevic-Filipovic et al., 2007; Fan et al., 2007).

En réalité, dans ce domaine, la plupart des études de culture *ex vivo* a été effectuée sous concentrations de 1 à 5% d'O₂ pendant 4 à 14 jours sur des cellules hématopoïétiques purifiées selon des critères phénotypiques.

En effet, Danet a montré que la culture de cellules CD34⁺ médullaires humaines pendant 4 jours à 1,5% d'O₂ permet le maintien des CSH mieux qu'à 20% O₂, comme en témoigne leur meilleure

capacité à greffer les souris NOD-SCID (Danet et al., 2003). Ceci avait été déjà montré sur les cellules médullaires murines (Cipolleschi et al., 1993; 2000). Koller et al. ont montré un meilleur maintien de cellules hématopoïétiques primitives à plus long terme dans la condition de 5% d'O₂ et en présence d'une couche stromale (Koller et al., 1992a). Mostafa a trouvé que la culture de cellules CD34⁺ humaine à 5% d'O₂ a permis de maintenir et d'amplifier les progéniteurs mégacaryocytaires alors qu'ils se différencient à 20% d'O₂ (Mostafa et al., 2000).

Plus récemment, il a été montré que la culture avant transplantation de cellules CD34⁺ CD38⁻ humaines dans des conditions pauvres en O₂ semble améliorer la prise de greffe chez les souris immunodéprimées (Shima et al., 2009).

En utilisant des cellules CD34⁺ placentaires (ivanovic et al., 2004b), nous avons mis en évidence que les SRC sont mieux maintenues à 3% qu'à 20% O₂, après 7 jours de culture liquide, avec une expansion équivalente des progéniteurs engagés (CFC) (Figure 10).

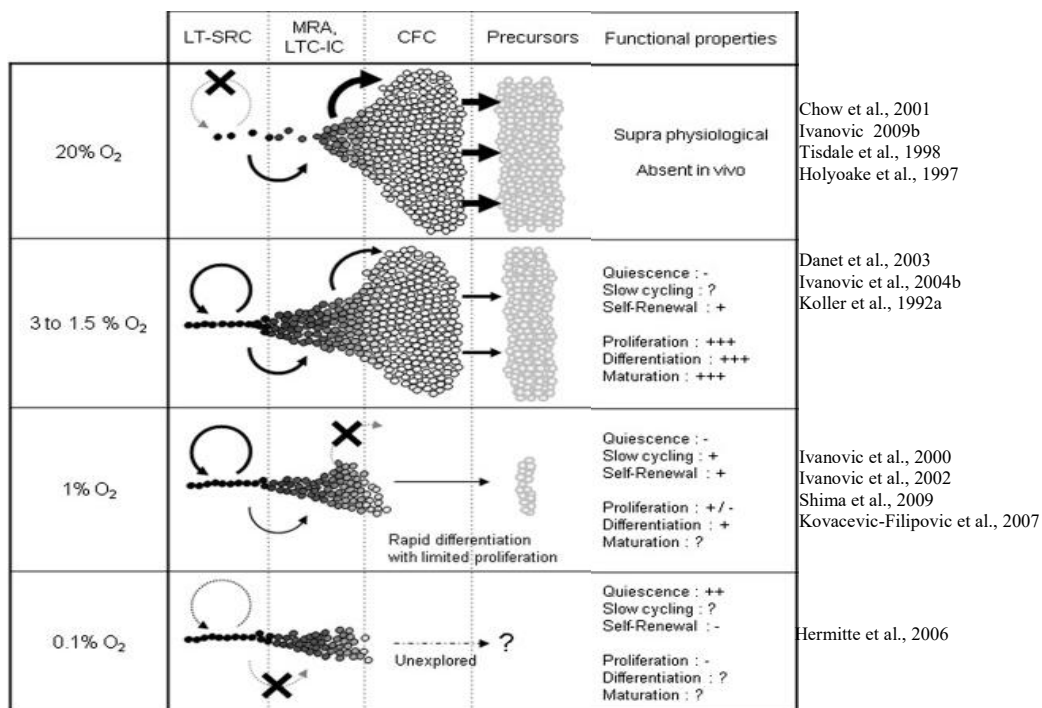


Figure 10 : Expansion de greffon hématopoïétique en fonction des concentrations d'O₂. Les concentrations d'O₂ mentionnées à gauche ont été utilisées pour des expériences *in vitro*. Elles sont probablement proches de celles présentes dans les différents domaines fonctionnels de moelle osseuse où les cellules souches, progéniteurs et des précurseurs résident. L'épaisseur des flèches représente l'intensité de l'auto-renouvellement (↺), l'engagement, et la prolifération (↗) et la différenciation terminale / maturation (→). CFC: Colony Forming Cells; LT-SRC: Long Terme SCID-repopulating cell; ARM: Marrow-Repopulating Ability; LTC-IC: Long-Term Culture-Initiating Cell. (Adapté d'après Guitart et al., 2010).

IV.D.7.4- Modulation de l'effet des cytokines

Les différents facteurs environnementaux activateurs ou inhibiteurs, tels que les cytokines, les chimiokines et les éléments de stroma devraient être combinés avec les BC-O₂ pour moduler la balance quiescence/prolifération et auto-renouvellement/différenciation qui caractérise les cellules souches adultes, y compris les CSH.

Concernant le rôle de l'IL-3 dans ce domaine, notre équipe a d'une part montré qu'une faible concentration d'IL-3, 0,5 ng/mL (par rapport à 5 et 50 ng/mL) dans un milieu sans sérum, permet de maintenir une activité cellules souches beaucoup plus élevée en culture primaire à 3% O₂ révélée par la production de CFC en culture secondaire, ainsi que par le test de xénogreffe sur les souris NOD-SCID (Ivanovic et al., 2004a; 2004b). D'autre part, elle a observé que l'addition d'IL-3 (en concentration de 10 ng/mL) dans une culture primaire avec sérum de cellules médullaires murines pendant 8 jours à 1% ou 20% O₂, avait un effet négatif sur le maintien de pré-CFC dans les deux conditions d'oxygénation (Ivanovic et al., 2002).

Des effets contradictoires de l'IL-3 sur l'expansion et la fonctionnalité de CSH ont été à l'origine de plusieurs publications (Eliasson et al., 2010; Li and Clevers, 2010). Cette confusion dans le rôle de l'IL-3 pourrait en effet être dépendante de sa concentration, de la combinaison avec d'autres facteurs, de la présence ou de l'absence de sérum et du niveau hiérarchique de la population des cellules cibles analysées (Ivanovic et al., 2004a).

Le rôle bénéfique de l'IL-6 dans le maintien des pré-CFC au cours de la culture de cellules médullaires murines Lin⁻ à faible concentrations d'O₂ a été démontré par Kovacevic-Filipovic (Kovacevic-Filipovic et al., 2007). Les auteurs ont également trouvé que ces cellules enrichies en CSH ont un cycle cellulaire plus lent et gardent une meilleure capacité à repeupler les cultures secondaires suite à une culture primaire à 1% par rapport à 20% O₂. Toutefois, un travail effectué par Eliasson et al. n'a pas noté cet effet positif de l'IL-6 sur le maintien de CSH dans les cultures à 1% O₂. La différence pourrait être due à une durée de culture primaire plus courte de (4 jours) ainsi qu'à des variations techniques au niveau de l'approche expérimentale.

V. Expansion *ex vivo* de Greffon du Sang Placentaire

V.A. La greffe de cellules souches hématopoïétiques

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) représente une alternative thérapeutique majeure dans le traitement de certaines maladies hématologiques et non hématologiques, et elle a révolutionné la prise en charge de certaines pathologies dites incurables. En effet, le recours à la greffe de CSH prend de plus en plus d'ampleur et ses indications ne cessent de s'accroître. Cette greffe peut aussi être réalisée consécutivement à une transplantation d'organes. Le nombre de greffe de CSH réalisées en France et dans le monde est ainsi en augmentation.

V.A.1. Les différents types de greffe de cellules souches hématopoïétiques

Il est aujourd'hui préférable de ne plus parler de « greffe de moelle osseuse » mais plutôt de « greffe de Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) » dans la mesure où, d'une part, il existe d'autres origines pour les greffons (le sang périphérique mobilisé (actuellement le plus utilisé) et le sang placentaire), et d'autre part, ce sont les CSH qui assurent la substitution du système hématopoïétique à long terme. Cependant, étant donné que les progéniteurs constituent également « une matière fonctionnelle » du greffon (à côté des CSH) avec pour principale fonction d'assurer le raccourcissement de la durée d'aplasie suite au conditionnement du patient, d'autres auteurs et nous-mêmes utilisons le terme de « greffe de Cellules Souches et Progéniteurs Hématopoïétiques (CSH/PH) ».

V.A.1.1- L'autogreffe: Dans ce type de greffe, les CSH sont recueillies chez le malade lui-même. Dans un premier temps, le greffon est prélevé chez le malade lors d'une phase de rémission de sa maladie, puis conservé avant d'être re-perfusé au malade dans une période de consolidation de la maladie. L'avantage de l'autogreffe de CSH est l'absence de rejet, ou de GVHD, mais elle est utilisée comme support transfusionnel plutôt que véritable traitement. L'autogreffe est destinée à des patients atteints de différentes formes d'hémopathies malignes notamment les lymphomes non hodgkiniens (NHL) et le MM (Gyurkocza et al., 2010). Des patients souffrants des cancers solides résistants aux traitements (cancer du système nerveux, du sein, des ovaires, des os.. etc.) peuvent également bénéficier de l'autogreffe.

V.A.1.2- L'allogreffe: Les CSH sont prélevées chez un donneur sain HLA compatible avec le patient soit de la fratrie ou, à défaut, des fichiers nationaux/internationaux des donneurs volontaires non apparentés.

Les molécules HLA ont pour fonction de présenter les peptides dérivés d'Ag protéiques aux lymphocytes T spécifiques de ces Ag. Elles interviennent dans la reconnaissance du soi et du non soi. Ainsi, elles occupent une place fondamentale dans la transplantation car la compatibilité de HLA est un déterminant de la prise ou du rejet de greffons ainsi que des différentes complications de la greffe.

L'allogreffe constitue une véritable immunothérapie contre la maladie résiduelle. Son principe est la destruction du compartiment cellulaire malin par le conditionnement (chimiothérapie et/ou irradiation corporelle) et de le remplacer par des cellules issues du donneur sain.

Le conditionnement peut être intensif (myélo-ablatif) assurant : (i) la suppression « complète » des cellules tumorales du receveur, (ii) la lympho-ablation pour éviter le rejet et (iii) la réduction de la cellularité médullaire et donc la libération de l'espace requis pour l'installation de cellules de donneur. Il peut également être atténué (non myélo-ablatif) s'agissant d'un traitement immunosuppresseur ayant pour principale indication, les personnes âgées ne supportant pas le conditionnement classique. Ce conditionnement repose sur l'exploitation de l'effet GVL (*Graft Versus Leukemia*) avec la ré-injection à distance de la greffe des lymphocytes provenant du donneur.

Malgré tout, de nombreuses complications dont le rejet et la GVHD peuvent apparaître après la greffe.

On compte 50 000 à 60 000 allogreffes par an qui sont enregistrées dans le monde (Gyurkocza et al., 2010). Les hémopathies malignes, l'aplasie médullaire et les maladies héréditaires représentent les trois grandes catégories d'indication de l'allogreffe, toutefois les patients leucémiques occupent la majorité des lits dans les unités d'allogreffe dans le monde (Gyurkocza et al., 2010) (Tableau 3 et Figure 11).

En France, on constate la même tendance. Selon l'Agence de la Biomédecine, l'activité globale de la greffe allogénique ne cesse d'augmenter et les deux principales indications sont la leucémie aiguë myéloblastique et la leucémie aiguë lymphoblastique (respectivement 31,2% et 14,5% des allogreffes en 2010) (Figure 11).

Tableau 3 : Pathologies représentant les indications de la transplantation de cellules hématopoïétiques allogéniques. (D'après Gyurkocza et al., 2010)

Maladies acquises :	Maladies héréditaires :
Aplasie Médullaire	Thalassémie
Hémoglobinurie Nocturne Paroxysmal	Drépanocytose
Leucémie Myéloïde Aigue	Anémie de Fanconi
Leucémie Lymphoblastique Aigue	Syndrome de Blackfan-Diamond
Syndromes Myélodysplasiques	Dyskératoses Congénitales
Désordres Myéloprolifératifs	Shwachman–Diamond Syndrome
Leucémie Myéloïde Chronique	Syndrome de Wiskott–Aldrich
Multiple Myélome (MM) et autres Désordres de Cellules Plasmocytaires	Syndrome d'Immuno-déficience Combinée Sévère et autres Déficiences Immune Congénitale
Lymphome Hodgkinien	Ostéoporose
Lymphome Non-Hodgkinien (NHL)	Lymphohistiocytose Hémophagocytaire
Leucémie Lymphoïde Chronique	Syndrome de Hurler et autres Troubles Métaboliques Héréditaires
Certains Désordres Auto-Immuns	

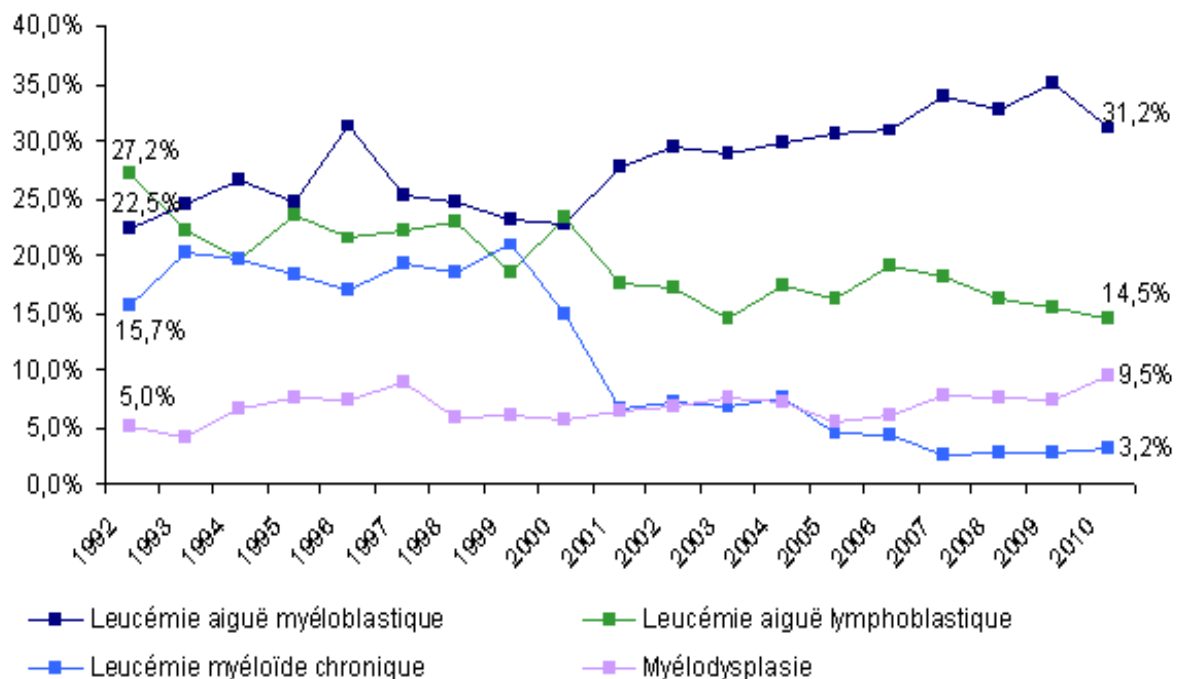


Figure 11 : Evolution de la répartition des indications d'allogreffe en France. (D'après le rapport de l'Agence de la Biomédecine- activité de greffe :

<http://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2010/donnees/cellules/01-greffe/telechargement/FCSHG15a.gif>)

V.A.2. Les sources des CSH des greffons allogéniques

Trois sources de CSH sont aujourd'hui utilisées en France, la moelle osseuse, les cellules souches périphériques (CSP) mobilisées et le sang placentaire (SP) (Le Berre, 2005). Chaque type de greffon possède ses avantages et ses inconvénients, et depuis 1998, le pourcentage de greffons de moelle osseuse utilisés diminue alors que ceux des greffons de CSP mobilisées et de sang placentaire augmentent (Figure 12 et 13).

V.A.2.1- La moelle osseuse

La première greffe de moelle osseuse a été effectuée en 1957 (Thomas et al., 1957) à New - York, et jusqu'en 1990, elle était la seule source de CSH utilisable.

La moelle osseuse est prélevée par ponction au niveau du bassin du donneur sain. Ceci nécessite une anesthésie générale de 2 heures et une hospitalisation de 48 heures. Hormis les risques classiques associés à toute forme d'anesthésie, le don de moelle osseuse est pratiquement sans danger. Chez le donneur mineur, la moelle est la seule source de CSH prélevable autorisée.

V.A.2.2- Les cellules souches du sang périphérique (CSP) mobilisées

Dès 1979, une seconde source de CSH a été explorée, mais la mobilisation des CSH par un facteur de croissance, le G-CSF, vers le sang périphérique était difficile à mettre au point. La première greffe de CSP mobilisées par un facteur de croissance n'a été possible qu'en 1995 (Gürman et al., 1995).

Le donneur doit ainsi subir plusieurs injections de facteurs de croissance et le greffon est prélevé par cytophérèse sur un appareil de tri cellulaire. Depuis 2004, la source principale de greffons allogéniques en France comme dans le monde est le sang périphérique après mobilisation (rapport Agence Biomédecine 2010; Baron et al., 2003).

Actuellement, parallèlement au G-CSF, il existe d'autres facteurs utilisés pour la mobilisation. L'inhibiteur de CXCR-4 (AMD 3100) est le plus efficace de ces facteurs mais aussi le plus coûteux. Il est réservé aux patients dits « mauvais mobilisateurs » (ne répondant pas suffisamment au G-CSF) en association au G-CSF avec ou sans chimiothérapie (Hübel et al., 2011) et bien entendu il est indiqué uniquement pour l'autogreffe.

Il pourrait exister également une autre source (encore théorique) mais non négligeable de CSH, les filtres de déleucocytation. Notre équipe a mis au point une technique permettant d'isoler, même en faibles quantités, des cellules CD34⁺ ayant le caractère souche à partir de ces filtres de déleucocytation (Ivanovic et al., 2006). En réalité, avec les protocoles d'expansion *ex vivo* des greffons hématopoïétiques qui ne cessent de s'améliorer, il est légitime d'espérer que ces filtres, aujourd'hui considérés comme « déchets biologiques » soient transformés en une source importante et peu onéreuse de greffon hématopoïétique.

V.A.2.3- Le sang placentaire (SP)

La greffe du sang placentaire (SP) porte son nom du fait qu'initialement toute l'unité du SP qui était entièrement transfusée, ce qui n'est plus le cas.

Historiquement, en 1974, il a été noté la première preuve de l'existence des cellules primitives dans le SP démontré par Knudtzon (Knudtzon, 1974).

Ensuite, en 1972, Ende M, après des années d'essais sans réussite, a réalisé avec succès une greffe issue du SP chez un adolescent à partir de plusieurs donneurs (plusieurs unités de sang de cordons ombilicaux) (Ende and End, 1972).

En France, la première greffe de SP a été réalisée en 1988 par le Pr Eliane Gluckman (Gluckman et al., 1989). Depuis, ces pratiques ne cessent de s'accroître et de se développer en France avec l'installation du Réseau Français de Sang Placentaire (RFSP) qui représente un réseau d'établissements publics de conservation de SP. En 2011, le nombre de ces banques en France a encore augmenté, réparties régulièrement sur le territoire. L'Agence de la Biomédecine prévoit d'atteindre l'objectif de 30 000 unités stockées en 2013.

L'importance du SP prend son ampleur du fait qu'environ 30% des patients ne trouvent pas de donneurs compatibles (ces probabilités varient selon l'ethnie du patient) (Confer, 1997).

Enfin, en ces deux dernières années, la proportion des allogreffes de SP se stabilise après une période de forte croissance entre 2003 et 2008 (Figure 12 et 13). En effet, le recours au SP reste non prioritaire et seulement en cas d'absence de : 1) donneur apparenté et 2) donneur adulte volontaire non apparenté (DVNA) (fichiers internationaux). Cependant, la recherche clinique dans le domaine des greffes de SP est extrêmement active que ce soit dans le groupe Eurocord ou

dans les groups internationaux, montrant que de nouvelles indications pour ce type de greffes sont en cours d'émergence.

V.A.2.3.1- Intérêt du sang placentaire

- Possède des CSH avec une capacité proliférative plus importante (considérées comme « immatures » en comparaison avec les CSH d'adulte),
- Allogreffe avec possibilité de 2 à 3 disparités HLA sans GVHd sérieuse (Locatelli et al., 1999; Rocha et al., 2004; Laughlin et al., 2004) ce qui signifie une probabilité supérieure de trouver un « donneur »,
- Source disponible « à la demande » à la différence du don volontaire pour lequel l'organisation du prélèvement demande 3 à 4 semaines en moyenne,
- Moins d'infections transmissibles,
- Seule solution pour un receveur sans donneur HLA-identique (fratrie ou non apparenté) (30% des receveurs),
- Pas de danger pour la mère ou pour le nouveau-né.

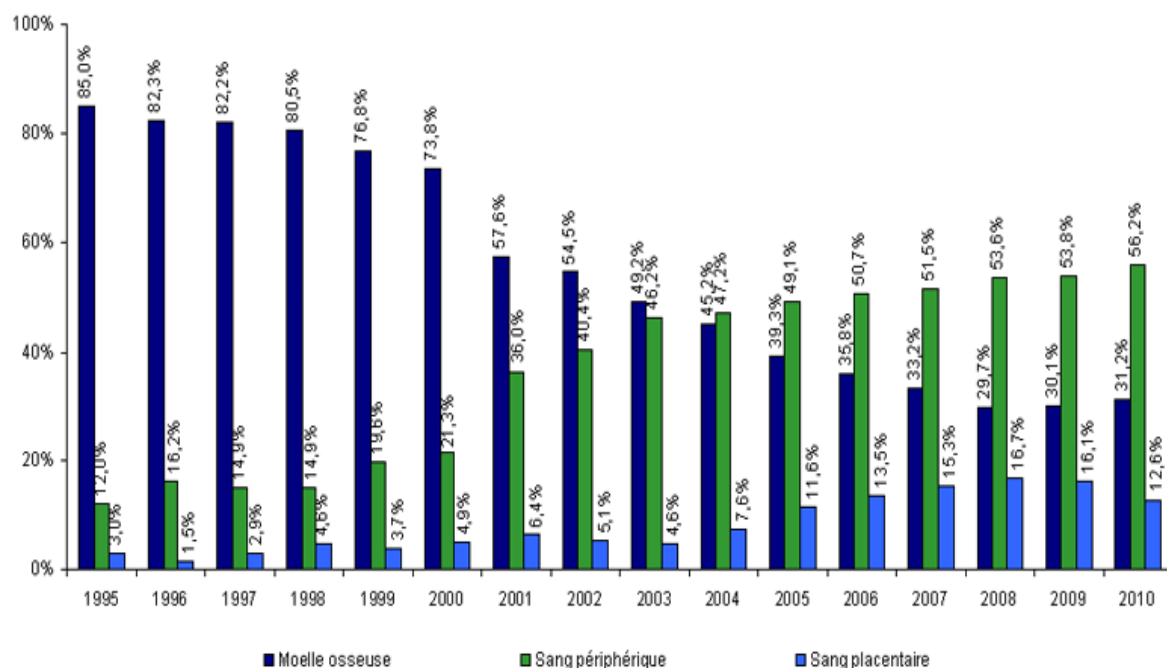


Figure 12 : Evolution de la répartition des sources de greffon des CSH allogéniques en France entre 1995 au 2010. (D'après le rapport de l'Agence de la Biomédecine- activité de greffe :

<http://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2010/donnees/cellules/01-greffe/synthese.htm#figCSHG34>).

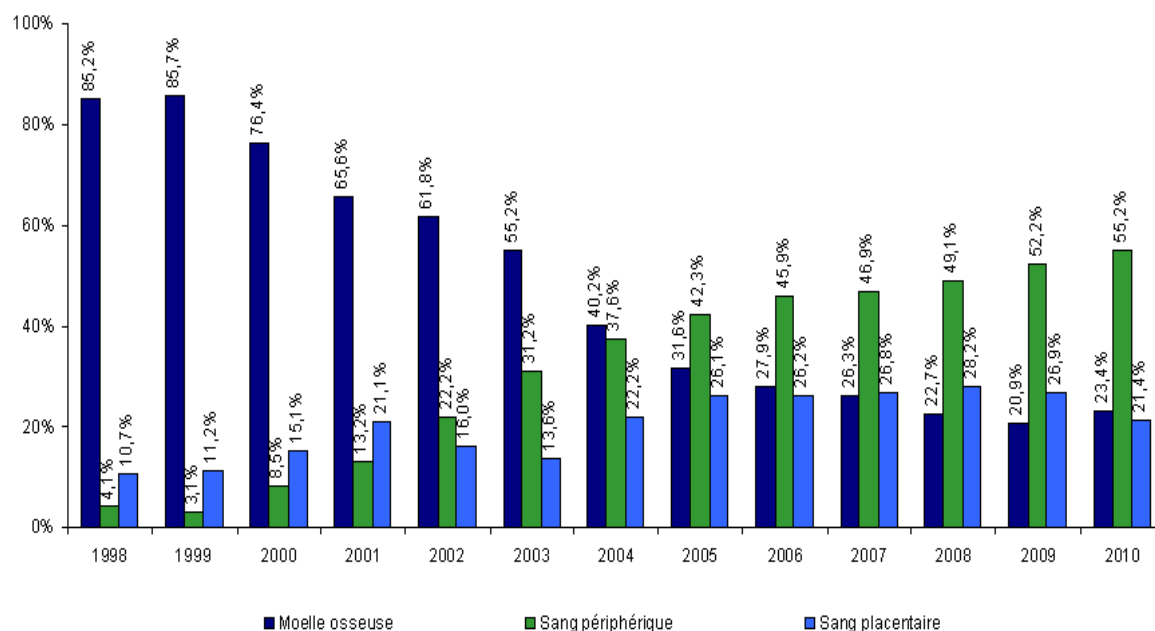


Figure 13 : Evolution de la répartition des sources de greffon des CSH allogéniques non-apparentés en France entre 1995 au 2010. (D'après le rapport de l'Agence de la Biomédecine- activité de greffe :

<http://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2010/donnees/cellules/01-greffe/synthese.htm#figCSHG34>).

V.A.2.3.2- Problématique de la greffe du sang placentaire

Le SP représente une source supplémentaire très prometteuse de CSH/PH. La primitivité et la capacité de prolifération et d'expansion plus importante de ces cellules par rapport à celles de la moelle osseuse ont fait rêver le monde de l'élixir de jeunesse !

La problématique principale avec le SP est le nombre restreint de cellules mononuclées (environ 1,1 milliard cellules/unité, $2,3 \times 10^7$ /kg de poids (Rocha et al., 2004; Laughlin et al., 2004) et de cellules CD34⁺ (3×10^5 CD34⁺ cellules/kg) présentes dans chaque unité (Gluckman et al., 1997; Locatelli et al., 1999), même si la proportion de cellules CD34⁺ dans le SP est supérieure ou proche de celui dans la moelle osseuse (0.4 à 2.1% des cellules mononuclées) (Sutherland et al., 1994; Reisbach et al., 1993). Cette pauvreté conduit, en cas de non conformité, au rejet ou à une durée de cytopénie post-greffe assez prolongée (26 jours pour les neutrophiles et 84 jours pour les plaquettes) (Long et al., 2003).

Il faut également savoir que même avec un nombre suffisant de cellules CD34⁺ greffées (dans les normes), la reconstitution hématopoïétique après la greffe SP est plus lente qu'avec un greffon provenant d'un donneur adulte (Kurtzberg et al., 2008).

C'est pour ces raisons qu'initialement, la greffe de SP était réservée aux enfants et aux adultes de petits poids (en générale, un poids inférieur à 45 kg) (Gluckman et al., 1997; Locatelli et al., 1999).

Afin de franchir l'obstacle de pauvreté des unités de SP en CSH (due au faible volume des unités prélevées), il a été proposé d'injecter simultanément plusieurs unités au receveur adulte en fonction de ses besoins (Barker et al., 2005; Fernandez et al., 2001). Cette avancée s'est avérée suffisante et a conduit à une augmentation exponentielle de l'utilisation du SP depuis plusieurs années après l'adoption de cette procédure.

Toutefois, le recours à l'expansion *ex vivo* de CSH/PH de greffons placentaires demeurerait rationnel, voire indispensable. En effet, la greffe de plusieurs USP simultanément n'a pas permis d'éviter des périodes d'aplasie post-greffe prolongées (Kobari et al., 2000) et de plus, elle s'accompagnait d'une prévalence élevée de GVHD (MacMillan et al., 2009). De plus le coût de cette procédure demeure élevé.

Il faut enfin souligner une autre approche permettant de favoriser la prise de greffe, il s'agit de l'administration directe intraosseuse des unités de SP. Cette méthode qui a fait l'objet de

plusieurs essais cliniques prometteurs a pour but d'éviter la perte systémique de greffon tout en ouvrant la possibilité d'utiliser également les unités pauvres (Frassoni et al., 2010). Elle permet d'une part de stimuler la capacité de *homing* des CSH/PH et d'autre part de réduire l'intensité du conditionnement ainsi que les complications post-greffes notamment la GVHD (Petropoulou and Rocha, 2011 ; Ikehara S, 2005).

V.B. Expansion *ex vivo* de greffons du sang placentaire

L'approche rationnelle de l'expansion *ex vivo* du SP est basée sur deux principes :

- 1- amplifier le nombre de progéniteurs engagés et de cellules matures qui assurent le raccourcissement de durée de l'aplasie post-greffe (ceci concerne l'obstacle de « **l'immaturité** » de CSH placentaires) (Broxmeyer et al., 1992; Kobari et al., 2000),
- 2- maintenir voire augmenter le taux des cellules primitives (SRC, LTC-IC) dans le greffon à fin d'assurer une prise de greffe à long terme et d'éviter l'échec de la greffe (ceci concerne l'obstacle de **pauvreté** en CSH) (Figure 14).

Nous pouvons y'ajouter l'idée que la greffe de SP est privée de cellules immunocompétentes responsables de l'effet GVL dans les autres types de greffe. Ainsi, l'étape d'expansion *ex vivo* pourrait permettre une certaine maturation de ces cellules (présentes dans la fraction CD34⁺) pour qu'elles soient fonctionnelles après l'injection exerçant ainsi (théoriquement) l'action de DLI (*Donor Lymphocyte Infusion*).

Pour montrer concrètement l'intérêt fondamental de cette méthode, il faut noter qu'elle permettrait de diminuer le taux considérable d'unités de SP ne répondant pas aux critères de mise en banque et détruites par l'EFS, pour cause de volumes prélevés insuffisants ou de nombre de cellules CD34⁺ insuffisants et qui représentent, d'après les chiffres de l'EFS (Etablissement Français du Sang) environ 40% et 10% des unités reçues respectivement.

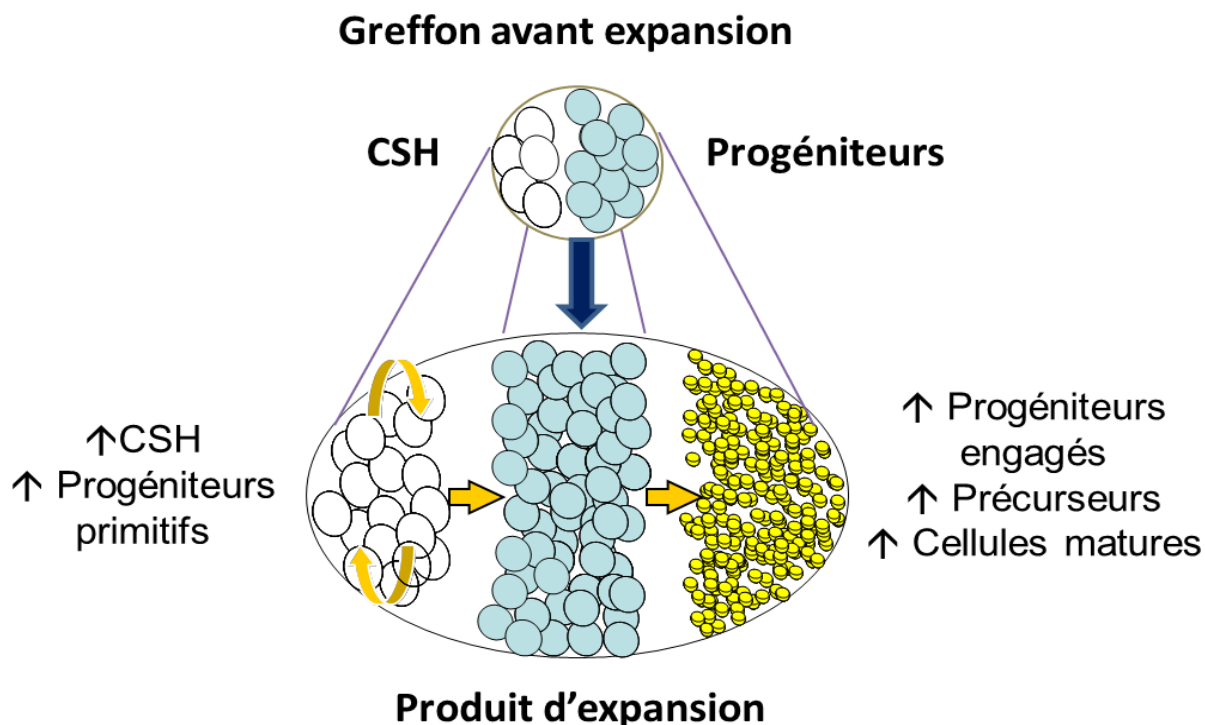


Figure 14 : le principe de l'expansion *ex vivo* de greffon hématopoïétiques. Un nombre restreint en CSH/PH à J0 va être amplifié en culture pour aboutir à une amélioration du taux de progéniteurs engagés tout en préservant les cellules primitives.

L'expansion *ex vivo* du SP peut être effectuée sur soit une partie (l'autre partie constituant la fraction non manipulée), soit sur l'intégralité de l'unité prélevée, à partir de cellules sélectionnées ($CD34^+$ ou $CD133^+$) ou sans sélection (McNiece et al., 2004). L'administration des cellules après expansion est finalement réalisée soit en même temps que la fraction « non manipulée », soit dans un second temps, avec les avantages et les inconvénients de chaque procédure.

Les travaux expérimentaux dédiés à la mise au point de cette procédure d'expansion ont connu des difficultés majeures pour l'expansion *ex vivo* des greffons de SP, alors que l'efficacité de l'expansion en vue d'autogreffes, à partir du sang périphérique notamment, était établie dans de nombreux travaux depuis une dizaine d'années.

Avant de rentrer plus en détails dans les travaux réalisés autour de l'expansion du SP, il convient d'abord de passer brièvement en revue les travaux cliniques qui ont été réalisés sur les greffons de moelle osseuse et de sang périphérique.

V.B.1- Expériences à partir de Greffons médullaires et de CSP

Les premiers essais de greffe de cellules médullaires amplifiées *ex vivo* (Stiff et al., 2000; Engelhardt et al., 2001) chez des patientes atteintes de cancer du sein étaient basés sur les cultures dynamiques dans un milieu supplémenté avec du sérum animal. Ces études n'ont finalement pas mis en évidence d'amélioration quantitative ou qualitative de la greffe.

Dans le domaine des CSP, le premier essai clinique portant sur l'amplification *ex vivo* de ces cellules a été publié en 1995 (Brugger et al., 1995). Les cellules CD34 sélectionnées à partir du produit de cytophérèse ont été cultivées en milieu (RPMI, 2% plasma autologue) en présence de SCF, IL-6, IL-1 β , IL-3 et EPO. Cet essai a permis de montrer que les cellules amplifiées *ex vivo* sont bien fonctionnelles et capables de greffer les patients après un conditionnement myéloablatif ; néanmoins, la cinétique de reconstitution hématopoïétique n'était pas différente par rapport à un groupe témoin historique (greffons sans expansion). Ce résultat a été confirmé par l'essai de Williams SF (Williams et al., 1996). Holyoake et al ont, quant à eux, greffé 4 patients (MM et NHL) avec des greffons CSP amplifiées *ex vivo* (Holyoake et al., 1997). Cependant, l'expansion ne s'est pas révélée satisfaisante et la greffe n'a pas démontré d'effet significatif concernant la durée d'agranulocytose post-greffe.

En 1999, Reiffers et al à Bordeaux (Reiffers et al., 1999) ont obtenu une importante réduction de la durée de l'agranulocytose post-greffe (valeur médiane de 1.5 jour) avec une autogreffe de CSP amplifiées *ex vivo* combinée avec une fraction non manipulée et injectée le lendemain; par conséquent, les risques d'infection et la durée d'hospitalisation des malades ont été également réduits. Cette étude a été également réalisée sur des patients de MM avec des cellules CD34⁺ sélectionnées et cultivées sans sérum pendant dix jours en présence de trois cytokines : SCF, G-CSF et MGDF à fortes doses.

Ces résultats remarquables ont été ensuite confirmés par notre équipe sur une autre série de patients (Boiron et al., 2006). De plus, dans cette étude, une partie des malades a été greffée uniquement avec le produit d'expansion, ce qui n'a pas porté atteinte à l'effet bénéfique observé. Le fait que le produit d'expansion est à l'origine de ce raccourcissement de la période d'agranulocytose post greffe a été finalement confirmé sur une cohorte de 19 patients (Milpied, et al., 2009). Plusieurs équipes ont opté pour cette approche d'expansion pour le traitement de différentes pathologies (McNiece et al., 2000; Prince et al., 2004; Paquette et al., 2002) en

constatant une accélération significative de la reconstitution hématopoïétique post-greffe amenant à une diminution de l'incidence de la fièvre neutropénique, du besoin transfusionnel et de la durée d'hospitalisation.

Ainsi, l'ensemble de ces travaux a donc permis d'envisager avec optimisme une application de cette expansion aux greffons de SP.

V.B.2- Expériences avec Greffon du SP

Les résultats de la première **greffe de cellules de SP** après expansion *ex vivo* ont été publiés en 1999 (Kogler et al., 1999) s'agissant d'un enfant atteint d'une leucémie lymphoïde aiguë avec complications infectieuses. Les cellules CD34⁺ sélectionnées ont été amplifiées *ex vivo*, pendant dix jours, dans un milieu X-vivo supplémenté avec du plasma de SP inactivé en présence de FL, TPO, G-CSF (100 ng/mL chacun). Une expansion très importante des cellules totales, des progéniteurs, des cellules CD34⁺ et LTC-IC a été obtenue. Les auteurs ont trouvé que cette greffe a contribué à une accélération de la reconstitution granulocytaire.

Bien que ce résultat ait été encourageant, d'autant qu'il s'agissait de l'expansion de seulement 1/8 de l'unité de SP, les essais suivant n'ont pas connu une telle réussite.

En effet, dans une tentative de greffe sur deux patients (Pecora et al., 2000) de cellules du SP après expansion d'une petite fraction effectuée dans un milieu contenant du sérum animal pendant 12 jours, l'amplification n'a été que très médiocre et n'a donc pas permis d'améliorer la reconstitution hématopoïétique.

Un autre essai clinique (Fernández et al., 2001) a porté sur la greffe de deux unités de SP simultanément, dont une est amplifiée *ex vivo*. Cette fois encore, cette approche n'a pas permis d'améliorer la reconstitution hématopoïétique. Ceci peut être lié d'une part, à la durée courte de culture (6 jours) et d'autre part, à l'utilisation de forte dose de l'IL-3 (100 ng/mL), conduisant à la différenciation de cellules primitives dans le greffon.

En 2002, une équipe américaine (Shpall et al., 2002) a réalisé l'amplification *ex vivo* sur 50% des cellules CD34⁺ d'une unité de SP pendant dix jours et dans un milieu sans sérum en présence de SCF, G-CSF et MGDF, avant de les injecter aux patients. Bien que le taux d'expansion obtenu fût convenable, cet essai n'a pas montré de bénéfice des cellules SP amplifiées *ex vivo*.

De même, l'essai de Jaroscak et al (Jaroscak et al., 2003) n'a pas montré d'effet additif de la greffe des cellules SP amplifiées dans le système Aastrom Replicell (qui associe une greffe de cellules hématopoïétiques et de cellules stromales). Dans tous les cas, il faut noter que le taux d'expansion était très faible.

Il y a quelques années, les équipes de Nagler et de Shpall (de Lima et al., 2008) ont amplifié *ex vivo* des cellules CD133⁺ sélectionnées à partir d'une petite fraction de SP. L'expansion a été réalisée dans un milieu de nouvelle génération en présence de SCF, FL, IL-6 et TPO, supplémenté avec un chélateur de cuivre TEPA (tétraéthylène-pentamine). En dépit d'une amplification massive à la fin de culture, la greffe chez des patients n'a pas permis d'améliorer la durée de l'aplasie post-allogreffe.

En réalité, le manque de capacité de repeuplement médullaire des cellules hématopoïétiques après expansion *ex vivo* a été déjà observé dans des modèles expérimentaux notamment chez la souris (Guenechea et al., 1999; XU and Reems, 2001) et chez le macaque (Tisdale et al., 1998).

Chez les souris NOD/SCID greffées avec des ces cellules du SP humaines amplifiées *ex vivo*, Guenechea (Guenechea et al., 1999) a constaté un retard de la prise de greffe, alors que, paradoxalement, le chimérisme à long terme est resté similaire à celui des témoins injectés avec des cellules non manipulées. Xu et Reems ont, quant à eux, trouvé que la prise de greffe à long terme est significativement altérée avec le greffon subissant l'expansion (XU and Reems, 2001). L'équipe de John Dick, malgré une expansion massive de cellules placentaires humaines de phénotype immature CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻, n'a pas obtenu une augmentation équivalente des cellules SRC (Dorrell et al., 2000).

Les remarques qui peuvent être tirées notamment de ces études cliniques sont d'abord, la faisabilité et la sûreté de cette approche thérapeutique, mais nous pouvons constater également le manque d'efficacité sur l'accélération de la reconstitution hématopoïétique, qui serait lié à plusieurs facteurs selon chaque étude :

- _ Le taux d'expansion médiocre ;
- _ L'épuisement des populations des cellules capables de générer une reconstitution à court terme à cause des conditions de culture : durée de culture, sérum animal, doses de cytokines ... etc.;

- _ Le décalage d'injection des produits d'expansion entre 8 et 12 jours (Pecora et al., 2000) par rapport à l'injection de la fraction non manipulée ne permettant pas de mettre en valeur le produit d'expansion ;
- _ Seule une fraction du greffon a été amplifiée ;
- _ Enfin le « terrain » dans lequel la greffe est réalisée : l'état du patient, la maladie résiduelle, ... etc, doit également être pris en considération.

V.B.3- Amélioration de l'Expansion *ex vivo* de Greffon du SP

Outre l'échec de l'obtention d'une reconstitution médullaire rapide, le problème majeur de l'expansion des CSH de SP reste la réduction rapide en culture du nombre de cellules souches capables de repeuplement médullaire à long terme. Cela a été confirmé par une corrélation démontrée entre le nombre de cellules SRC capables de greffer les souris et le maintien d'hématopoïèse à long terme chez les babouins greffés (Norol et al., 2002).

Plusieurs méthodes ont été proposées dans le but d'améliorer l'expansion de greffons du SP en visant la modulation des conditions de culture à savoir :

- 1- Composition de milieu de culture : les cocktails de cytokines (Levac et al., 2005), présence ou non de sérum (Ivanovic and Boiron, 2009a) et durée de culture (Douay, 2001).
- 2- Nouvelles molécules qui améliorent l'expansion : l'Endothéline, la sérotonine, l'acide rétinoïque, le PDGF et des antioxydants (De Angeli et al., 2004; Yang et al., 2007);
- 3- Utilisation de bioréacteurs (Koller et al., 1998), de systèmes de culture plus sophistiqués (Feng et al., 2006), et de cultures sous BC-O₂ en sollicitant des systèmes d'incubation cellulaire modulables.
- 4- La thérapie génique a aussi permis certaines améliorations, notamment avec la transduction du gène HOXB4 (Antonchuk et al., 2002) et l'activation de la voie NOTCH (Delaney et al., 2010). Ce travail a permis pour la première fois de diviser par deux la durée de l'aplasie post-greffe après l'injection de deux unités dont une après l'expansion. De plus, les auteurs de cette dernière étude ont démontré que le chimérisme obtenu appartient bien à l'unité de SP amplifiée *ex vivo*.
- 5- L'injection intra-osseuse directe du produit d'expansion de greffon placentaire (Ando et al., 2006).

- 6- Les co-cultures sur cellules stromales, en tant que support de l'hématopoïèse *in vitro*, ont pris leurs places très tôt dans cette « aventure ».

En utilisant notre technologie d'expansion *ex vivo* de cellules CD34⁺ du SP (Duchez et al., 2012), un essai clinique en cours (Milpied et al., 2011) montre un raccourcissement important d'agranulocytose après la transplantation des cellules d'une seule unité de sang placentaire amplifiées *ex-vivo*. Ceci a été rendu possible grâce à plusieurs facteurs : un milieu de culture particulier sans sérum complété par des antioxydants (Ivanovic et al, Transfusion 2006), un cocktail de cytokines contenant de SCF et MGDF qui peuvent stimuler le facteur HIF-1 α ce qui agit positivement sur le maintien des cellules primitives (Ivanovic et al., 2011).

V.B.4- Rôle du support Stromal dans l'Expansion *ex vivo* de Greffon du SP

La notion de support de l'hématopoïèse *ex vivo* a été inaugurée par les travaux de Friedenstein et Dexter. Dexter a démontré l'effet bénéfique de ces cellules stromales dans le maintien à long terme des progéniteurs primitifs (Dexter et al., 1977a). Plus tard, Schofield (Schofield, 1978) a suggéré qu'en gardant un contact physique avec un stroma approprié consistant en des cellules stromales associées à leur matrice extracellulaire, les CSH maintiennent leur caractère souche.

Lorsque les cellules souches sont enlevées de leurs niches et développées *ex vivo*, elles perdent le soutien et l'orientation prévus par le micro-environnement, et ne reçoivent que les signaux des cytokines et des facteurs de croissance exogènes contenus dans les milieux de culture. Ainsi, ce processus conduit préférentiellement à la différenciation au détriment de l'auto-renouvellement. Ce phénomène pourrait expliquer partiellement les résultats médiocres qui ont été obtenus avec les greffes des CSH/PH après expansion *ex vivo*.

Partant de cette idée, il était cohérent d'essayer de créer un équivalent de ce micro-environnement *in vitro* et d'ailleurs, de revenir aux premiers travaux qui ont été réalisés dans le domaine de culture de CSH/PH *ex vivo* à savoir, les travaux de Dexter TM et Schofield. Cela constitue donc un retour en arrière pour avancer !

Dans la plupart de travaux expérimentaux, les premiers stromas utilisés sont des lignées stromales murines qui ont prouvé une certaine capacité à supporter l'expansion non seulement

des CSH/PH murines, mais aussi les humaines. C'est le cas notamment des lignées M2-10B4, MS-5 (Issaad et al., 1993), OP9, HESS-5, SPY3-2, AFT024 et FBMD-1 (Breems et al., 1998).

Les travaux de l'équipe de Ronald Hoffman ont porté sur une lignée stromale porcine, les CE Microvasculaires Porcines (PMVEC). Cette lignée a permis une amélioration du produit d'expansion de SP en termes de progéniteurs et de cellules SRC (Rosler et al., 2000).

Toutefois, du fait des nombreux obstacles éthiques et immunologiques pour l'utilisation des cellules animales chez l'Homme, il est évident qu'elles ne restent exploitables qu'en tant que modèle expérimental. L'utilisation de stroma humain serait donc plus appropriée.

De ce point de vue, en se basant sur la complexité cellulaire de la couche stromale utilisée dans le modèle de Dexter TM, plusieurs équipes en ont sélectionné certaines sous-populations à fin de les utiliser comme support de l'expansion des CSH/PH *ex vivo*. Les principales cellules exploitées sont : les ostéoblastes, les CE et les cellules stromales mésenchymateuses (CSM).

Un stroma de CE établi à partir des cellules CD34⁺ placentaires a permis de stimuler l'expansion des cellules CD34⁺ placentaires et d'améliorer leur viabilité de façon plus efficace que la culture sans stroma (Yoo et al., 2003). Il a été également montré que les CE de la veine ombilicale humaines (HUVEC) peuvent améliorer l'expansion des cellules CD34⁺ placentaires avec un maintien plus important des LTC-IC toujours en comparaison à la culture sans stroma (Yildirim et al., 2005).

Bien que les travaux sur l'utilisation des ostéoblastes dans la modulation de l'expansion *ex vivo* de SP soient rares, ces cellules ont montré un effet très positif dans ce domaine à l'image de l'étude de Mishima et al (Mishima et al., 2010).

Etant donné l'implication des ostéoblastes dans la niche hématopoïétique, l'idéal serait de les exploiter *ex vivo* afin d'extrapoler les interactions régulant l'hématopoïèse *in vivo*. Toutefois, la relative complexité de manipulation des ostéoblastes *in vitro*, ainsi que le manque de disponibilité face aux difficultés d'obtention, contribuent fortement à diminuer leurs chances de devenir un outil clinique dans ce domaine.

V.C. Rôle de Cellules Stromales Mésenchymateuses dans l'Expansion *ex vivo* de Greffons hématopoïétiques

V.C.1 - Rôle de CSM dans l'Expansion *ex vivo* de Greffons médullaires et CSP

Il a été démontré par plusieurs études qu'en cultivant des CSP CD34⁺ avec un stroma humain, la qualité du greffon obtenu après l'expansion est améliorée par rapport à une culture sans stroma où l'expansion demeure très modérée (Li N et al., 2007; Drouet et al., 2005; daSilva et al., 2005; Gonçalves et al., 2006).

L'équipe de Almeida-Porada, en montrant l'effet bénéfique des CSM sur l'expansion de cellules CD34⁺ médullaires y compris en milieu sans sérum, a constaté que les CSM allogéniques sont plus efficaces que des cellules autologues. Ce point est primordial pour amplifier et faciliter l'exploitation de CSM dans ce domaine (Gonçalves et al., 2006; daSilva et al., 2005).

Les CSP CD133⁺ qui sont, selon plusieurs auteurs, plus primitives que les cellules identifiées par le marqueur CD34, peuvent être amplifiées idéalement en co-culture (Kawano et al., 2006; Alakel et al., 2009). La co-culture avec un stroma humain immortalisé a permis d'obtenir une expansion comparable même à celle des cellules CD34⁺ placentaires, malgré un nombre de progéniteurs total qui reste inférieur (Kawano et al., 2006).

Dans une étude française sur un modèle de babouin ayant reçu des CSP CD34⁺ humaines irradiées puis cocultivées et perfusées avec des CSM (Drouet et al., 2005), les auteurs ont montré le bénéfice des CSM à la fois sur la survie des cellules CD34⁺ *in vitro* et sur la reconstitution hématopoïétique *in vivo* des babouins irradiés létalement. Les auteurs suggèrent que cet effet peut être expliqué par la diminution de l'apoptose et l'effet positif synergique des cytokines exogènes avec les CSM, ajoutant aussi la réparation rapide de la niche médullaire lésée (suite à l'irradiation) par les CSM administrées. Ce type d'approche pourrait éventuellement être envisagé pour améliorer la prise en charge des malades de l'irradiation accidentelle.

Un autre essai clinique a reposé sur l'expansion d'une aspiration de moelle osseuse dans une culture dynamique avec des cellules stromales. Au bout de 12 jours de culture, le produit de l'expansion, y compris les cellules stromales, a été perfusé conjointement avec des cellules CD34⁺ CSP mobilisées (non amplifiées) (Pecora et al., 2001). Les auteurs constatent que, malgré la pauvreté du matériel de départ et malgré une expansion relativement faible, le stroma a finalement amélioré la prise de greffe *in vivo* et accéléré la reconstitution plaquettaire. Cette

stimulation de la mégacaryopoïèse a été prouvée dans plusieurs travaux *in vitro* où on a constaté que les CSM rentrent en interaction directe avec des progéniteurs mégacaryocytaires (exprimant notamment le CD41⁺) (Cheng et al., 2000a; Huang et al., 2007).

V.C.1 - Rôle de CSM dans l'Expansion *ex vivo* de Greffons SP

Il faut noter que la culture *ex vivo* représente un système d'une complexité extraordinaire et la variation d'un seul des nombreux composants de culture suffit pour obtenir des résultats complètement différents, ce qui est parfaitement établi avec l'expansion de SP. La participation des CSM aux protocoles d'expansion de SP a sûrement encore augmenté cette complexité, ce qui peut probablement expliquer le retard de son application sur le SP en comparaison aux autres greffons hématopoïétiques.

D'abord, il a été observé que la co-culture de CSM avec des cellules de SP pourrait reproduire, même partiellement, les interactions liant les CSH au micro-environnement médullaire (Etheridge et al., 2004; Kadereit et al., 2002; Zhang et al., 2003). En effet, des foyers d'hématopoïèse ont été mis en évidence pendant la co-culture, montrant ainsi qu'il existe réellement des interactions directes CSH (placentaire)/CSM et que les CSM n'agissent pas simplement en tant que couche nourricière (McNiece et al., 2004).

Puis, les CSM d'origine médullaire ont prouvé dans nombreuses études une capacité indéniable à soutenir l'expansion *ex vivo* des greffons placentaires destinés à reconstituer une hématopoïèse *in vivo* (Magin et al., 2009; McNiece et al., 2004; Robinson et al., 2006; Fei et al., 2007; Yamaguchi et al., 2001; 2002a; 2002b; Van Overstraeten- Schlögel et al., 2006).

Les expériences et les connaissances établies suite à toutes ces études ont permis à Robinson de développer une étude à l'échelle clinique (Robinson et al., 2006) et puis la valider pour effectuer la seule étude clinique (à notre connaissance) dans l'expansion de greffons placentaire en co-culture avec des CSM médullaires (Robinson et al., 2011). Dans ce travail, l'expansion concernait des unités SP pauvres en CMN et co-cultivées avec des CSM médullaires (allogéniques ou originaires des parents) en présence de 100 ng/mL de SCF, FL, G-CSF et de TPO pendant 14 jours en 2 étapes. Après un traitement myéloablatif, la greffe a été réalisée avec une unité décongelée non manipulée perfusée simultanément avec celle amplifiée, soit au total 9.5×10^7 MNC/kg et 8.2×10^5 CD34⁺/kg. Les résultats se sont avérés encourageants d'autant plus

que les patients récupèrent de la neutropénie et la thrombopénie après 14,5 jours et 30 jours (valeur médiane) respectivement (Robinson et al., 2011).

Par ailleurs, il a été établi que les CSM originaires du placenta et du SP ont des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles au moins comparables à celles d'origine médullaire et sont capables d'induire une expansion *ex vivo* importante de cellules CD34⁺ placentaires (Zhang et al., 2004; Jang et al., 2006; Huang et al., 2007; Wang et al., 2004). Pour Jang et al, les CSM placentaires se sont même avérées plus efficaces par rapport aux CSM médullaires dépendant, a priori, de leur primitivité et de leur sécrétion constitutive du GM-CSF (Jang et al., 2006).

Le cordon ombilical (gelée de Wharton) a représenté une nouvelle source accessible et sans risque (déchet post-partum!), riche en CSM possédant une capacité importante de soutien de l'hématopoïèse *ex vivo* (Magin et al., 2008; Bakhshi et al., 2008). En effet, ces CSM ont montré leur aptitude à stimuler l'expansion de cellules CD34⁺ du SP de façon plus importante que celle de BMMSC ou que les HUVEC. Les auteurs ont aussi noté l'intérêt de l'utilisation d'un milieu sans sérum et de maintenir un taux stable de glutamine dans le milieu de culture qui doit-être changé régulièrement (Magin et al., 2008). Une équipe japonaise (Hayashi et al., 2009) a montré qu'en cultivant les cellules CD34⁺ placentaires irradiées, ayant donc une capacité d'expansion inférieure à celle des cellules CD34⁺ « normales », avec les CSM originaires du cordon ombilical, leur potentiel clonogénique augmente significativement par rapport à celles cultivées dans un milieu sans stroma. Pour Wagner W, ces CSM du cordon ont une capacité de soutien de l'hématopoïèse équivalente à celle des CSM médullaires, permettant de préserver la primitivité des cellules hématopoïétiques (Wagner et al., 2007b). Par ailleurs, il a observé que les CSM de tissus adipeux induisent plutôt la différenciation au détriment de l'auto-renouvellement.

Récemment, Mizokami et al ont isolé des CSM à partir de la membrane amniotique et ont montré leur potentiel d'induire l'amplification *ex vivo* de cellules hématopoïétiques placentaires (Mizokami et al., 2009).

Etant donné la perte cellulaire majeure au cours des différentes procédures de sélection ayant pour but d'enrichir le greffon en cellules primitives, plusieurs équipes ont co-cultivé les CMN ou même l'unité placentaire totale avec les CSM (McNiece et al., 2004; Robinson et al., 2006). Partant de la même idée, Robinson SN et al ont développé une culture en deux phases et ont

trouvé que l'expansion des cellules du SP non manipulées en co-culture avec les CSM est largement supérieure à celle des cellules CD133⁺ en culture liquide sans stroma.

Certaines équipes ont utilisé les CSM médullaires après irradiation avant d'initier la co-culture afin d'inhiber leur prolifération (Yamaguchi et al., 2002b; Madkaikar et al., 2007). Madkaikar et al. ont montré que ce stroma est apte à stimuler l'expansion des cellules CD34⁺ du SP, ce qui se traduit par une amplification des cellules totales et des cellules primitives plus importante que celle avec la culture liquide sans stroma ; ils ont par ailleurs noté l'absence d'éventuelle anomalie au niveau des CSM irradiées (Madkaikar et al., 2007).

La problématique liée à l'utilisation des produits d'origine animale (lignées stromales, sérum de cheval, sérum de veau fœtal.. etc) a conduit un nombre croissant d'équipes à utiliser des milieux dépourvus du sérum (Fei et al., 2007; Yao et al., 2004). Dans ce sens, da Silva et al ont observé que le milieu sans sérum ne modifie pas la qualité de l'expansion de greffons de cellules CD34⁺ placentaires ou médullaires après une co-culture avec les CSM humaines ; au contraire, cette culture sans sérum a induit une expansion très importante des cellules d'intérêt (da Silva et al., 2005; Gonçalves et al., 2006).

Les milieux sans sérum pouvant contenir des quantités non négligeables des protéines animales, certains auteurs ont donc eu recours à des produits purement humains tels que le milieu placentaire conditionné (Chivu et al., 2004) ou le sérum humain (Yamaguchi M et al., 2002)). En effet, après avoir travaillé sur des lignées murines avec des sérums animaux, Yamaguchi a effectué l'expansion de cellules CD34⁺ placentaires sur des cellules stromales médullaires humaines en utilisant cette fois un milieu contenant du sérum AB humain. Ce sérum humain peut être originaire du donneur comme du receveur. L'expansion s'est avérée aussi efficace avec le sérum humain qu'avec le sérum animal et a permis l'obtention d'un taux de cellules primitives SRC assez important (Yamaguchi et al., 2002a; 2002b). Dans cette étude, un effet synergique du cocktail de cytokines utilisé a été observé.

Finalement, du fait de la contribution des CSM dans la réorganisation du micro-environnement médullaire lésé suite à certains traitements (in 't Anker et al., 2003; Noort et al., 2002), il apparaît rationnel et bénéfique sur le plan clinique de greffer tout le contenu du produit d'expansion y compris les CSM après une co-culture notamment chez les sujets ayant subis une chimiothérapie. De plus, les propriétés immunomodulatrices des CSM peuvent également avoir des retentissements positifs sur la greffe (Le Blanc et al., 2003; 2004; Rasmusson et al., 2003).

Tableau 4: Expansion de greffons issus du sang placentaire sur un support stromal. Liste récapitulative de certaines études d'expansion ex vivo de cellules issues du sang placentaire (avec ou sans sélection préalable) développée sur un support stromal. Seuls les résultats concernant les conditions de co-culture sont mentionnés.

Références	Matériel de départ de greffon du SP	Origine de stroma	Cytokines	Milieu	Durée de culture (Jours)	Taux d'expansion			Remarques
						CMN	CFU	CD34 ⁺	
Robinson et al., 2011	USP total (sans sélection)	CSM intra-familiales ou allogènes (angioloblastes)	G-CSF, SCF, FLT-3L, TPO	Milieu spécial (Angen) ?	14 J (en 2 étapes 7J + 7J)	12-fois (range, 1-13)		12-fois (range, 1-27)	expansion en co-culture → paucycytémie post-greffe raccourcie
						14-fois (range 1-30)		40-fois (range 4-140)	
Walenda et al., 2011	USP CD34 ⁺	CSM de MO	TPO, SCF, FGF-1	Sans serum	7 jours		8	35 fois	Expansion LTC-IC (8 fois) Amélioration de SRC
Magu et al., 2007	USP CD34 ⁺	CSM de MO HUVEC	TPO, FL3, SCF, IL-3	Sans serum	7 jour	20-40			++Consommation de glutamine ++ Expansion de CAFc
da Silva et al., 2003	CD34 ⁺ de USP et MO	Serum de MO	FGF-2, FL3, SCF, LIF	Sans serum	14 à 21 J	UCB: 241 J26 MO: 260 à J18	USP: 137fois à J24 MO: 38 à J14	USP: 13 à J21 - 35 à J26 MO: 7 à J14	Amélioration de CFC
Rodier et al., 2000	USP CD34 ⁺	Porcine Microfascicul Endothelial Cell	FL3, SCF, IL6, GM-CSF	DMDM FBS10%	7, 14 et 21 J			14, 93 et 96 fois	++SRC en Co-culture ++ CMN, CD34+ en Co-culture
Madhakar et al., 2007	USP	Seroma humain	SCF, GM-CSF, IL3	Placental Conditioning Medium (PCM)	j 7, 12, 14	15.1 J7, 21 J12	20.4 J12	16.25 J7, 21.4 J12	
Fei et al., 2007	USP CD34 ⁺	CSM de MO	TPO, FL3 SCF, G-CSF		1 à 2 semaines	Augmentation	Augmentation	Augmentation	Prise de xenogreffe améliorée
Jung et al., 2006	USP CD34 ⁺	CSM de USP ou de MO	+/- SCF, IL6, FL3, TPO	DMDM FBS 10%	4, 7, 10, 14 J	Augmentation à J7	Augmentation à J7	Augmentation à J7	
Yildirim et al., 2005	USP CD34 ⁺	HUVEC autologues	1- SCF, VEGF, IL1, 2- SCF, FL3, IL6, VEGF, IL1	Sans serum	10 J (en 2 étapes 3J + 7J)	1- 55 2- 77	1- 19 2- 32	1- 15 2- 23	++ de LTC-IC et de CAFc en co-culture
Robinson et al., 2006	USP total (sans sélection)	CSM MO	G-CSF, SCF, TPO (MGDF)	DMDM FBS10% irradié	14 J (en 2 étapes 7J + 7J)		202 fois	20 fois	CAFc améliorés
McNiece et al., 2004	USP total (sans sélection)	CSM MO	G-CSF, SCF, MGDF	DMDM FBS10%	14 J	10 à 20 fois	7 à 18 fois	16 à 37 fois	2 à 5 fois de progeniteurs primitifs
Zhang et al., 2004	USP CD34 ⁺	CSM USP					36 fois	14 fois	++ LTC-IC en co-culture
Yamaguchi et al., 2002b	USP CD34 ⁺	CSM MO	SCF, TPO, FL	serum AB humain	3 semaines			250 foi	Expansion améliorée en présence de serum humain
Kadareit et al., 2002	USP CD34+/CD38-	CSM	IL-3, IL-6, FLT-3, SCF, G-CSF, EPO	10% serum	12 jours	7,7 fois		12 fois	Expansion de LTC-IC

Les références en gras représentent les travaux effectués avec autres supports que les CSM humaines. USP : Unité du Sang Placentaire ; MO : Moelle osseuse ; HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells ; WJC : Wharton's jelly cells.

OBJECTIFS

La logique de l'expansion *ex vivo* du greffon hématopoïétique est basée sur l'idée que le succès de la prise de greffe repose sur son efficacité à long terme et sur le raccourcissement maximum de la durée de l'aplasie post-greffe qui sont liées respectivement, au nombre de cellules primitives et de progéniteurs engagés présents dans le greffon après expansion. Ainsi, les conditions optimales de l'expansion sont celles qui assurent la production d'une quantité optimale de progéniteurs et de cellules matures tout en maintenant le compartiment des CSH afin de ne pas affecter l'efficacité de la prise de greffe à long terme.

En réalité, le maintien des cellules hématopoïétiques primitives pendant l'expansion en culture liquide en vue de greffe est assuré par une culture à de BC-O₂ (1 - 5% d'O₂) qui protégeraient les CSH ainsi que les CSM du stress oxydatif. Ces BC-O₂ induiraient la prolifération, la sécrétion cytokinique et probablement la différenciation de CSM vers les lignées cellulaires qui sont également bénéfiques pour les CSH. Comme la **co-culture avec CSM** module convenablement l'expansion des CSH/PH stimulée par les cytokines exogènes, nous avons émis l'hypothèse que la co-culture de CSM avec les CSH/PH à de BC-O₂, qui représente un rapprochement des conditions physiologiques, permettrait de mettre ces phénomènes biologiques en synergie et devrait considérablement améliorer la quantité et la qualité des cellules hématopoïétiques obtenues à l'issue de l'expansion (Figure 15).

L'**objectif principal** de ce travail consiste donc à vérifier l'hypothèse selon laquelle les conditions (CSM et BC-O₂) que réunit notre modèle expérimental d'expansion *ex vivo* des greffons hématopoïétiques sont optimales pour atteindre notre but final à savoir, le développement d'un greffon riche à la fois en **cellules primitives (SRC, Pré-CFC)** assurant la prise de greffe à long terme et en **progénitrices engagées** contribuant à raccourcir la période de cytopénie post-greffe.

Par ailleurs, lors de cette étude nous aborderons également (objectifs secondaires) :

- (i) d'une part, l'étude du rôle de l'interleukine IL-3 à faible dose (0,5 ng/μL) dans la qualité de l'expansion et notamment dans le maintien de la primitivité cellulaire ;
- (ii) d'autre part, l'étude préliminaires des mécanismes impliqués dans « le dialogue » CSH ⇔ CSM aux BC-O₂.

D'autres informations importantes peuvent être tirées suite à cette étude. D'une part, s'assurer que notre recours au milieu sans sérum, qui répond en effet aux exigences sanitaires, n'influe pas

négativement sur la culture. D'autre part, conclure quant à l'efficacité du cocktail de cytokines de notre culture en association avec les autres conditions.

Ce travail pourrait en effet contribuer à améliorer les essais expérimentaux, pré-cliniques et cliniques remarquables dans ce domaine (Cheng et al., 2000a; Yamaguchi et al., 2001; 2002a; McNiece et al., 2004; Robinson et al., 2011).

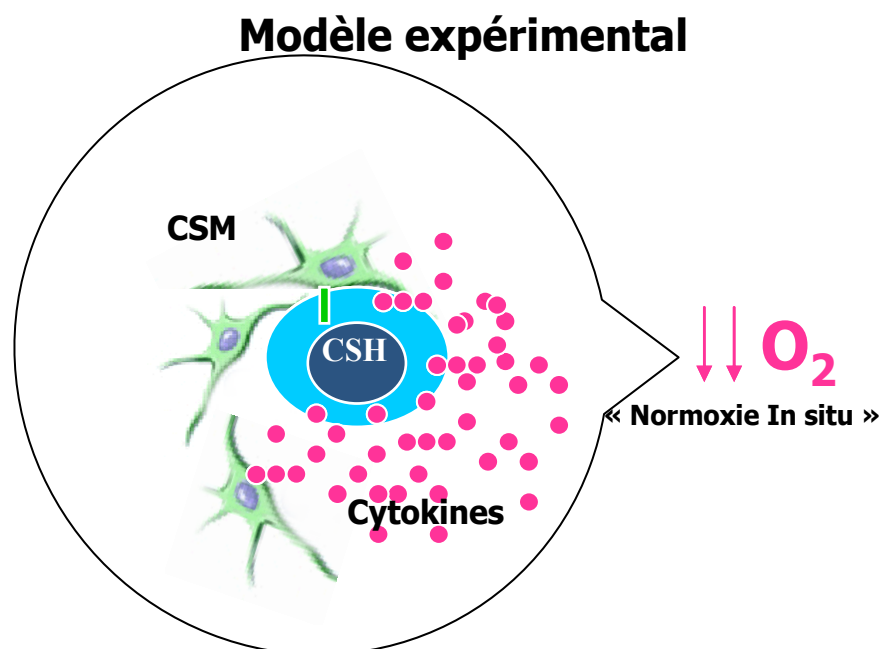


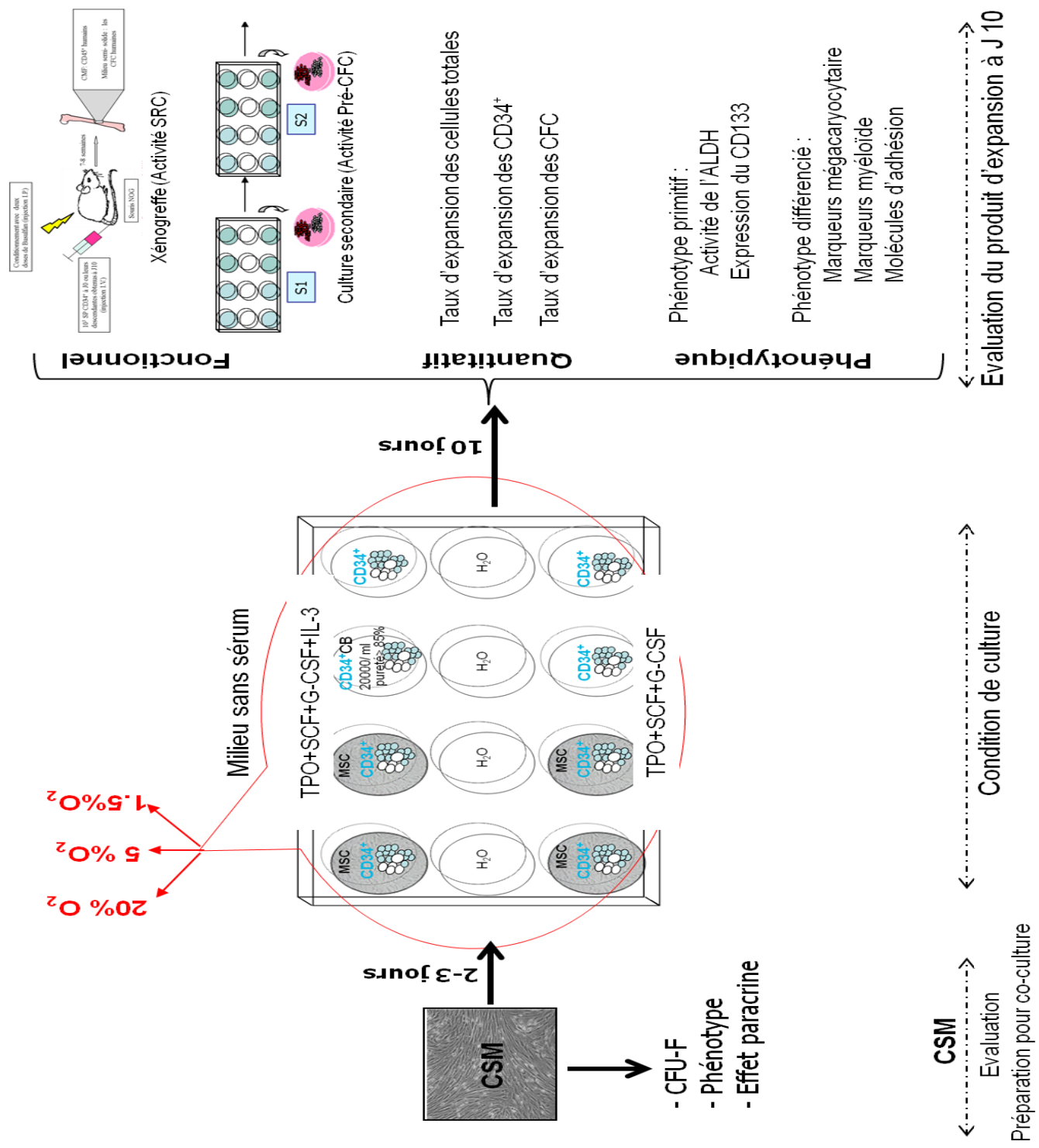
Figure 15 : Illustration du modèle expérimental.

L'expansion *ex vivo* de CSH/PH est induite sous l'action de cytokines exogènes, les CSM et les BC-O₂ (normoxie *in situ*) ont pour effet de réguler et équilibrer cette stimulation excessive dont les « victimes » principales sont les cellules primitives. Ceci permet donc de préserver l'ensemble des éléments de greffons.

MATERIELS ET METHODES

I. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Le protocole expérimental est présenté dans le schéma suivant :



II. Préparation des cellules et culture cellulaire

II.A. Unité de sang placentaire

Les échantillons de sang placentaire SP (source de nos cellules CD34⁺) ont été collectés (après le consentement éclairé des mères) dans des poches stériles contenant des anticoagulants (citrate, phosphate et dextrose (CPD)) et livrés à l'unité de thérapie cellulaire de l'Etablissement Français du Sang Aquitaine-Limousin, site de Bordeaux.

Seuls les échantillons ne répondant pas aux critères de mise en banque (poids < 100 g ou nombre de cellules CD34⁺ < 2×10⁶) ont été utilisés dans nos expériences. Les échantillons sont traités dans un délai ≤ 48 heures.

II.A.1. Isolement des cellules mononuclées (CMN)

L'échantillon de SP a tout d'abord été dilué au demi avec du tampon PBS 10% ACDA (citrate de sodium, acide citrique et glucose anhydre) contenant 2 mM d'EDTA afin d'éviter l'agrégation des plaquettes. Puis, l'ensemble a été ajouté sur de l'HES (Hydroxyéthyl amidon) pour limiter l'agrégation des érythrocytes. Finalement, du Ficoll (d = 1077 g/l, Lymphoprep Nyegaard, Oslo, Norvège) a été déposé à la pipette au fond du tube, sous le sang dilué. Après centrifugation de 25 minutes (dont 5 minutes à 400 t/m permettant la formation de l'anneau de CMN à la surface de Ficoll et 20 minutes à 2400 t/m permettant aux érythrocytes et aux granulocytes de se déposer au fond du tube), les anneaux blancs formés à la surface du ficoll et contenant les CMN ont été recueillis. Celles-ci ont été ensuite lavées deux fois avec du tampon de sélection composé de PBS 0,5% albumine et d'EDTA (2 mM).

II.A.2. Purification des cellules CD34⁺

La fraction CD34⁺ a été isolée par sélection positive immunomagnétique avec le passage sur colonnes de sélection (système MiniMACS) en une ou deux étapes (kit direct ou indirect respectivement, Miltenyi Biotec, Gladbach, Allemagne et Miltenyi Biotec GmbH, Paris, respectivement) selon les instructions du fabricant.

La sélection indirecte comporte 2 étapes d'incubation des cellules :

(a) une première incubation avec (i) une solution « *Blocking reagent* » qui a pour fonction de saturer les récepteurs au fragment Fc des Immunoglobulines (Ig) et ainsi d'exclure les fixations non spécifiques des anticorps anti-CD34, et (ii) une solution *Hapten-Antibody* CD34 ;

(b) après une étape de lavage, la seconde incubation est réalisée avec des billes magnétiques *anti-Hapten*.

La sélection directe comporte quant à elle une seule étape d'incubation avec une solution d'anticorps anti-CD34 directement couplés aux billes magnétiques. Les quantités de réactifs utilisées sont celles indiquées dans les instructions du fabricant et sont conditionnées par le nombre de cellules CMN. L'incubation est réalisée à l'obscurité à +4°C sous agitation pendant 15 ou 30 minutes selon la procédure, une ou deux étapes respectivement.

Après incubation, les cellules sont lavées en tampon de sélection par centrifugation, puis passées à travers une colonne MACS placée dans un champ magnétique permettant la rétention des cellules CD34⁺ (ayant fixé l'anticorps et les billes magnétiques). Les cellules CD34⁺ sont finalement obtenues par élution de la colonne et sont ensuite comptées sur lame de Malassez. Un test d'exclusion des cellules mortes est réalisé par dilution des cellules avec du Bleu de Trypan.

Enfin, l'efficacité de la sélection est évaluée par cytométrie en flux grâce au marquage d'un aliquote des cellules avec un anticorps anti-CD34 couplé à un fluorochrome. Seuls les échantillons dont la pureté est $\geq 85\%$ de cellules CD34⁺ sont retenus pour nos expériences.

Lorsque cela s'est avéré nécessaire (analyse de l'expression du marqueur CD133 et de l'activité d'ALDH), une sélection des cellules CD34⁺ à la fin de la culture/co-culture primaire (C1) a été réalisée selon cette même procédure.

II.B. Préparation de la couche adhérente de CSM

Les CSM utilisées dans nos études ont été isolées à partir de la moelle osseuse de donneurs sains (crête iliaque) retenue sur les filtres utilisés lors de la préparation des greffons hématopoïétiques allogéniques. Après lyse des globules rouges au chlorure d'ammonium (8.2 mg/mL ; Sigma-Aldrich, France), les cellules de la moelle osseuse ont été cultivées dans du milieu α -MEM (Minimum Essential Medium Alpha Modification, BioWhittaker, Lonza, Verviers, Belgium) complété avec 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) (HyClone Perbio, France), 100 unités/mL de pénicilline, 100 μ g/mL de streptomycine (Cambrex BioWhittaker, Walkersville, MD, USA), 2 mM de glutamine (Sigma- Aldrich, France) et 1 ng/mL de FGF-2 (PeproTech, Levallois Perret, France) ; l'ensemble est dénommé «milieu α -MEM complet»).

Après 3 à 4 jours de culture à 37°C, 5% de CO₂, les cellules non adhérentes ont été éliminées pour ne conserver que les cellules adhérentes et le milieu a été renouvelé. Une fois à confluence, les cellules adhérentes, principalement des CSM, ont été décollées du support de culture à la trypsine (Trypsin/EDTA, Lonza, Verviers, Belgium), comptées et remises en culture à une concentration de 10³/cm² pendant 1 à 3 semaines. Les CSM ainsi préparées ont ensuite été utilisées directement ou après cryo-conservation. Pour les expériences de co-culture ainsi que pour l'étude de sécrétion des cytokines, les CSM décongelées (comprises entre passage P1 à P5) ont été incubées en plaques de 12 puits (2.5×10⁴/mL/puits ce qui correspond à environ 8 000 cellules/cm²) dans le milieu α -MEM complet à 37°C et dans une atmosphère 5% CO₂ et 95% d'air saturé en eau, jusqu'à l'obtention d'une monocouche confluyente 2 ou 3 jours plus tard. Pour les études de phénotype, de production de CFU-F et de prolifération, la culture de CSM (comprises entre passage P1 à P5) a été réalisée en flasques de T 75 cm² (Nunc, Denmark).

III. Analyse des CSM

III. A. Analyses fonctionnelles - colonies CFU-F (*Colony Forming Unit - Fibroblast*)

Ensemencées à faible concentration, les CSM (issues des passages de P1 à P5) forment des colonies cellulaires fibroblastiques dont le taux par rapport au nombre de cellules totales présentes dans une préparation donnée reflète l'enrichissement en cellules primitives. Ces colonies sont ainsi appelées *Colony-Forming Unit-Fibroblast* (CFU-F) (Figure 16).

Environ 600 CSM ont été ensemencées dans des boîtes de Petri 56.7 cm² (Nunc, Denmark) dans 10 mL de « milieu α -MEM complet » pendant 14 jours à 37 °C. A ce terme, les colonies ont été lavées avec du PBS puis colorées avec une solution de Giemsa (Sigma-Aldrich) pendant 5 minutes à température ambiante ; elles ont ensuite été rincées à l'eau distillée puis séchées pour être dénombrées à l'aide d'un microscope inversé (Leica).

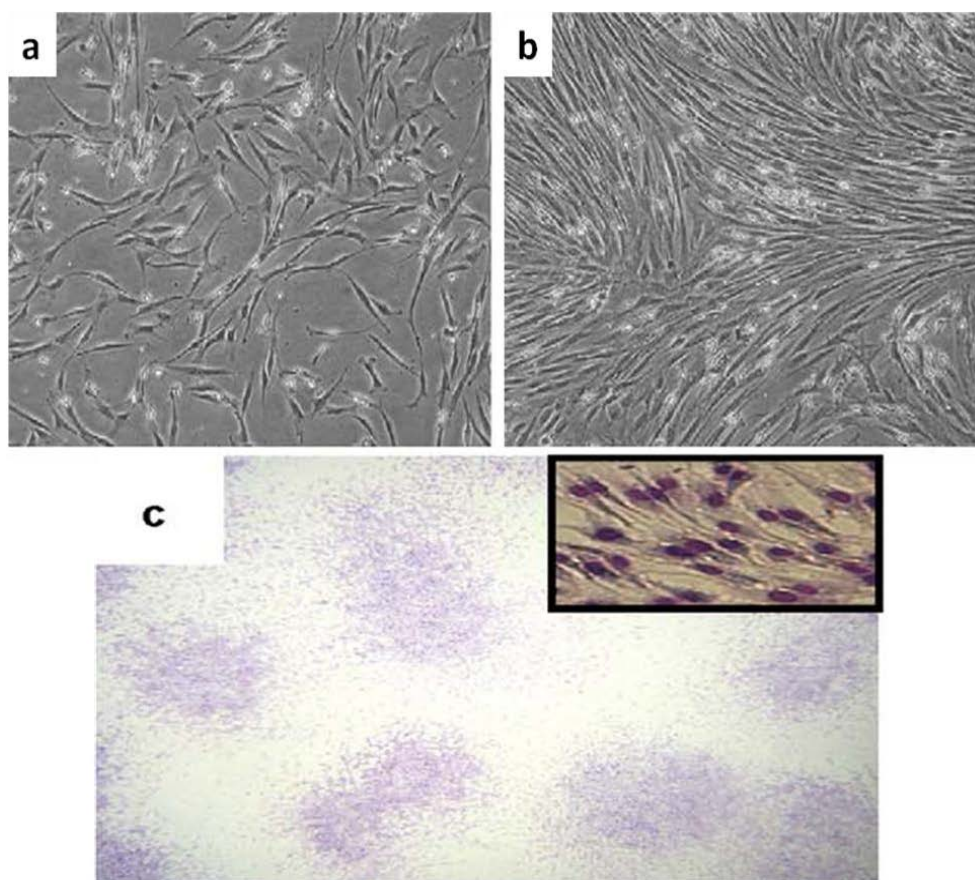


Figure 16: Culture de cellules stromales mésenchymateuses humaines issues de la moelle Osseuse avec différents grossissements.

(a) Morphologie des cellules stromales mésenchymateuses à 50% de confluence ($\times 40$). (b) Morphologie des CSM à confluence ($\times 40$). (c) *Fibroblasts Colony-Forming Unit* (CFU-F) après coloration au Giemsa. (D'après Roux et al., 2011).

III. B. Analyse phénotypique des préparations de CSM

Nous avons choisi d'étudier certains marqueurs de CSM en corrélation avec une capacité proliférative importante (primitivité) (Tableau 2) afin d'évaluer si leur expression était modulée par les BC-O₂. Pour cela les niveaux d'expression des antigènes suivants ont été évalués : anti-CD106 et anti-CD45 conjugués à la Fluorescéine isothiocyanate (FITC), anti-CD146, anti-CD49a, anti-CD271, anti-CD200, anti-CD73, anti-CD34, anti-CD13 conjugués à la phycoérythrine (PE), anti-CD54, anti-CD90 conjugués à la phycoérythrine-cyanine 5 (PE-C5), anti-CD105 conjugué à Peridinin Chlorophyll (PerCP) (Tableau 5). Les AC dirigés contre les antigènes des lignées CD45 et CD34 ont été utilisés afin d'exclure une éventuelle «contamination» hématopoïétique. Les cellules ont été incubées avec les anticorps ou les contrôles IgG (afin de déterminer le niveau de liaison non spécifique) pendant 30 minutes à 4 °C

et à l'obscurité. Elles ont ensuite été lavées et puis resuspendues dans du PBS. Les échantillons ont finalement été analysés à l'aide du cytomètre en flux (FACSCalibur, Becton Dickinson).

Tableau 5 : Les anticorps monoclonaux utilisés pour le phénotypage de CSM.

BD Pharmingen, Pont-de-Claix, France	PE Mouse anti-human [CD73 (Cat : 550257), CD200 (Cat : 552475), CD146 (Cat : 550315), CD271 (Cat : 557196), CD49a (Cat : 559596)] ; PE-Cy TM 5 Mouse anti-human CD54 (Cat : 555512) ; FITC Mouse anti-human CD106 (Cat : 551146) ; PerCP-Cy TM 5.5 Mouse anti-human CD105 (Cat : 560819) ; PE-Cy TM 5 CD90 (Cat : 555597).
BD, Bioscience, San Jose, CA, USA	CD34 PE (8G12) (Réf : 345802) ; CD13 PE (Réf : 347406) ; CD45 FITC (2D1) (Réf : 345808)

IV. Congélation et Décongélation des cellules

IV.A. Congélation des cellules

Des culots cellulaires de $0,5 \times 10^6$ à 10^6 CSM ou de cellules CD34⁺ ont été préparés par centrifugation à 2500 ou à 1500 t/m respectivement, durant 10 minutes et ont été remis en suspension dans 900 µl de SVF. 900 µL de solution de congélation (SVF contenant 20% de DMSO (diméthylsulfoxyde, B. Braun Medical, Boulogne, France) ont été ajoutés goutte-à-goutte sur la suspension cellulaire. La concentration finale en DMSO est donc de 10%.

L'intégralité de cette manipulation a été réalisée sur glace. Très rapidement, les cellules ont été transférées dans des cryotubes puis placées durant quelques jours à -80 °C. Le stockage à long terme a ensuite été réalisé en azote liquide (environ -180°C).

IV.B. Décongélation des cellules

Chaque cryotube contenant des cellules congelées a été placé dans un bain-marie préalablement chauffé à 37 °C. Dès la décongélation terminée, la suspension cellulaire a été ajoutée goutte-à-goutte sur 10 mL de milieu de culture froid contenant 20% SVF afin de ne pas soumettre les cellules à un choc thermique- osmotique et à la toxicité directe du DMSO. Les cellules ont été centrifugées puis lavées une nouvelle fois avec du milieu de culture (voir paragraphe co-culture ci-après). Elles ont ensuite été remises en suspension dans du milieu de culture et les cellules viables ont été dénombrées sur lame de malassez et un test d'exclusion des cellules mortes a été réalisé avec du bleu de trypan.

V. Culture simple et Co-culture sur CSM des cellules CD34⁺ - Culture liquide primaire C1

Les cellules CD34⁺ purifiées ont été mises en expansion par culture (2×10^4 /mL/puit) avec ou sans couche de CSM dans des plaques de 12 puits (Nunc, Denmark) pendant 10 jours. La culture a été réalisée dans un milieu sans sérum Stem Alpha A (Stem Alpha SA, St. Genis l'Argentière, France) supplémenté avec un cocktail de cytokines humaines [SCF et G-CSF (Amgen-Roche, neupogen, en concentration de 100 ng/mL chacun), TPO (PeproTech; 20 ng/mL) avec ou sans l'ajout de l'IL-3 (Recombinant Human rHu ; Pepro Tech, London; 0,5 ng/mL)].

Les cultures ont été incubées à 37°C sous différentes concentrations d'oxygène : 20 (Incubator Igo 150 Cell Life, Jouan, St. Herblain, France), 5% ou 1,5% d'O₂ (Proox Culture Chamber with O₂ and CO₂ regulators BioSpherix, Ltd., Redfield, NY, USA <http://www.biospherix.com>) (Figure 17) dans une atmosphère saturée en eau et enrichie en CO₂ (5%). Après 10 jours de culture (J10), les cellules représentant le produit d'expansion ont été récupérées (suite à une série d'aspirations/refoulements pour détacher les cellules adhérentes) et lavées avec du milieu Iscove basale (Biochrom AG, Berlin, Allemagne). Cette technique nous a permis de décoller et récupérer la quasi totalité des cellules dans les boîtes de culture ainsi que d'éviter les potentiels effets nocifs liés aux traitements enzymatiques.

Les cellules viables ont été identifiées et dénombrées (test d'exclusion des cellules mortes au bleu de trypan) avant d'être analysées comme décrit plus loin.

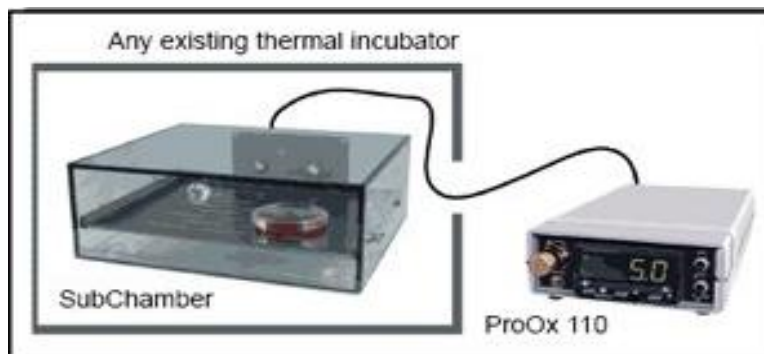


Figure 17 : Système de mini-chambre à O₂ contrôlé.

Cette chambre est placée dans un incubateur à température et humidité contrôlées, et est reliée avec un contrôleur d'oxygène ProOx (indirectement par injection d'azote) ainsi qu'à un contrôleur de CO₂.

Il faut signaler que l'utilisation de milieu sans sérum a pour but de respecter les exigences sanitaires consistant à diminuer le plus possible le risque de maladies transmissibles.

Quant au cocktail de cytokines, nous nous sommes référés aux expérimentations dans le domaine de l'expansion qui montrent que la combinaison de TPO, ayant un effet positif sur l'amplification des CSH/PH (Kaushansky, 2005), avec le SCF (Luens et al., 1998) présente un effet positif sur l'expansion. L'addition du G-CSF, agissant sur la différenciation des précurseurs granulocytaires avec une action sur les progéniteurs primitifs, et de l'IL-3 renforce encore cette synergie en modulant la forte stimulation de la différenciation. Par ailleurs, les cytokines décrites dans ce cocktail sont maintenant disponibles sur le marché des molécules de grade clinique. Son utilité est démontrée dans plusieurs travaux (Reiffers et al., 1999; McNiece et al., 2004; Robinson et al., 2006; 2011).

V.A. Analyses par Cytométrie en Flux (CMF)

V.A.1. Expression des Antigènes Membranaires

A la fin de la culture C1, les cellules ont été lavées avec du milieu *Iscove basal*, une partie du produit d'expansion a été mise en suspension dans du PBS (*Phosphate Buffer Saline*) et incubée pendant 20 minutes, dans l'obscurité, avec les anticorps monoclonaux spécifiques du type de phénotypage considéré.

Pour la différenciation vers les différentes lignées hématopoïétiques, les cellules ont été incubées en présence des anticorps: anti-CD33 et CD13 (marqueurs myéloïdes), anti-CD19 (marqueur lymphoïde), anti-CD41 et CD61 (marqueurs mégacaryocytaires) et anti-CD34.

Pour l'analyse de cellules indifférenciées (primitives), l'anticorps anti-CD133 (Hess et al., 2006) a été utilisé en combinaison avec l'anti-CD34 et la mesure d'activité de l'enzyme ALDH. Le marqueur CD90 a été également testé.

Les molécules d'adhésion, VLA-4 (CD49d), LFA-1 (CD11a), CXCR-4 (CD184) ont également fait l'objet d'une évaluation par CMF sur la population CD34⁺ sélectionnée à la fin de culture.

L'anti-CD45 (marqueur pan-hématopoïétique) a été utilisé pour exclure les cellules non-hématopoïétiques (les CSM dans le cas présent) de l'analyse.

Tous ces anticorps ont été conjugués avec un des fluorochrome suivants : FITC, PE, PerCP ou APC (comme le mentionne le tableau 6). Des isotypes spécifiques de chaque anticorps et conjugués au fluorochrome correspondent ont été utilisés pour déterminer le seuil de positivité de l'expression des marqueurs.

A la fin de l'incubation, les cellules ont été lavées, remises en suspension et analysées par cytométrie en flux (FACSCalibur, Becton Dickinson).

Tableau 6 : Liste des anticorps monoclonaux utilisés pour l'analyse phénotypique du produit d'expansion.

BD PharMingen, Pont-de-Claix, France	PE Mouse anti-human [CD33 (Cat : 555450), CD11a (Cat : 555384), CD49d (Cat : 555503), CD19 (Cat : 555413)] ; PE anti-human CD41 (Cat : 555467) ; FITC Mouse anti-human CD90 (Cat : 555595) ; APC Mouse anti-human CD184 (Cat : 555976) ; Mouse γ 1 APC (X40) (Réf : 345818) ; PE Mouse IgG1 κ Isotype (Cat : 555749)
BD, Bioscience, San Jose, CA, USA	CD34 PE (8G12) (Réf : 345802) ; CD13 PE (Réf : 347406) ; CD61 FITC (Réf : 347407) ; CD45 PerCep (2D1) (Réf : 345809), CD33 APC (P67.6) (Réf : 345800) ; APC Mouse IgG2a κ Isotype (Cat : 555576) ; CD45 FITC (2D1) (Réf : 345808)
Miltenyi Biotechnology, Gladbach, Germany	CD133/2 (293C3)-APC human ; Mouse IgG2a-APC

V.A.2. Activité de l'enzyme Aldéhyde Déshydrogénase (ALDH)

La forte activité de l'ALDH est connue comme marqueur des progéniteurs et des cellules souches hématopoïétiques fraîchement isolées (Hess et al., 2006).

Le marquage ALDH a été réalisé avec le kit Aldefluor (StemCell Technologies, Grenoble, France) selon les instructions du fabricant. Brièvement, 1 μ L de substrat activé fluorescent, Aldefluor (BAAA, BODIPY[®] aminoacetaldehyde) a été ajouté à $0,1 \times 10^6$ cellules CD34⁺ (purifiées à J0 et à J10) (en suspension dans 100 μ L d'*Aldefluor assay buffer*). Les cellules ont été incubées pendant 30 à 60 minutes à 37°C pour permettre au substrat d'entrer dans les cellules par diffusion passive puis sa conversion en BAA (BODIPY[®] – aminoacetate) qui est chargé négativement et donc retenu dans les cellules. Selon ce principe, plus l'activité ALDH des cellules était importante, plus la conversion et la quantité de BAA- retenue était importante, et plus les cellules émettaient de fluorescence.

Un témoin de spécificité de la réaction a été réalisé sur un aliquote de cellules incubées avec le substrat Aldefluor BAAA et 1 μ L l'inhibiteur spécifique de l'enzyme ALDH (DEAB). Les

cellules ont ensuite été marquées avec les anticorps humains CD34-PE et CD133-APC et analysées par cytométrie en flux. Pour l'activité d'ALDH, la fluorescence émise a été mesurée dans le canal vert.

V.B. Détection des cellules progénitrices CFC (*Colony-Forming Cell*) – culture semi-solide

Afin de détecter les progéniteurs hématopoïétiques engagés, les cellules CD34⁺ fraîchement isolées ou récoltées à J10 de culture ont étéensemencées dans le milieu semi-solide Stem Alpha 1D (méthylcellulose complémentée en des facteurs de croissance humains (IL-3, IL-6, IL-11, SCF, EPO, GM-CSF et G-CSF) et matières nourricières) (Stem Alpha SA) en boîtes de Pétri (250 cellules/mL) ou en plaques 24 puits (0,5µL de suspension cellulaire/250µL) (Nunc, Danemark) (Ivanovic et al., 2004).

Après 14 jours d'incubation à 37°C dans une atmosphère saturée en humidité à 20% d'O₂ et 5% de CO₂, les CFC [unités formant des colonies de granulocytes-macrophages (CFU-GM), Burst unités formant-érythroïdes (BFU-E) et unités formant des colonies-Mix (CFU-Mix)] (> 50 cellules) ont été énumérées à l'aide d'un microscope inversé (Leica).

V.C. Détection des progéniteurs primitifs Pré-CFCs (Culture liquide secondaire C2 + culture semi-solide)

La production de progéniteurs engagés lors d'une culture secondaire à long terme (C2) reflète la présence et la quantité de la population primitive (pré- CFC) située hiérarchiquement entre le stade de progéniteurs et celui de cellules souches et obtenue à l'issue de la culture C1 (Ivanovic et al., 2000; 2002; Kovacevic-Filipovic et al., 2007). Au terme des 10 jours de culture C1, les cellules produites (obtenues à partir de 20 000 cellules CD34⁺ à J0) ont été récoltées, lavées et remises en suspension dans 1 mL de milieu. La C2 a été initiée à partir de 200 µl de chaque suspension cellulaire C1 et le volume a été ajusté à 1 mL avec le milieu identique à C1. La culture C2 a été maintenue 8 semaines à une concentration d'O₂ de 20% ; une demi-déplétion de la culture compensée par l'ajout de milieu frais (y compris les cytokines) a été effectuée chaque semaine (Figure 18). Un aliquote (identique dans toutes les conditions) de la suspension cellulaire a été également placé chaque semaine en méthylcellulose afin de détecter et déterminer le nombre de progéniteurs engagés (CFC) produits au cours de C2, comme mentionné ci-dessus.

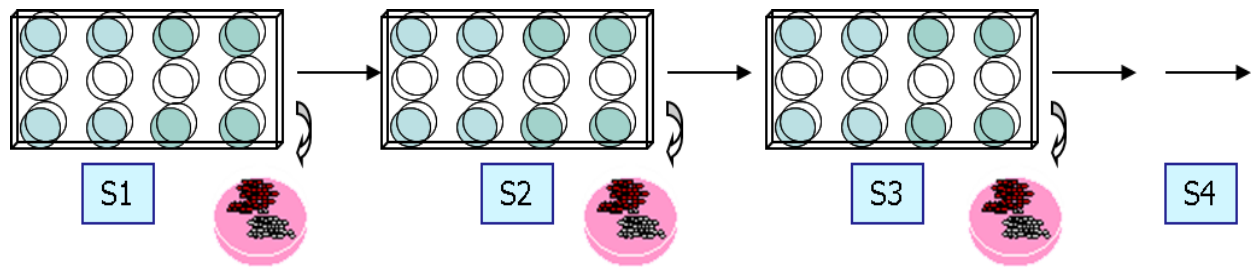


Figure 18 : La culture secondaire.

Culture secondaire C2 initiée à partir de 200 μ L de suspension cellulaire obtenue à J10 de chaque culture primaire C1. Toutes les semaines un volume identique est placé en méthylcellulose pour déterminer la production de CFC à partir des pré-CFC présents au terme de C1.

Comme les informations tirées suite au test de Pré-CFC ne suffisent pas pour conclure quant à la sous-population de cellules souches présente au sein du produit d'expansion, nous avons eu recours au test *in vivo* (xénogreffe), le meilleur qui peut permettre de révéler le contenu du produit d'expansion en cellules souches appelé SRC.

V.D. Détection des cellules souches SRC (*Scid-Repopulating Cells*)

L'activité des cellules souches a été évaluée *in vivo* par un test de transplantation de cellules humaines dans la souris immunodéficiente (NOG/SCID).

Après 10 jours de culture C1, 1000 cellules triées à J0 (stockées à -80°C jusqu'au jour de greffe) ou leur descendance obtenue pour chaque conditions de C1 ont été injectées aux souris NOG/SCID âgées de 6 à 10 semaines. Les animaux étaient hébergés à l'animalerie de l'Université Bordeaux 2 et ont préalablement été conditionnés par injection intrapéritonéale de 25 mg/kg de Busulfan (Busilvex[®], Pierre Fabre, Boulogne, France) à J -2 et J -1 avant la greffe (selon le protocole préalablement établi) (Robert-Richard et al., 2006) (Figure 19).

Des contrôles positifs (souris injectées avec 15000 à 20000 cellules CD34⁺ purifiées à J0) et des contrôles négatifs (souris non injectées) ont été inclus. Après 8 semaines, les animaux ont été euthanasiés, leurs fémurs prélevés et la moelle osseuse récoltée à l'aide d'une seringue et de 1 mL de milieu RPMI 1640 complémenté en albumine humaine (0,4%). Un comptage a été effectué à partir d'un aliquote de suspension cellulaire diluée au 1/10 en PBS-2,5% acide acétique pour induire la lyse et l'exclusion des érythrocytes.

V.D.1. Détection des cellules humaines dans la moelle osseuse des souris par CMF

Les cellules ont été lavées avec du PBS (EDTA 5 mM et albumine humaine à 0,4%) et incubées avec les anticorps anti-CD45 humain-FITC, anti-CD19 humain-PE et anti-CD33 humain-APC pendant 20 minutes à l'obscurité à +4°C.

A la fin de l'incubation, les cellules ont été lavées une nouvelle fois puis analysées sur le cytomètre en flux FACSCalibur (Becton, Dickinson) pour détecter, quantifier et phénotyper les cellules humaines présentes dans la moelle des souris.

V.D.2. Détection des progéniteurs humains dans la moelle osseuse des souris par test CFC

Pour détecter les progéniteurs (CFC) d'origine humaine dans la moelle osseuse des souris, 15 et 30 µL de la suspension cellulaire issue des fémurs ont été ensemencés (en duplicat) dans 250 µL de méthylcellulose (Stem Alpha-1; Stem Alpha SA) complétée avec 10% de plasma humain, 25 ng/mL de rHu IL-3 (Pepro Tech, London), 25 ng/mL de rHu GM-CSF (R & D Systems Europe, Lille, France), 50 ng/mL de rHu SCF (Amgen-Roche, Neupogen) et 3 U/mL de rHu érythropoïétine (EPO) (Tebu- Bio, Le Perray, France) (Robert-Richard et al., 2006). Après 14 jours d'incubation, les colonies humaines (> 50 cellules) ont été dénombrées à l'aide d'un microscope inversé (Leica).

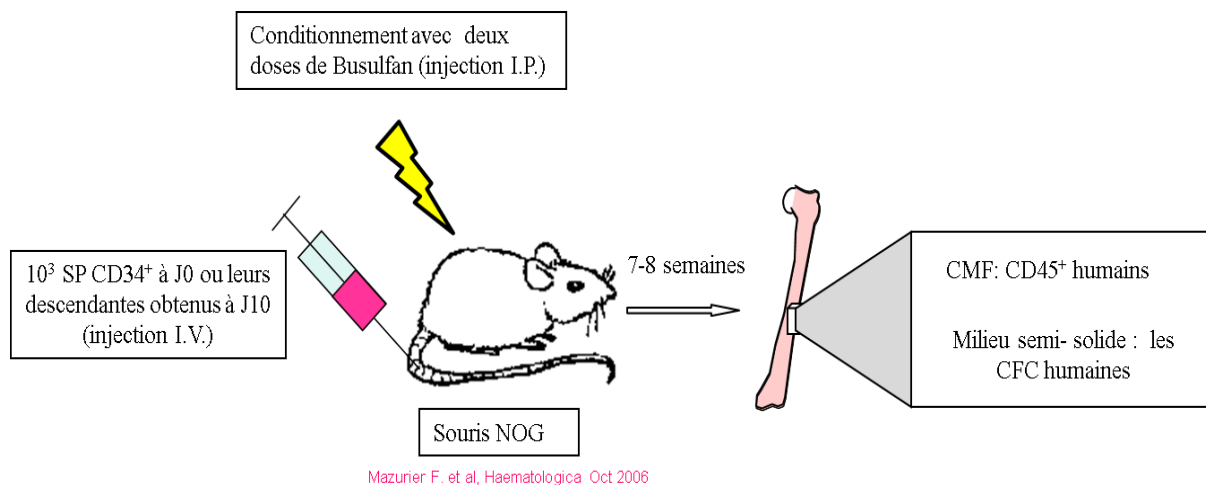


Figure 19 : Schéma représentant le test *in vivo* de xénogreffe aux souris NOG/SCID.

VI. La production des cytokines

Les études quantitatives de la production de cytokines au cours de C1 (culture simple de cellules CD34⁺ et co-culture sur CSM) et de la culture de CSM seules (à 20 et 5% d'O₂) ont été réalisées par la technique Luminex (*Luminex Multiplex Bead Immunoassay*).

Cette technique présente plusieurs avantages par rapport à un dosage ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), couramment utilisé pour quantifier les cytokines, notamment au niveau du temps, du coût, du besoin en matériel (volume requis très faible) et de la fiabilité des résultats. Cette technique est basée sur l'utilisation de microsphères (microbilles) de polystyrène comme support d'antigène. Ces billes sont colorées par un mélange de deux marqueurs fluorescents dans des proportions variables produisant ainsi 10 niveaux de fluorescence pour chaque couleur. Un panel de 100 billes peut être inclus dans un même puits d'analyse, chaque bille étant spécifique d'un antigène donné, ce qui rend ce système multi-analytique assez puissant.

La réaction antigène-anticorps est révélée par l'ajout d'un conjugué fluorescent. Les billes passent dans un « fluorimètre » en flux devant deux faisceaux de laser, l'un permettant d'identifier la couleur de la bille, donc l'antigène qui la recouvre, et le second de quantifier l'intensité de la réaction.

Dans nos expériences, l'acquisition, l'analyse et l'interprétation ont été en partie réalisées manuellement grâce à *Cytometric Bead Array (CBA) system* avec un cytomètre en flux classique et en partie à l'aide de l'appareil Luminex 100 (effectuées à la Plateforme de Microdosages et Phénotypage du Petit Animal- IFR65- Paris).

Pour des raisons techniques la condition de 1,5% d'O₂ n'a pas été effectuée.

Les différentes cultures et co-cultures de cellules CD34⁺ et de CSM seules (récapitulées dans le Tableau 7) ont été réalisées à 5% d'O₂ (BC-O₂) et à 20% (contrôle) pendant une durée de 10 jours. Le milieu Stem alpha A complémenté par TPO, SCF, G-CSF et IL-3 a été utilisé pour les cellules CD34⁺ en culture simple et en co-culture ; la culture de CSM a quant à elle été réalisée en milieu α -MEM complémenté en SVF et FGF-2 (1 ng/mL).

Pour le dosage, les surnageants de culture ont été collectés à différents temps de cultures selon le type de cytokines considéré :

- à **J3**, IL-3, IL-4, IL-17A, TNF- α , FGF-2 et G-CSF,
- à **J2, J4 et J7** pour VEGF-A, IL-8, TPO, HGF, TGF- β 1 et SDF-1 α + β
- à **J2, J3, J5 et J7** pour IL-1 β , IL-6, GM-CSF et IL-10

Les surnageants ont ensuite été stockés à -20 et -80°C pour un stockage à court ou long terme respectivement. Les analyses multiplex ont été effectuées à l'aide des kits de Biosources-Invitrogen (Invitrogen Corporation, Camarillo, Ca, USA) : IL-1 β (Li Z 2010 FEBS J), IL-10 (Li Z 2010 FEBS J), l'IL-6, IL-, IL-8, IL-4, IL-17A, TNF- α (Li Z 2010 FEBS J), HGF, TGF- β 1, VEGF, FGF-2, G-CSF et GM-CSF selon le protocole du fabricant. Nous avons également eu recours à deux kits fournis par Millipore (St-Quentin-en-Yvelines, France) pour le dosage de SDF-1 $\alpha+\beta$, TPO. Tous ces dosages sont spécifiques des cytokines humaines à l'exception du TGF- β 1 pour lequel le dosage est multi-espèce. Pour générer une courbe standard, une série de dilutions des standards appropriés fournies par le fabricant a été préparée. Les limites de détection des cytokines étaient les suivantes: l'IL-1 β (<15 pg/mL), IL-10 (<5 pg/mL), IL-6 (<3 pg/mL), le GM-CSF (< 15 pg/mL), VEGF (<10 pg/mL), IL-8 (<3 pg/mL), FGF-2 (<15 pg/mL), G-CSF (< 15 pg/mL), TNF- α (<10 pg/mL), SDF-1 $\alpha+\beta$ (<55 pg/mL), TPO (<38 pg/mL), HGF (<10 pg/mL), TGF- β 1 (<15 pg/mL), IL-4 (<5 pg/mL), IL-17A (<10 pg/mL).

Tableau 7: Les différentes conditions de cultures à partir desquelles les surnageants sont testés.

Cultures réalisées	Concentrations d'oxygène
CD34 ⁺ + CSM	20%
	5%
CD34 ⁺	20%
	5%
CSM	20%
	5%

VII. Expansion de cellules CD34⁺ avec les surnageants de culture - investigation de l'effet paracrine de CSM

Il s'agit en effet d'une analyse fonctionnelle consistant à mettre en évidence l'impact de ces surnageants (riches en cytokines) sur l'induction de l'expansion de cellules CD34⁺ placentaires. Les surnageants de culture prélevés au cours de C1 (culture simple/co-culture) et de la culture de CSM (à 20 et 5% d'O₂) et analysés pour leur contenu en cytokines (comme décrit

précédemment), ont été ajoutés à des concentrations de 10% et 20% dans le milieu de culture de cellules CD34⁺ sous oxygénation atmosphérique à 37 °C.

Les surnageants utilisés dans nos expériences sont ceux récoltés au troisième jour de culture.

Les cultures sont réalisées dans des microplaques 96 puits, en volume final de 200 µL/ puits en milieu Stem α A et avec 2 000 cellules CD34⁺ensemencées par puits.

Une condition contrôle a été incluse dans l'étude s'agissant de cultures de cellules CD34⁺ (2 000 cellules) réalisé dans le milieu de culture primaire C1 (sans sérum avec des cytokines TPO, SCF, G-CSF et IL-3) et en l'absence de surnageants de culture.

Nous avons évalué le nombre total de cellules générées à partir de ces cultures à J 5 et à J 11 afin d'évaluer la contribution de l'effet paracrine de CSM sur l'expansion des cellules CD34⁺ en fonction des différentes concentrations d'oxygène.

VIII. Tests Statistiques

Afin d'évaluer la significativité des différences observées dans nos expériences, nos données ont été soumises à des tests statistiques. Le test Student a été utilisé pour l'ensemble des expériences *in vitro* et un écart type moyen a été calculé (SEM, Standard Mean Error). Pour les expériences *in vivo* de greffes chez la souris, la production de colonies CFU-F et les tests fonctionnels sur les surnageants de culture, nous avons eu recours au test de Mann-Whitney. Dans tous les cas la significativité est obtenue pour $p < 0,05$.

RESULTATS

I. ARTICLE PRINCIPAL

Combination of low O(2) concentration and mesenchymal stromal cells during culture of cord blood CD34(+) cells improves the maintenance and proliferative capacity of hematopoietic stem cells

HAMMOUD Mohammad, VLASKI Marija, DUCHEZ Pascale, CHEVALEYRE Jean, LAFARGE Xavier, BOIRON Jean-Michel, PRALORAN Vincent, BRUNET DE LA GRANGE Philippe, IVANOVIC Zoran.

J Cell Physiol. 2012 Jun; 227 (6): 2750 - 8

Combination of Low O₂ Concentration and Mesenchymal Stromal Cells During Culture of Cord Blood CD34⁺ Cells Improves the Maintenance and Proliferative Capacity of Hematopoietic Stem Cells

MOHAMMAD HAMMOUD,^{1,2,3} MARIJA VLASKI,^{1,2} PASCALE DUCHEZ,^{1,2} JEAN CHEVALEYRE,^{1,2} XAVIER LAFARGE,^{1,2} JEAN-MICHEL BOIRON,^{1,2} VINCENT PRALORAN,² PHILIPPE BRUNET DE LA GRANGE,^{1,2} AND ZORAN IVANOVIC^{1,2*}

¹Aquitaine-Limousin Branch of French Blood Institute (Etablissement Français du Sang, Aquitaine-Limousin, EFS-AL), Bordeaux, France

²CIRID, UMR 5164, University of Bordeaux/CNRS, Bordeaux, France

³University of Franche Comté, Besançon, France

The physiological approach suggests that an environment associating the mesenchymal stromal cells (MSC) and low O₂ concentration would be most favorable for the maintenance of hematopoietic stem cells (HSCs) in course of ex vivo expansion of hematopoietic grafts. To test this hypothesis, we performed a co-culture of cord blood CD34⁺ cells with or without MSC in presence of cytokines for 10 days at 20%, 5%, and 1.5% O₂ and assessed the impact on total cells, CD34⁺ cells, committed progenitors (colony-forming cells—CFC) and stem cells activity (pre-CFC and Scid repopulating cells—SRC). Not surprisingly, the expansion of total cells, CD34⁺ cells, and CFC was higher in co-culture and at 20% O₂ compared to simple culture and low O₂ concentrations, respectively. However, co-culture at low O₂ concentrations provided CD34⁺ cell and CFC amplification similar to classical culture at 20% O₂. Interestingly, low O₂ concentrations ensured a better pre-CFC and SRC preservation/expansion in co-culture. Indeed, SRC activity in co-culture at 1.5% O₂ was higher than in freshly isolated CD34⁺ cells. Interleukin-6 production by MSC at physiologically low O₂ concentrations might be one of the factors mediating this effect. Our data demonstrate that association of co-culture and low O₂ concentration not only induces sufficient expansion of committed progenitors (with respect to the classical culture), but also ensures a better maintenance/expansion of hematopoietic stem cells (HSCs), pointing to the oxygenation as a physiological regulatory factor but also as a cell engineering tool.

J. Cell. Physiol. 227: 2750–2758, 2012. © 2011 Wiley Periodicals, Inc.

Starting from the beginning of the 1990s, a lot of data accumulated showing the importance of low oxygen concentration for the functional maintenance of stem cells. HSC, as a paradigmatic case, was cultured at low O₂ concentrations that were mainly called “hypoxia.” This is a confusing term since 1–7% represent physiological oxygen concentrations of the tissues providing HSC environment (Chow et al., 2001; Shima et al., 2009; Guitart et al., 2010; Winkler et al., 2010). These physiologically low O₂ concentrations protect the primitive hematopoietic cells against oxidative stress in vivo (Jang and Sharkis, 2007; Parmar et al., 2007) and ex vivo (Fan et al., 2007, 2008). On the other hand, the reactive oxygen species (ROS) molecules, exhibiting a harmful effect on primitive hematopoietic cells in terms of survival and function, are strongly generated in the culture at 20% O₂ (Ito et al., 2006; Yahata et al., 2011). Most of these articles (Koller et al., 1992a,b; Cipolleschi et al., 1993; Danet et al., 2003; Csete, 2005; Shima et al., 2009; Eliasson et al., 2010), including those of our group (Ivanovic et al., 2004, 2002; Hermitte et al., 2006) refer to experiments performed in cytokine-supplemented liquid cultures. All these data allowed not only a better understanding of self renewal, which is an elementary property of a stem cell, but also a vision concerning the differentiation and the stem cell persistence during

development, as a mirror of the evolution: our concept called “oxygen stem cell paradigm” (Ivanovic, 2009). This concept was already employed in the cell engineering enabling new advances in several fields. As illustrative examples, ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells (reviewed in: Ivanovic and Boiron 2009; Ivanovic et al., 2011) and ex vivo red blood cells (RBC) production could be cited (Vlaski et al., 2009).

The liquid culture, however, does not approximate at best in vivo stem cell environment. Some other culture models as the co-culture of hematopoietic cells with stromal cells could

Contract grant sponsor: R&D Aquitaine-Limousin Branch of French Blood Institute (Bordeaux) and EFS grant; Contract grant number: CS-2005.05.

*Correspondence to: Zoran Ivanovic, Etablissement Français du Sang, Aquitaine-Limousin, 5 Place Amélie Raba Léon, BP 24, 33035 Bordeaux Cedex, France. E-mail: zoran.ivanovic@efs.sante.fr

Received 20 July 2011; Accepted 2 September 2011

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com), 12 September 2011.
DOI: 10.1002/jcp.23019

certainly be considered to better mimic the complexity of in vivo hematopoietic environment—in line with the “stem cell niche” concept (Schofield, 1978). As a matter of fact, the invention of “long-term cultures” (Dexter et al., 1977; Winkler et al., 2010) was based on this approach. Recently, lots of articles were published (Li et al., 2007; Magin et al., 2009; Walenda et al., 2010) evaluating the potential advantages of these co-cultures with respect to liquid cultures in terms of ex vivo expansion of progenitor and stem cells (Yamaguchi et al., 2002; Chivu et al., 2004; McNiece et al., 2004; Wang et al., 2004; Zhang et al., 2004; Robinson et al., 2006; Van Overstraeten-Schlögel et al., 2006; Fei et al., 2007; Huang et al., 2007). The results mainly agreed that the presence of stromal cells provides a better maintenance of stem cell potential. On the contrary, this type of culture is more complex than liquid culture and hence, difficult to be transferred at clinical grade level. Therefore, only one clinical trial using hematopoietic cells produced in co-cultures has been published so far (Robinson et al., 2011).

It is interesting that low oxygen concentrations (in the above-mentioned range) also influence proliferative capacity (Grayson et al., 2007; Carrancio et al., 2008; Lavrentieva et al., 2010), viability (Lavrentieva et al., 2010), motility (Rosová et al., 2008), differentiation potential (Grayson et al., 2006; Fehrer et al., 2007), and proliferation kinetics (Dos Santos et al., 2010) of mesenchymal stem cells (MSC) also enhancing their life span (Jin et al., 2010; Tsai et al., 2011) and modifying their cytokine secretion (Annabi et al., 2003; Potier et al., 2007; Li et al., 2010).

Since there is an obvious interest, both from scientific and technologic viewpoint to optimize ex vivo expansion cultures, we tried to combine the presence of mesenchymal stromal cells with low O₂ concentrations, supposed to be physiological for hematopoietic stem and progenitor cells. In addition, the main factor of cellular response to low O₂ concentration, HIF-1 α , is getting stabilized at O₂ concentrations $\leq 5\%$ (Jiang et al., 1996; Jewell et al., 2001; Danet et al., 2003; Kirito et al., 2009). Thus, our hypothesis that the proliferative capacity of HSCs should be better maintained if they were cultured together with mesenchymal stromal cells at appropriately low O₂ concentrations is tested by exposing to 5% and 1.5% O₂ cord (placental) blood (CB) CD34⁺ cell cultures on the layer of bone MSC.

Materials and Methods

Preparation and culture of cells

Full-term delivery CB samples. Samples were collected (with the mother's informed consent) in sterile bags containing anticoagulant and delivered to the Cell Therapy Unit of the (Etablissement Français du Sang Aquitaine-Limousin, Site de Bordeaux). Only samples not appropriate for banking were used in our experiments.

CD34⁺ cell purification. Mononuclear cells were isolated on Ficoll (d = 1.077 g/L, Lymphoprep Nyegaard, Oslo, Norway). The CD34⁺ fraction was isolated with one or two runs of immunomagnetic selection on MiniMACS columns (Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany and Miltenyi Biotec GmbH, Paris, France, respectively) according to the manufacturer's instructions. Flow cytometry controls showed >90% pure CD34⁺ cell populations. CD34⁺ cells were also selected at the end of primary culture/co-culture (C1) by the same procedure above described to analyze their CD133 expression and ALDH activity.

Preparation of mesenchymal stromal cell (MSC) adherent layers. MSCs were isolated by culture from bone marrow of healthy donors obtained from filters used for allogeneic hematopoietic grafts preparation. After RBC lysis in ammonium chloride (8.2 mg/ml; Sigma-Aldrich, St Louis, MO), bone marrow cells were cultured in α -MEM medium (Minimum Essential Medium Alpha Modification) (BioWhittaker, Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (HyClone Perbio, Bezons, France), penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 μ g/ml) (Cambrex BioWhittaker, Walkersville, MD), glutamine (2 mM) (Sigma-Aldrich),

and FGF2 (1 ng/ml) (PeproTech, Levallois Perret, France) (referred to as “complete α -MEM”). After 3–4 days at 37°C, 5% CO₂, non-adherent cells were removed and medium was changed. Adherent cells, mainly MSCs, were trypsinized upon reaching confluence, harvested, and cultured at a concentration of 10³/cm² for 1–3 weeks. MSCs were cryo-preserved or not before usage. For this study, thawed MSCs (≤ 5 th passage) were incubated in 12-well plates (2.5 \times 10⁴/ml/well) in complete α -MEM at 37°C, water-saturated atmosphere, 95% air, and 5% CO₂ until monolayer confluence 2 or 3 days later.

Co-culture of MSCs and CD34⁺ cells. Purified CD34⁺ cells were seeded at 2 \times 10⁴/ml/well with or without MSCs monolayers in 12-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) and cultured for 10 days in Stem Alpha A serum free medium (Stem Alpha SA, St. Genis l'Argentière, France) supplemented with human cytokines [stem cell factor (SCF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) (Amgen-Roche, Neupogen, Neuilly sur seine, France, 100 ng/ml each), thrombopoietin (TPO) (PeproTech; 20 ng/ml), and interleukin (IL)-3 (recombinant human—rHu; Pepro Tech, London, England; 0.5 ng/ml)].

The cultures were incubated at 37°C either at 5% CO₂ and 20% (Incubator Igo 150 Cell Life, Jouan, St. Herblain, France), 5%, or 1.5% O₂ (Proox Culture Chamber with O₂ and CO₂ regulators BioSpherix, Ltd, Redfield, NY) in a water-saturated atmosphere. At Day-10, non-adherent cells were carefully harvested and washed, the viable cells enumerated (trypan blue exclusion test) and processed for further analyses as described below.

Flow cytometry analysis

Membrane antigens expression. After 10 days of culture with or without MSCs at different O₂ concentrations, non-adherent cells were washed in Basal Iscove medium (Biochrom AG, Berlin, Germany) and suspended in phosphate buffer saline, labeled (20 min in dark) with anti-CD33 and -CD13 (myeloid markers), -CD19 (lymphoid marker), -CD41 and -CD61 (megakaryocytic markers), and -CD34 monoclonal antibodies in order to observe lineage differentiation. The anti-CD45 (pan-hematopoietic marker) was used to exclude the non-hematopoietic cells (MSC cells) from analysis. For analysis of undifferentiated cells, anti-CD133 (Hess et al., 2006; Isidori et al., 2007) was used in combination with CD34 expression and ALDH activity (see below). All these antibodies were conjugated either with FITC, PE, PercP, or APC fluorochromes as mentioned in Table I. After labeling, cells were washed and re-suspended and their phenotype was analyzed by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA). Fluorochrome-conjugated isotype antibodies were used to determine the level of non-specific binding.

Aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity. The high activity of ALDH is known as a marker of freshly isolated primitive hematopoietic progenitors and stem cells (Hess et al., 2004, 2006).

ALDH labeling was performed using Aldefluor reagent (StemCell Technologies, Grenoble, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, activated Aldefluor substrate (1 μ l) was added to 0.1 \times 10⁶ CD34⁺ cells (purified at Day-0 and after culture (Day-10)) suspended in 100 μ l Aldefluor assay buffer and incubated for 30–60 min at 37°C to allow the conversion of Aldefluor substrate, a green fluorescent product retained within the cell (Storms et al., 1999). As negative control, an aliquot of Aldefluor-stained cells was incubated with 1 μ l of a specific ALDH inhibitor (DEAB). Cells were co-stained with human CD34-PE and CD133-APC antibodies.

Colony-forming cell (CFC) assay. To detect the committed hematopoietic progenitors, freshly isolated CD34⁺ or cultured cells harvested at Day-10 were seeded in a cytokine-supplemented methylcellulose medium Stem Alpha ID (Stem Alpha SA) in a Petri dish or 24-well plates (Nunc), respectively, at concentration of 250 cells/ml or volume of 0.5/250 μ l, respectively (Ivanovic et al., 2004). After 14 days of incubation at 37°C in water-saturated atmosphere, 20%

TABLE I. Summary of the monoclonal antibodies used for cell labeling

BD Pharmingen, Pont-de-Claix, France	CD33 PE, CD41 PE, CD90 FITC, CD19 PE
BD Bioscience, San Jose, CA	CD34 PE, CD13 PE, CD61 FITC, CD45 PerCep, CD33 APC, CD45 FITC
Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany	CD133 APC

O₂ and 5% CO₂, the CFCs [colony-forming units-granulocyte macrophage (CFU-GM), burst-forming units-erythroid (BFU-E), and colony-forming units-Mix (CFU-Mix)] (>50 cells) were enumerated using an inverted microscope.

Pre-CFCs (primitive progenitors) assay

The production of committed progenitors during a long-term secondary culture (C2) reflects the presence and quantity of a primitive population situated between progenitors and stem cells (pre-CFC) in C1 (Ivanovic et al., 2000, 2002; Kovacevic-Filipovic et al., 2007). C1 cells (total Day-10 progeny of 20,000 CD34⁺ cells plated at Day-0 in 1-ml cultures) were washed and resuspended in 1 ml of medium. The C2 was carried out with 200 µl of C1 cell suspension (in each condition) and the volume was adjusted to 1 ml of cytokine-supplemented (IL-3, SCF, G-CSF, and TPO, as C1 culture concentrations) serum-free medium (Stem Alpha A), and cultured for 8 weeks at 20% O₂ with a weekly demi-depopulation and addition of fresh medium that was taken into account for normalization of total CFC contents in C2. Every week of C2, the cells were plated in methylcellulose to detect committed progenitors as mentioned above.

Scid-repopulating cells (SRC) assay

Stem cell activity was evaluated by in vivo assay—transplantation of human cells to immunodeficient (NOG/Scid) mice. After 10 days, 1,000 cells sorted on Day-0 (and stored at -80°C), or their progeny obtained under different C1 conditions were injected to 6- to 10-week-old NOG/Scid mice conditioned by intraperitoneal injections of Busulfan 25 mg/kg (Busilvex[®], Pierre Fabre, Boulogne, France) at D2 and D1 (according to the previously established protocol) (Robert-Richard et al., 2006) (central animal-keeping facility of University of Bordeaux 2). Positive control (mice injected with 15,000–20,000 CD34⁺ purified at D0) and negative control (non-injected mice) were included. After 8 weeks, the animals were euthanized, their femora were isolated and the BM was flushed with 1 ml of RPMI 1640 complemented with human albumin (0.4%). Cells were washed [phosphate-buffered saline, EDTA 5 mM, human albumin (0.4%)] and incubated with a FITC-coupled anti-human CD45, PE-coupled anti-human CD19, and APC-coupled anti-human CD33 antibodies for 20 min at 4°C in the dark.

Washed cells were analyzed on a FACSCalibur (Becton Dickinson) to detect and quantify human chimerism. To avoid false-positive results due to control isotype, we used non-engrafted mice as controls.

To detect the progenitors (CFC) of human origin in murine bone marrow, 15 and 30 µl of femoral cell suspension (see above) were seeded per 250 µl of methylcellulose (in duplicate) (Stem Alpha-I; Stem Alpha SA) supplemented with 10% human plasma, 25 ng/ml (rHu IL-3) (PeproTech, London), 25 ng/ml rHu GM-CSF (R&D Systems Europe, Lille, France), 50 ng/ml rHu SCF (Amgen-Roche, Neupogen), and 3 U/ml rHu erythropoietin (EPO) (Tebu-Bio, Le Perray, France) (Robert-Richard et al., 2006).

After 14 days of incubation, the human CFCs (>50 cells) were enumerated using an inverted microscope.

Cytokine production

Quantitative studies of cytokine production during C1 (primary culture/co-culture) and the culture of MSC alone (at 20% and 5% O₂) were carried out by the multiplexed bead immunoassay combined technique. The supernatants were collected and stored at -20 and -80°C. Multiplex analysis was performed using the kits purchased from (Biosources-Invitrogen, Cergy Pontoise, France) [human IL-1β (interleukine-1β), human IL-10 (interleukine 10), human IL-6 (interleukine 6), and human GM-CSF] according to the manufacturer's protocol. To generate a standard curve, serial dilutions of appropriate standards provided by the manufacturer were prepared and used. The limits of detection for growth factors were as follows: IL-1β (<15 pg/ml), IL-10 (<5 pg/ml), IL-6 (<3 pg/

ml), GM-CSF (<15 pg/ml). The fluorescent signature was detected by Luminex 100 Analyzer.

Statistical analysis

The t-test was used to evaluate the significance of difference between the experimental conditions. In the experiences with mice, Mann-Whitney test was used.

Results

Impact of oxygen concentration on amplification of total cells, CD34⁺ cells, and clonogenic progenitors (CFC) after 10 days of C1

In culture conditions used here, the decrease in O₂ concentration (from 20%, 5%, and 1.5%) provokes a relative decrease in fold expansion of total cells both in culture and co-culture. In both cases, at 1.5% O₂, this decrease was close to half the value found at 20%. There is a trend to enhance the fold expansion in co-culture comparing to culture, but it was not statistically significant (Fig. 1A). This enhancement in co-culture is, however, evident for CD34⁺ cells: two to three times higher fold expansion was evidenced in co-culture with respect to the cultures (comparing the same O₂ concentrations). Again, the decrease of fold expansion was paralleled by decrease in O₂ concentration becoming statistically significant at 1.5% O₂ versus 20% O₂ in co-culture (Fig. 1B). When the fold expansion of committed progenitors (CFU-GM, BFU-E, and CFU mix) was analyzed, the situation was similar to the one of CD34⁺ cells (Fig. 1C). This fold expansion at 1.5% and 5% O₂ was lower than at 20% O₂ after 10 days in co-cultures. However, co-culture at low O₂ (1.5% and 5%) assured similar and even higher fold expansion than classical culture at 20% O₂.

Effect of low O₂ concentrations and co-culture on membrane markers expression and ALDH activity

We did not find a significant difference in terms of the expression of myeloid markers (CD33 and CD13) or megakaryocytic markers (CD41 and CD61) in our conditions. The CD19 (lymphoid marker) was not detectable.

However, the decrease in O₂ concentration results in decrease in percentage of CD34⁺ cells expressing CD133. This decrease is statistically significant in 1.5% of O₂ (Fig. 2A). Moreover, both 5% and 1.5% O₂ concentrations resulted in a marked decrease (one half) of CD34⁺ cells expressing ALDH⁺ activity (Fig. 2B).

Low O₂ concentrations better maintain primitive progenitors (pre-CFC) in co-culture

Committed progenitors production in secondary liquid cultures initiated with the cells recovered from primary cultures or co-cultures demonstrated that:

- This sub-population of primitive progenitors and stem cells was not better preserved at low O₂ concentration with respect to 20% O₂ in a simple culture since the small observed differences were not statistically significant (Fig. 3A).
- Production of committed progenitors by the cells issued from co-culture at 1.5% and 5% is significantly higher with respect to 20%. This difference is more pronounced at week-2 of secondary culture (threefold higher at 1.5% and 5% with respect to 20% of O₂) (Fig. 3B, inset).

Low O₂ concentrations increase Scid repopulating cells (SRC) activity in co-culture

When 1,000 Day-0 CD34⁺ cells or their Day-10 progeny were injected to NOG/Scid mice, human cells were detected in some

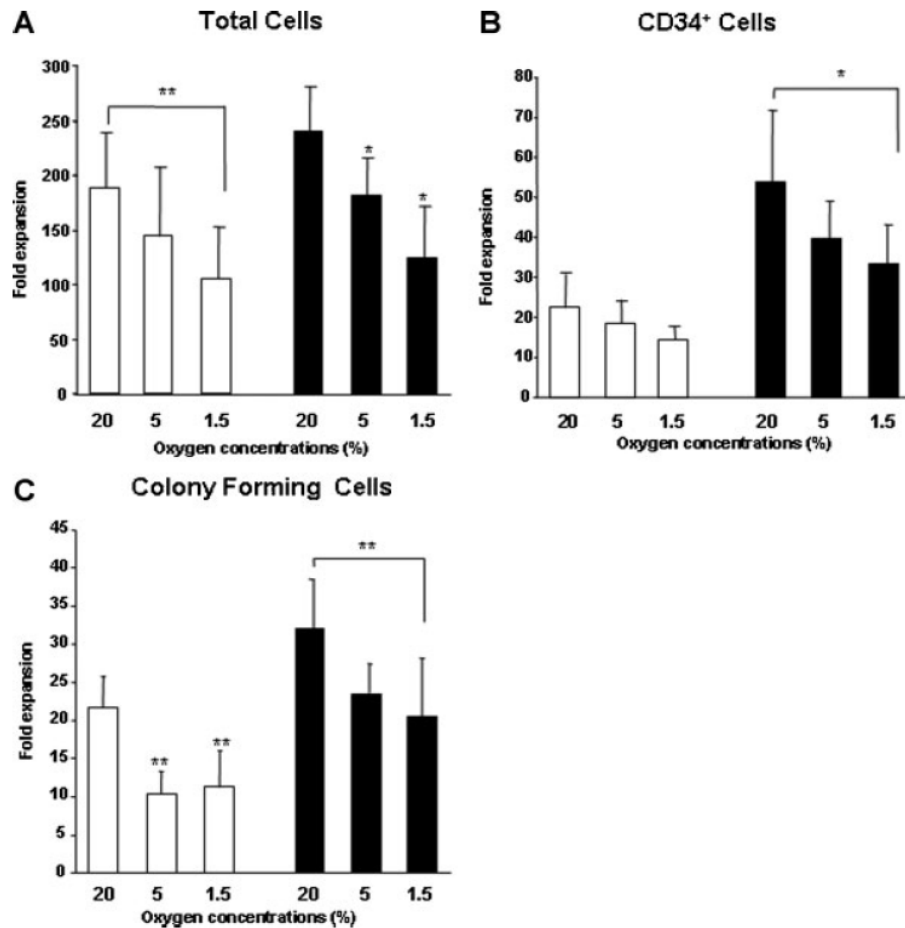


Fig. 1. Impact of oxygen concentrations and MSC on hematopoietic cells amplification in a Day-10 culture. Purified CD34⁺ cells were cultured without (white bars, simple cultures) or with (black bars, co-cultures) mesenchymal stromal cells. **A:** Total cells, **(B)** CD34⁺ cells, **(C)** colony forming cells (CFC). Results are expressed as mean \pm SE; n = 8–9; *P < 0.05; **P < 0.01.

mice but were not in others 7–8 weeks later, demonstrating that the dose of 1,000 cells falls within the linear portion of a sigmoid dose/response (transplanted/cell engraftment) curve, that is, this cell number represents a limiting dilution dose. Based on human CD45 chimerism in NOG/Scid mice (SRC-CD), it is evident that the co-culture better preserves this sub-population of stem cells than simple culture (Fig. 4A). In addition, this effect is enhanced with decrease in O₂ concentration (Fig. 4A). Although the proportion of positive mice (the human CD45⁺ cells detected in their bone marrow) increases in parallel with a decrease in O₂ concentration, even in simple culture, this increase reaches its peak in co-culture, starting from 5% O₂ (Fig. 4B). So, at 1.5% and 5% O₂, the co-cultures seem to maintain a full SRC-CD Day-0 number. When analyzing the percentage of CD45⁺ cells per femur of engrafted mice, this low O₂ concentration-dependent maintenance of stem cells became even more pronounced. The most pronounced effect, however, remains a combination of co-culture with 1.5% O₂ (almost six times higher values compared to Day-0 cells) (Fig. 4C). Having in mind that the frequency of SRC-CD at Day-0 and at Day-10 in co-cultures at 5% and 1.5% O₂ seems to be similar (as shown in Fig. 4B), this result

suggests that an appropriately low O₂ concentration, associated with the presence of stromal cells enhanced the individual proliferative capacity of SRC. An analysis of human CD19 and CD33⁺ cells in bone marrow of the same mice revealed that low O₂ concentrations combined with co-culture maintained the differentiation balance between lymphoid and myeloid line similar to that of Day-0 cells (Fig. 4D).

If the analysis was based on human progenitors (CFC), generated during 7–8 weeks after injection of cells to NOG/Scid mice, it is obvious that the simple cultures maintained better this stem cell sub-population (SRC-CFC) activity at lower O₂ concentrations (5% and 1.5%) (Fig. 5A, inset). The co-culture by itself has a positive effect on the SRC-CFC maintenance, even at 20%. In general, co-culture ensures maintenance of proliferative capacity of SRC-CFC at a level similar to Day-0 (Fig. 5A). However, if the differentiation ratio (CFU-GM and BFU-E) was analyzed, only co-culture at 1.5% O₂ maintained the Day-0 ratio while in all other conditions of culture or co-cultures, this ratio shifted in favor of CFU-GM. This result suggests that a low O₂ concentration is necessary to maintain not only the proliferative capacity of stem cells, but also their differentiation potential.

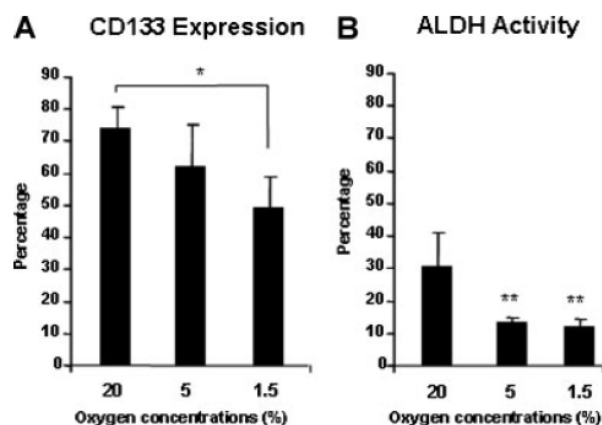


Fig. 2. Analysis of CD34⁺ cells for CD133 expression and ALDH activity. At the end of co-culture, CD34⁺ cells were purified and analyzed by flow cytometry for (A) Expression of CD133, (B) ALDH activity. Results are expressed as mean \pm SE; n = 7; *P < 0.05; **P < 0.01.

Impact of O₂ concentration on cytokine secretion

Production of IL-6 is higher in co-culture at 5% with respect to 20% O₂ until Day-5, but at Day-7 this trend is not statistically significant (Fig. 6A). This “stagnation” in IL-6 production was not detected in simple MSC culture: it increases exponentially, tripling at Day-7 with respect to Day-5 (Fig. 6B). We have not noted a secretion of IL-6 in simple CD34⁺ culture. These data implying the consumption of IL-6 by hematopoietic cells amplified in co-culture. The IL-1 beta, IL-10, and GM-CSF were not detected in our conditions.

Discussion

The most interesting result of this study is that association of low O₂ concentration (1.5% O₂) and co-culture was the condition able not only to maintain the frequency and full differentiation capacity of stem cells (SRC), but also to enhance their proliferative capacity. The last point is suggested by more than five times higher human chimerism in engrafted murine bone marrow, in situation when SRC frequency did not change with respect to Day-0 (the same proportion of “positive” mice).

Being heavily stimulated by cytokines (very high concentrations with respect to the physiological ones) the hematopoietic stem and progenitor cells in ex vivo expansion cultures represent rather a paradigm of regenerating hematopoiesis than of steady state one (Ivanovic and Boiron, 2009). It is evident that in these circumstances a high differentiation pressure on stem cells exists (analogous to the model of Loeffler et al., 1989). The above-mentioned results confirm the major role of micro-environment (mimicked by stromal cells and low O₂ concentrations in this case) for stem cell maintenance. On the basis of the analysis of the results concerning co-cultures presented here, it is evident that the better maintenance of stem cells is paralleled with the lower numerical expansion of committed progenitors: the lowest number of CFC in co-culture was found at 1.5% of O₂ where the best preservation of SRC functional capacity was detected. It should be stressed, however, that this number of committed progenitors corresponds to their maximal expansion in simple

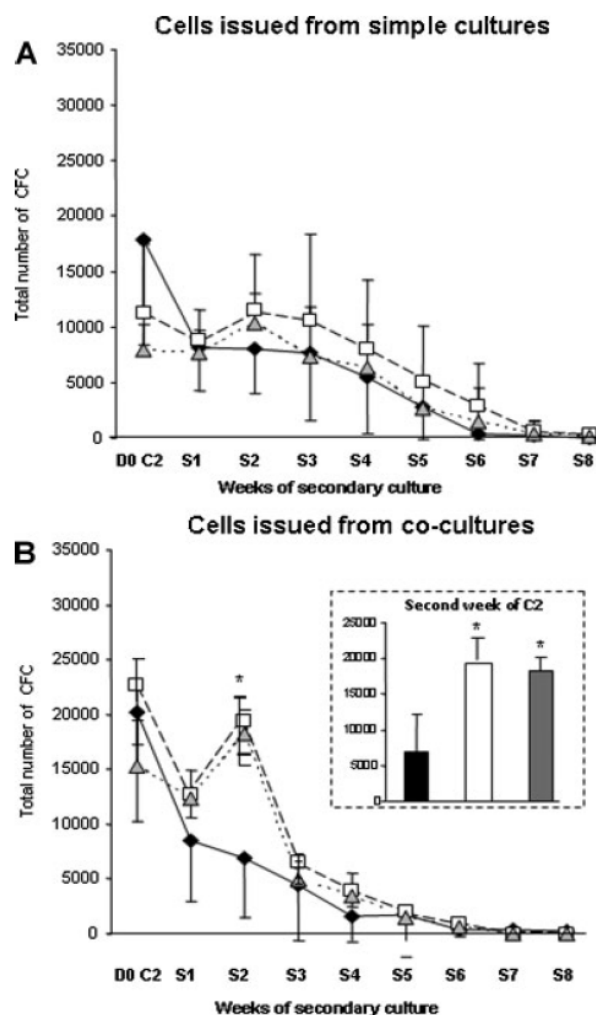


Fig. 3. Impact of low O₂ concentrations and MSC on pre-CFC activity. The curves represent generation of CFC during 8 weeks of secondary cultures (C2) initiated with the cellular products obtained after 10 days of primary culture/co-culture (C1) (20,000 CD34⁺ cells at Day-0 (D0)). A: Time course of CFC in C2 initiated with the cells issued from simple cultures. B: Time course of CFC in C2 initiated with the cells issued from co-cultures. Inset: zoom on situation in C2 after 2 weeks. Black lozenges/bars: 20% O₂; white squares/bars: 5% O₂; gray triangles/bars: 1.5% O₂. Results are expressed as mean \pm SE; n = 5–9; *P < 0.05.

culture at 20% O₂. Thus, co-culture combined with appropriately low O₂ concentration (1.5%) could provide a tool to get a big number of committed progenitors, in parallel with complete preservation or even enhancing of stem cells functional capacities. These data stress the paramount importance of respecting physiological conditions in ex vivo cell engineering. In this regard, it was demonstrated that “hyperoxia” (20%) favors a high production of ROS inducing important negative effects in different cell types (Ito et al., 2006; Fan et al., 2007, 2008; Kubo et al., 2008; Carrera et al., 2010; Yahata et al., 2011). In line with the SRC data are the results concerning pre-CFC. Again, only the low O₂ concentration conditions combined with co-culture were able to preserve a

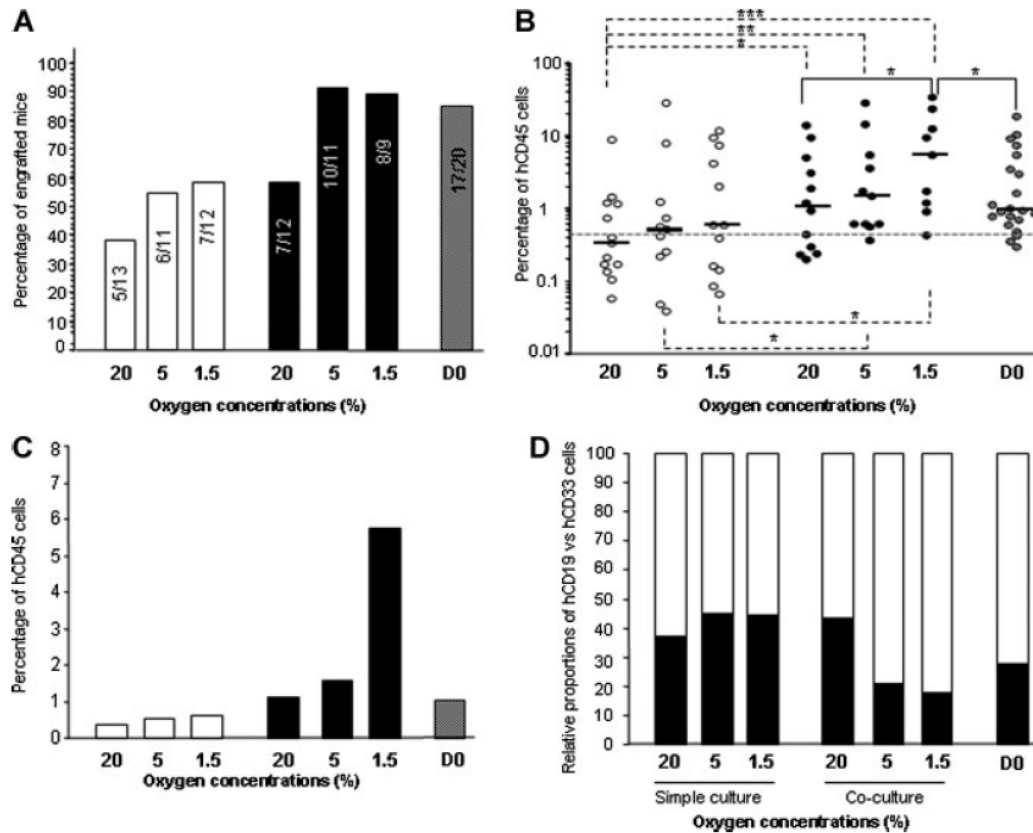


Fig. 4. Impact of low O₂ concentrations and MSC on SRC activity (SRC_{CD}). The activity of Scid Repopulating Cells was detected on the basis of human CD45⁺ chimerism in bone marrow of NOG/Scid mice (SRC_{CD}) 7 and 8 weeks after injections with 1,000 steady state cord blood cells (D0) or their progeny after 10 days of cultures without (simple cultures) or with (co-cultures) MSC under 20%, 5%, or 1.5% O₂. **A:** Frequency of positive mice for human CD45⁺ chimerism (human CD45⁺ chimerism >0.5%). The cultures, co-cultures and Day-0 point (D0) are represented by white, black, and gray bars, respectively. The number (N) of positive per number of analyzed mice is presented inside bars for each condition separately. Note that the percentage of engraftment with respect to Day-0 was reduced in cultures but fully maintained in co-cultures at low O₂ concentrations (5% and 1.5%) ($P < 0.05$). **B:** Individual mice bone marrow labeling with human CD45⁺ antibody; white, black and gray circles represent cultures, co-cultures, and D0, respectively. **C:** Median human CD45 chimerism in positive mice. **D:** Relative proportion of B lymphoid (CD19⁺, white bars) and myeloid (CD33⁺, black bars) cells within human CD45⁺ cells. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. The number of "positive" mice (N) for each corresponding condition in (C) and (D) is stated inside the bars in (A) and individually visible in (B). Cumulative results from four independent experiments presented.

high capacity of repopulation of secondary culture with committed progenitors (pre-CFC activity). However, unlike SRC_{CD}, where 1.5% O₂ concentration was most effective, both 5% and 1.5% were effective for pre-CFC. This underlines functional difference between two stem cell populations, a schedule completely in line with all the data related to the heterogeneity of stem and progenitor cells sub-populations with respect to their demands for O₂ published so far (Cipolleschi et al., 1993; Simsek et al., 2010, reviewed in Parmar et al., 2007; Ivanovic, 2009).

In our conditions, CD34⁺/CD133⁺ cells, as well as the degree of ALDH⁺ activity in CD34⁺ cell population behaved with respect to O₂ concentrations similarly as committed progenitor's number: decreasing in parallel with O₂ concentrations. Even in steady state, most of CD34⁺/CD133⁺ cells and CD34⁺/ALDH⁺ cells are, in fact, the committed progenitors. So, this finding is perfectly coherent, having in mind a low frequency of stem cells in these phenotypically/metabolically characterized populations. The relative enhancing of stem cells (SRC and pre-CFC) frequency at

low O₂ concentrations could not be evidenced in overwhelming progenitor population, having opposite numerical trend.

Although several studies concerning low O₂ concentration (5%) for co-cultures of hematopoietic and stromal cells were published (Koller et al., 1992b; Song et al., 2009; Zhambalova et al., 2009), our study is first performed in serum-free conditions, comparing 1.5% and 5% O₂ and using in vivo approach (SRC) for stem cell detection. These studies could not be directly compared due to differences in conditions: Zhambalova et al. studied the culture of mononuclear cells (MNC) on stromal cells without adding cytokines, Koller et al. did not employ SRC assay, Song et al. employed the osteoblasts as stromal cells. . . . Nevertheless, the common feature in all studies, a better maintenance of primitive cells in co-culture at low O₂ concentrations, is confirmed here with the "gold standard" assay for human stem cell detection—in vivo SRC assay. Furthermore, our study introduces the notion of enhancing of proliferative activity of SRC co-cultured with stromal cells.

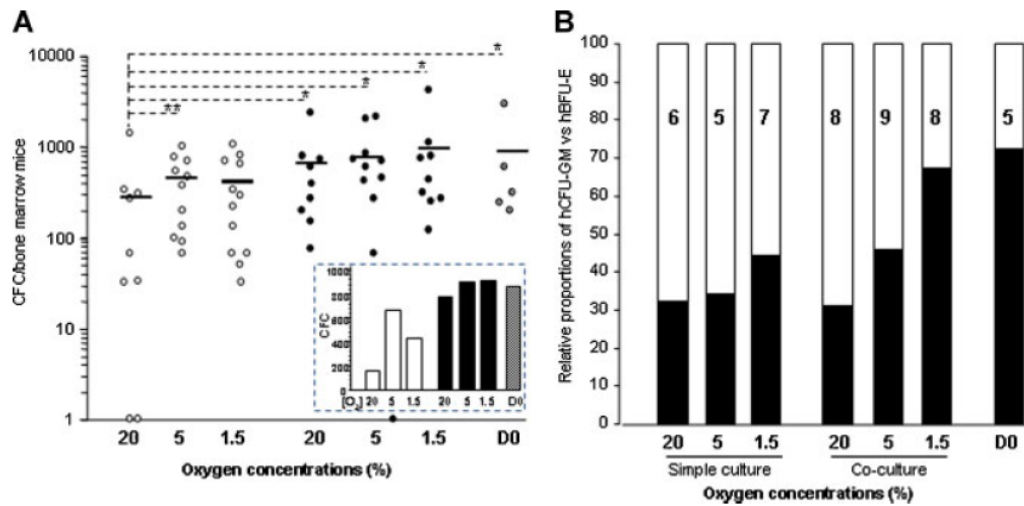


Fig. 5. Impact of oxygen concentrations and MSC on SRC activity (SRC-CFC). The mice were sacrificed 7–8 weeks after injection of 1,000 steady state cord blood cells (D0) or their Day-10 (D10) cultures/co-culture progeny, and their bone marrows were harvested and analyzed for human CFC content. **A:** Individual human CFC content per femur. Inset: median CFC content per femur (only mice positive for human CD45 antigen were considered—the number of mice analyzed is given in corresponding bars of plot B). The cultures, co-cultures and D0 are represented by white, black, and gray circles/bars, respectively. **B:** Relative proportion of granulomonocytic (white bars) and erythroid progenitors (black bars) of human origin in murine bone marrow. Only mice positive for human CD45 antigen were considered; the number of mice (n) is given in the bars. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Cumulative results from four independent experiments presented.

The detailed examination of experiments done with IL-3 imply that its pro-differentiation effect on stem cells is related (i) to the presence of serum in medium and (ii) to a high dose employed (Ivanovic, 2004). So, IL-3 in a low dose in a serum-free culture showed some synergistic beneficial effect with low O_2 concentration on stem cell maintenance and, simultaneously, on expansion of committed progenitors (Ivanovic et al., 2004). So, the serum-free condition employed here enabled us to add a low dose of IL-3 to cytokine cocktail.

Positive effect of low O_2 concentration associated to MSC on HSC maintenance could result from numerous factors whose production is affected by O_2 concentration (HGF, VEGF, IL1, THF, IL-10, etc.) (Annabi et al., 2003; Potier et al., 2007; Li et al., 2010; Tamama et al., 2011). The list of genes coding

cytokines, growth factor and their receptors, as well as other molecules exhibiting the “HIF-1-binding sequence”—hypoxia response element (HRE), is long (reviewed in Semenza, 2007). Our results suggest that at least in part, this effect could be operated by IL-6 (Ulich et al., 1991; Rodriguez et al., 2004) whose production by MSC is stimulated at low O_2 concentration. This viewpoint is in line with recent literature data, demonstrating a decrease of expansion of hematopoietic cells cultivated with bone marrow MNC supernatants treated with an IL-6 inhibitor. This effect was only observed with the supernatant from low O_2 concentration culture (Li et al., 2011). Similarly, the positive effects on committed progenitors in co-cultures at low O_2 concentration upon IL-17 stimulation seem to be associated with an increased IL-6 secretion (Krstic et al., 2009). Furthermore, this scenario is supported by data obtained with murine bone marrow cells: the exogenous IL-6 synergizes with the low O_2 concentration (1%) to functionally maintain the pre-CFCs sub-population, an effect undetectable at 20% O_2 (Kovacevic-Filipovic et al., 2007).

In conclusion, the data presented in this article firmly support the thesis that low O_2 concentration is a physiological regulator of hematopoiesis. In fact, it would be better to say that the data obtained in cultures at low O_2 concentrations approximate better the physiological reality and therefore, some data obtained at 20% O_2 might be rather considered as an artifact than as a “standard” control (Ivanovic, 2009).

In addition, from a biological viewpoint (excluding safety and technology considerations), a co-culture with mesenchymal stromal cells seems to be an interesting start-point for development of clinical grade ex vivo expansion procedure.

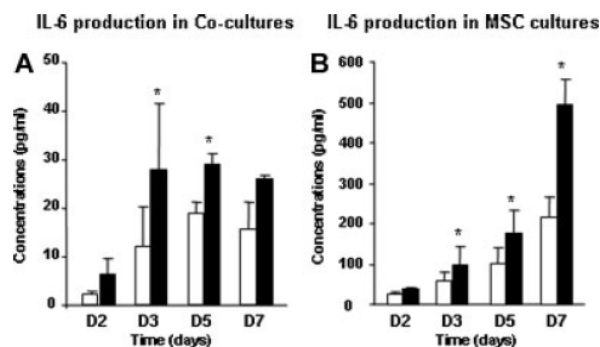


Fig. 6. Time-course of IL-6 production in co-cultures and MSC cultures. **A:** Co-cultures of MSC with hematopoietic CD34⁺ cells. **B:** MSC cultures. White bars = 20% O_2 ; Black bars = 5% O_2 ; n = 4–8; * $P < 0.05$.

Acknowledgments

The authors would like to thank Pr Patrick Blanco's team for the cytokine analysis using a Luminex technology as well as to Mrs Elisabeth Volkmann for language corrections. This study was

supported by funds of R&D Aquitaine-Limousin Branch of French Blood Institute (Bordeaux).

Literature Cited

- Annabi B, Lee YT, Turcotte S, Naud E, Desrosiers RR, Champagne M, Eliopoulos N, Galipeau J, Béliveau R. 2003. Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. *Stem Cells* 21:337–347.
- Carrancio S, López-Holgado N, Sánchez-Guijo FM, Villarrón E, Barbado V, Tabera S, Díez-Campelo M, Blanco J, San Miguel JF, Del Cañizo MC. 2008. Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp Hematol* 36:1014–1021.
- Carrera S, de Verdier PJ, Khan Z, Zhao B, Mahale A, Bowman KJ, Zainol M, Jones GD, Lee SW, Aaronson SA, Macip S. 2010. Protection of cells in physiological oxygen tensions against DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem* 285:13658–13665.
- Chivu M, Diaconu CC, Bleotu C, Alexiu I, Brasoveanu L, Cernescu C. 2004. The comparison of different protocols for expansion of umbilical-cord blood hematopoietic stem cells. *J Cell Mol Med* 8:223–231.
- Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. 2001. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J* 81:685–696.
- Cipolleschi MG, Dello Sbarba P, Olivetto M. 1993. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* 82:2031–2037.
- Csete M. 2005. Oxygen in the cultivation of stem cells. *Ann NY Acad Sci* 1049:1–8.
- Danet GH, Pan Y, Luongo JL, Bonnet DA, Simon MC. 2003. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *J Clin Invest* 112:126–135.
- Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. 1977. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* 91:335–344.
- Dos Santos F, Andrade PZ, Boura JS, Abecasis MM, da Silva CL, Cabral JM. 2010. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: A more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J Cell Physiol* 223:27–35.
- Blasson P, Rehn M, Hammar P, Larsson P, Sirenko O, Filippin LA, Cammenga J, Jönsson JL. 2010. Hypoxia mediates low cell-cycle activity and increases the proportion of long-term-reconstituting hematopoietic stem cells during in vitro culture. *Exp Hematol* 38:301.e2–310.e2.
- Fan J, Cai H, Tan WS. 2007. Role of the plasma membrane ROS-generating NADPH oxidase in CD34⁺ progenitor cells preservation by hypoxia. *J Biotechnol* 130:455–462.
- Fan J, Cai H, Yang S, Yan L, Tan W. 2008. Comparison between the effects of normoxia and hypoxia on antioxidant enzymes and glutathione redox state in ex vivo culture of CD34⁺ cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 151:153–158.
- Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterlugauer H, Reitering S, Kloss F, Güllig C, Gassner R, Leppendinger G. 2007. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell* 6:745–757.
- Fei XM, Wu YJ, Chang Z, Miao KR, Tang YH, Zhou XY, Wang LX, Pan QQ, Wang CY. 2007. Co-culture of cord blood CD34⁺ cells with human BM mesenchymal stromal cells enhances short-term engraftment of cord blood cells in NOD/SCID mice. *Cytotherapy* 9:338–347.
- Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, Bunnell B, Ma T. 2006. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J Cell Physiol* 207:331–339.
- Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. 2007. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 358:948–953.
- Guitart AV, Hammoud M, Dello Sbarba P, Ivanovic Z, Praloran V. 2010. Slow-cycling/quiescence balance of hematopoietic stem cells is related to physiological gradient of oxygen. *Exp Hematol* 38:847–851.
- Hermite F, Brunet de la Grange P, Belloc F, Praloran V, Ivanovic Z. 2006. Very low O₂ concentration (0.1%) favors G0 retention of dividing CD34⁺ cells. *Stem Cells* 24:65–73.
- Hess DA, Meyerrose TE, Wirthlin L, Craft TP, Herrbrich PE, Creer MH, Nolta JA. 2004. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood* 104:1648–1655.
- Hess DA, Wirthlin L, Craft TP, Herrbrich PE, Hohm SA, Lahey R, Eades WC, Creer MH, Nolta JA. 2006. Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood* 107:2162–2169.
- Huang GP, Pan ZJ, Jia BB, Zheng Q, Xie CG, Gu JH, McNiece IK, Wang JF. 2007. Ex vivo expansion and transplantation of hematopoietic stem/progenitor cells supported by mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *Cell Transplant* 16:579–585.
- Isidori A, Motta MR, Tani M, Terragna C, Zinzani P, Curti A, Rizzi S, Taioli S, Giudice V, D'Addio A, Gugliotta G, Conte R, Baccarani M, Lemoli RM. 2007. Positive selection and transplantation of autologous highly purified CD133⁺ stem cells in resistant/relapsed chronic lymphocytic leukemia patients results in rapid hematopoietic reconstitution without an adequate leukemic cell purging. *Biol Blood Marrow Transplant* 13:1224–1232.
- Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuo S, Miyamoto K, Ohmura M, Naka K, Hosokawa K, Ikeda Y, Suda T. 2006. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 12:446–451.
- Ivanovic Z. 2004. Interleukin-3 and ex vivo maintenance of hematopoietic stem cells: Facts and controversies. *Eur Cytokine New* 15:6–13.
- Ivanovic Z. 2009. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *J Cell Physiol* 219:271–275.
- Ivanovic Z, Boiron JM. 2009. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells: Concept and clinical benefit. *Transfus Clin Biol* 16:489–500.
- Ivanovic Z, Dello Sbarba P, Trimoreau F, Faucher JL, Praloran V. 2000. Primitive human HPCs are better maintained and expanded in vitro at 1 percent oxygen than at 20 percent. *Transfusion* 40:1482–1488.
- Ivanovic Z, Belloc F, Faucher JL, Cipolleschi MG, Praloran V, Dello Sbarba P. 2002. Hypoxia maintains and interleukin-3 reduces the pre-colony-forming cell potential of dividing CD34⁺ murine bone marrow cells. *Exp Hematol* 30:67–73.
- Ivanovic Z, Hermite F, Brunet de la Grange P, Dazey B, Belloc F, Lacombe F, Vezon G, Praloran V. 2004. Simultaneous maintenance of human cord blood SCID-repopulating cells and expansion of committed progenitors at low O₂ concentration (3%). *Stem Cells* 22:716–724.
- Ivanovic Z, Duchez P, Chevalere J, Vlaski M, Lafarge X, Dazey B, Robert-Richard E, Mazurier F, Boiron JM. 2011. Clinical-scale cultures of cord blood CD34⁺ cells to amplify committed progenitors and maintain stem cell activity. *Cell Transplant* 20 (in press). DOI: 10.3727/096368910X552853
- Jang YY, Sharkis SJ. 2007. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood* 110:3056–3063.
- Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M. 2001. Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J* 15:1312–1314.
- Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. 1996. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol* 271:C1172–C1180.
- Jin Y, Kato T, Furu M, Nasu A, Kajita Y, Mitsui H, Ueda M, Aoyama T, Nakayama T, Nakamura T, Toguchida J. 2010. Mesenchymal stem cells cultured under hypoxia escape from senescence via down-regulation of p16 and extracellular signal regulated kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 391:1471–1476.
- Kiritto K, Hu Y, Komatsu N. 2009. HIF-1 prevents the overproduction of mitochondrial ROS after cytokine stimulation through induction of PDK-1. *Cell Cycle* 8:2844–2849.
- Koller MR, Bender JG, Miller WM, Papoutsakis ET. 1992a. Reduced oxygen tension increases hematopoiesis in long-term culture of human stem and progenitor cells from cord blood and bone marrow. *Exp Hematol* 20:264–270.
- Koller MR, Bender JG, Papoutsakis ET, Miller WM. 1992b. Effects of synergistic cytokine combinations, low oxygen, and irradiated stroma on the expansion of human cord blood progenitors. *Blood* 80:403–411.
- Kovacevic-Filipovic M, Petakov M, Hermitte F, Debeissat C, Krstic A, Jovicic G, Bugarski D, Lafarge X, Milenkovic P, Praloran V, Ivanovic Z. 2007. Interleukin-6 (IL-6) and low O₂ (2) concentration (1%) synergize to improve the maintenance of hematopoietic stem cells (pre-FCF). *J Cell Physiol* 212:68–75.
- Krstic A, Vlaski M, Hammoud M, Chevalere J, Duchez P, Jovicic G, Bugarski D, Milenkovic P, Boiron JM, Praloran V, Ivanovic Z. 2009. Low O₂ concentrations enhance the positive effect of IL-17 on the maintenance of erythroid progenitors during co-culture of CD34⁺ and mesenchymal stem cells. *Eur Cytokine New* 20:10–16.
- Kubo M, Li TS, Suzuki R, Shirasawa B, Morikage N, Oshima M, Qin SL, Hamano K. 2008. Hypoxic preconditioning increases survival and angiogenic potency of peripheral blood mononuclear cells via oxidative stress resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H590–H595.
- Laurentieva A, Majore I, Kasper C, Hass R. 2010. Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. *Cell Commun Signal* 16:18.
- Li N, Feugier P, Serrurier B, Latger-Cannard V, Lesesve JF, Stoltz JF, Eljaafari A. 2007. Human mesenchymal stem cells improve ex vivo expansion of adult human CD34⁺ peripheral blood progenitor cells and decrease their allostimulatory capacity. *Exp Hematol* 35:507–515.
- Li Z, Wei H, Deng L, Cong X, Chen X. 2010. Expression and secretion of interleukin-1β, tumour necrosis factor-α and interleukin-10 by hypoxia- and serum-deprivation-stimulated mesenchymal stem cells. *FEBS J* 277:3688–3698.
- Li P, Huang J, Tian HJ, Huang QY, Jiang CH, Gao YQ. 2011. Regulation of bone marrow hematopoietic stem cell is involved in high-altitude erythrocytosis. *Exp Hematol* 39:37–46.
- Loeffler M, Pantel K, Wulff H, Wichmann HE. 1989. A mathematical model of erythropoiesis in mice and rats. Part I: Structure of the model. *Cell Tissue Kinet* 22:13–30.
- Magn AS, Körfer NR, Partenheimer H, Lange C, Zander A, Noll T. 2009. Primary cells as feeder cells for coculture expansion of human hematopoietic stem cells from umbilical cord blood—A comparative study. *Stem Cells Dev* 18:173–186.
- McNiece I, Harrington J, Turney J, Kellner J, Shpall EJ. 2004. Ex vivo expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 4:311–317.
- Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD. 2007. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:5431–5436.
- Potier E, Ferreira E, Andriamananjana R, Pujol JP, Oudina K, Logeart-Avramoglou D, Petite H. 2007. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone* 40:1078–1087.
- Robert-Richard E, Ged C, Ortel J, Santarelli X, Lamrissi-Garcia I, de Verneuil H, Mazurier F. 2006. Human cell engraftment after busulfan or irradiation conditioning of NOD/SCID mice. *Haematologica* 91:1384.
- Robinson SN, Ng J, Niu T, Yang H, McMannis JD, Karandish S, Kaur I, Fu P, Del Angel M, Messinger R, Flagg F, de Lima M, Decker W, Xing D, Champlin R, Shpall EJ. 2006. Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant* 41:359–366.
- Robinson SN, Simmons PJ, Yang H, Alousi AM, Marcos de Lima J, Shpall EJ. 2011. Mesenchymal stem cells in ex vivo cord blood expansion. *Best Pract Res Clin Haematol* 24:83–92.
- Rodriguez Mdel C, Bernad A, Aracil M. 2004. Interleukin-6 deficiency affects bone marrow stromal precursors, resulting in defective hematopoietic support. *Blood* 103:3349–3354.
- Rosová I, Diao M, Capocchia B, Link D, Nolta JA. 2008. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26:2173–2182.
- Schofield R. 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4:7–25.
- Semenza GL. 2007. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem J* 405:1–9.
- Shima H, Takubo K, Iwasaki H, Yoshitani H, Gomei Y, Hosokawa K, Arai F, Takahashi T, Suda T. 2009. Reconstitution activity of hypoxic cultured human cord blood CD34⁺ cells in NOG mice. *Biochem Biophys Res Commun* 378:467–472.
- Simsek T, Kocbas F, Zheng J, Deberardinis RJ, Mahmoud AI, Olson EN, Schneider JW, Zhang CC, Sadek HA. 2010. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 7:380–390.
- Song K, Zhao G, Liu T, Zhang L, Ma X, Liu J, Cui Z. 2009. Effective expansion of umbilical cord blood hematopoietic stem/progenitor cells by regulation of microencapsulated osteoblasts under hypoxic condition. *Biotechnol Lett* 31:923–928.
- Storms RW, Trujillo AP, Springer JB, Shah L, Colvin OM, Ludeman SM, Smith C. 1999. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9118–9123.
- Tamara K, Kawasaki H, Kerpedjieva SS, Guan J, Ganju RK, Sen CK. 2011. Differential roles of hypoxia inducible factor subunits in multipotential stromal cells under hypoxic condition. *J Cell Biochem* 112:804–817.
- Tsai CC, Chen YJ, Yew TL, Chen LL, Wang JY, Chiu CH, Hung SC. 2011. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood* 117:459–469.
- Ulrich TR, del Castillo J, Yin SM, Egrie JC. 1991. The erythropoietic effects of interleukin 6 and erythropoietin in vivo. *Exp Hematol* 19:29–34.
- Van Overstraeten-Schlögel N, Beguin Y, Gothot A. 2006. Role of stromal-derived factor-1 in the hematopoietic-supporting activity of human mesenchymal stem cells. *Eur J Haematol* 76:488–493.
- Vlaski M, Lafarge X, Chevalere J, Duchez P, Boiron JM, Ivanovic Z. 2009. Low oxygen concentration as a general physiologic regulator of erythropoiesis beyond the EPO-related

- downstream tuning and a tool for the optimization of red blood cell production ex vivo. *Exp Hematol* 37:573–578.
- Walenda T, Bork S, Horn P, Wein F, Saffrich R, Diehlmann A, Eckstein V, Ho AD, Wagner W. 2010. Co-culture with mesenchymal stromal cells increases proliferation and maintenance of haematopoietic progenitor cells. *J Cell Mol Med* 14:337–350.
- Wang JF, Wang LJ, Wu YF, Xiang Y, Xie CG, Jia BB, Harrington J, McNiece IK. 2004. Mesenchymal stem/progenitor cells in human umbilical cord blood as support for ex vivo expansion of CD34 (+) hematopoietic stem cells and for chondrogenic differentiation. *Haematologica* 89:837–844.
- Winkler IG, Barbier V, Wadley R, Zannettino AC, Williams S, Lévesque JP. 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* 116:375–385.
- Yahata T, Takanashi T, Muguruma Y, Ibrahim AA, Matsuzawa H, Uno T, Sheng Y, Onizuka M, Ito M, Kato S, Ando K. 2011. Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. *Blood* 118: [Epub ahead of print]. DOI 10.1182/blood-2011-01-330050
- Yamaguchi M, Hirayama F, Wakamoto S, Fujihara M, Murahashi H, Sato N, Ikebuchi K, Sawada K, Koike T, Kuwabara M, Azuma H, Ikeda H. 2002. Bone marrow stromal cells prepared using AB serum and bFGF for hematopoietic stem cells expansion. *Transfusion* 42:921–927.
- Zhambalova AP, Darevskaya AN, Kabaeva NV, Romanov YA, Buravkova LB. 2009. Specific interaction of cultured human mesenchymal and hemopoietic stem cells under conditions of reduced oxygen content. *Bull Exp Biol Med* 147:525–530.
- Zhang Y, Li C, Jiang X, Zhang S, Wu Y, Liu B, Tang P, Mao N. 2004. Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture- initiating cells from cord blood CD34⁺ cells. *Exp Hematol* 32:657–664.

Résumé de l'article

La conclusion principale de cette étude est la suivante : l'association de concentrations d'O₂ assez faibles (1,5% d'O₂) à la co-culture avec des CSM assure non seulement le maintien des cellules souches (SRC) du greffon, mais assure aussi l'amélioration de leur capacité de prolifération et d'auto-renouvellement. Ceci a été mis en évidence grâce au test de xénogreffe qui montre une meilleure efficacité de greffe chez les souris injectées avec des cellules provenant de la condition co-culture à 1.5% O₂ et même supérieur au témoin de cellules J0. Ces conditions ont également permis de préserver une grande capacité de repeuplement de la culture secondaire soulignant donc le maintien de cellules avec une capacité proliférative plus importante et notamment de cellules très primitives (activité pré-CFC).

Ainsi, nos résultats confirment le rôle majeur du micro-environnement - représenté dans notre modèle par les cellules stromales mésenchymateuses et les BC-O₂ - pour le maintien des cellules souches en modulant la stimulation excessive par les cytokines exogènes. D'autre part, ils confirment notre hypothèse de départ selon laquelle la reproduction *in vitro* de cet environnement, bien qu'encore imparfaite, optimiserait le greffon hématopoïétique en termes de quantité et de qualité.

De façon attendue, cette amélioration de la primitivité cellulaire a été accompagnée par une diminution de la stimulation de l'expansion de cellules totale, de CFC et de cellules CD34⁺ par rapport à la condition de co-culture en oxygénation classique. Cependant, il faut noter que l'expansion obtenue avec la co-culture aux BC-O₂ était comparable à celle produite suite à la culture classique à 20% d'O₂.

Dans nos conditions, nous avons constaté que le taux des cellules CD34⁺ CD133⁺, ainsi que l'activité de l'ALDH dans la population CD34⁺ se comportaient à l'égard de la concentration d'O₂ de la même façon que le nombre de progéniteurs engagés, c'est-à-dire, une diminution de l'expression parallèle à la baisse de concentrations d'O₂. Ces cellules CD34⁺ CD133⁺ et CD34⁺ ALDH⁺ reflètent et représentent donc en réalité très majoritairement des progéniteurs engagés (en quantité écrasante par rapport aux cellules primitives).

L'interleukine-3 ajoutée dans nos expériences n'a pas provoqué de différenciation massive de CSH, mais a montré au contraire, un effet bénéfique sur leur maintien (détaillé dans le chapitre

suivant). Ceci est probablement lié au fait que nous l'avons utilisée à faible dose et dans un milieu de culture sans sérum.

Au stade actuel de notre travail, nos résultats suggèrent que l'IL-6 dont la production par les CSM est stimulée à faible taux d'O₂ pourrait être impliquée dans l'effet positif des BC-O₂ associées aux CSM sur le maintien de CSH.

Cependant, vu le vaste spectre de facteurs produits par les CSM, d'autres facteurs solubles sont susceptibles d'avoir une contribution dans l'interaction CSM/(CSH/PH). C'est pourquoi, dans la suite de notre travail, nous avons effectué le dosage des cytokines dans les surnageants de cultures en réalisant également des tests fonctionnels sur ces surnageants.

Ainsi, d'après les données présentées dans cette étude, nous pouvons conclure que la présence des cellules stromales mésenchymateuses associée à des concentrations en O₂ suffisamment faibles pourrait fournir un point de départ intéressant pour développer une procédure d'expansion *ex vivo* de greffon hématopoïétique de grade clinique.

II. RESULTATS COMPLEMENTAIRES

- Expansion *ex vivo* de cellules CD34⁺ en co-culture avec des CSM à basses concentrations d'O₂ (BC-O₂)
- Rôle de l'IL-3

Comme cela a été évoqué précédemment, l'IL-3 a montré, dans certaines conditions, un effet positif sur le maintien de CSH.

Dans une précédente étude, notre équipe avait déjà montré que l'IL-3 à faible dose (0,5 ng/mL) pourrait avoir un effet positif sur le maintien de CSH dans un milieu sans sérum (Ivanovic et al., 2004b; 2004a). Cette dose est, en effet, considérablement inférieure à celles qui figurent classiquement dans la littérature. Nous avons donc voulu tester la contribution d'IL-3 à cette dose de 0,5 ng/mL dans notre protocole d'expansion.

Les résultats publiés dans mon article concernaient uniquement mes expériences en présence d'IL-3. Afin de mettre en évidence l'intérêt de cette cytokine, nous avons effectué en parallèle des expériences identiques mais sans IL-3 puis nous avons comparé ces résultats avec ceux en présence d'IL-3. Ainsi, brièvement, nous avons réalisé, dans cette condition, la co-culture de cellules CD34⁺ du SP avec des CSM à 20, à 5 et à 1,5% d'O₂ pendant 10 jours et en présence des autres cytokines : TPO, SCF et G-CSF. Nous avons finalement évalué :

- Le taux d'expansion de cellules totales, de progéniteurs CFC et de cellules CD34⁺ ;
- Le phénotype du produit d'expansion ;
- Le maintien de l'activité SRC (xénogreffe aux souris)

D'abord, nous avons analysé l'effet de l'IL-3 dans les différentes conditions de culture primaire.

II.A. Effet d'IL-3 sur le taux d'expansion de cellules totales

Comme ce que montre la Figure (20), au niveau du taux d'expansion de cellules totales à J10, nous n'avons pas noté de différence significative entre +IL-3 et -IL-3 dans chacune de nos conditions que ce soit en fonction de la concentration d'O₂ ou en fonction de la présence ou de l'absence de stroma.

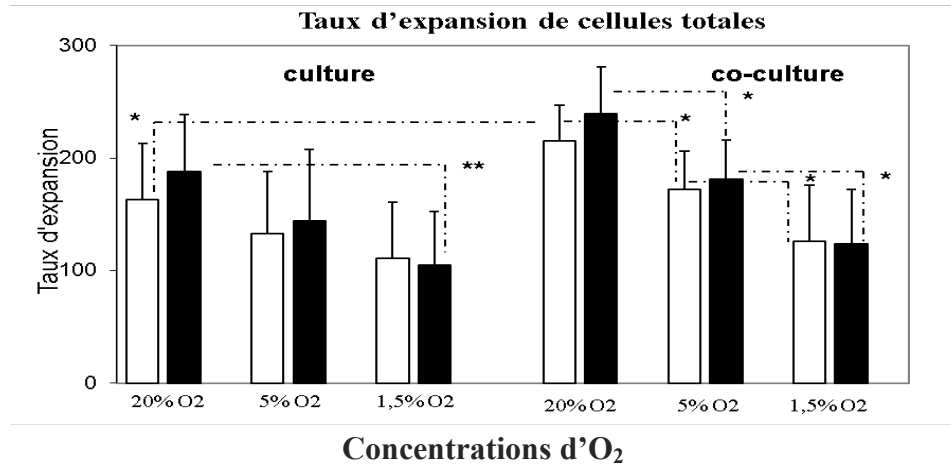


Figure 20 : Taux d'expansion des cellules totales.

Le taux d'expansion des cellules totales à J10 de co-culture (CO) ou de culture simple (S) à 20, 5 et 1,5% d'O₂. Les barres blanches et noires représentent les conditions – IL-3 et + IL-3 respectivement. Ces résultats représentent la moyenne de taux d'expansion ± écartype (T-test : * p<0.05 ; ** P<0,01 ; n =10). (CO- 20%> S- 20% *; CO+ 20%> CO+ 5% *; CO- 20% > CO- 5% *; CO+ 5% > CO+ 1,5% *; CO- 5% > CO- 1,5% * ; S+ 20% > S+ 1,5% **).

II.B. Effet d'IL-3 sur le taux d'expansion des cellules CD34⁺

Sur le taux d'expansion des cellules CD34⁺, l'IL-3 n'a pas prouvé son effet de façon significative. A noter malgré tout, une tendance de l'IL-3 à renforcer l'expansion des cellules CD34⁺ dans les conditions de co-culture (Figure 21).

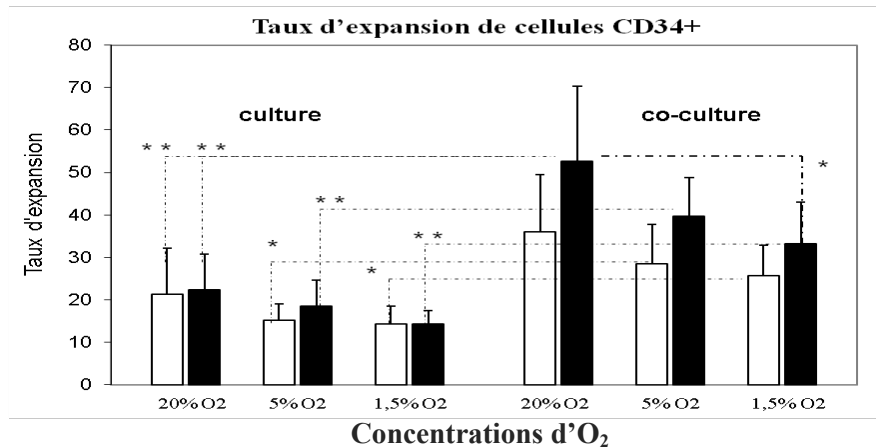


Figure 21 : Taux d'expansion des cellules CD34⁺.

Le taux d'expansion des cellules CD34⁺ à J10 co-culture (CO) ou de culture simple (S) à 20, à 5 et à 1,5% d'O₂. Les barres blanches et noires représentent les conditions – IL-3 et + IL-3 respectivement. Ces résultats représentent la moyenne du taux d'expansion ± écartype (T-test : * p<0.05 ; ** P<0,01 ; n =10). (CO+ 20% > CO+ 1,5% * ; CO+ 20% > S+ 20% **; CO+ 20% > S- 20% *; CO+ 5% > S+ 5% **; CO- 5% > S- 5% * ; CO+ 1,5% > S+ 1,5% **; CO- 1,5% > S- 1,5% *).

II.C. Effet d'IL-3 sur le taux d'expansion de CFC

L'IL-3 a majoré le taux d'expansion de CFC mis en évidence à J 10 de culture. Cependant, des différences significatives n'ont été observées que dans la culture simple à 20% d'O₂ et dans la co-culture 5% d'O₂ (Figure 22).

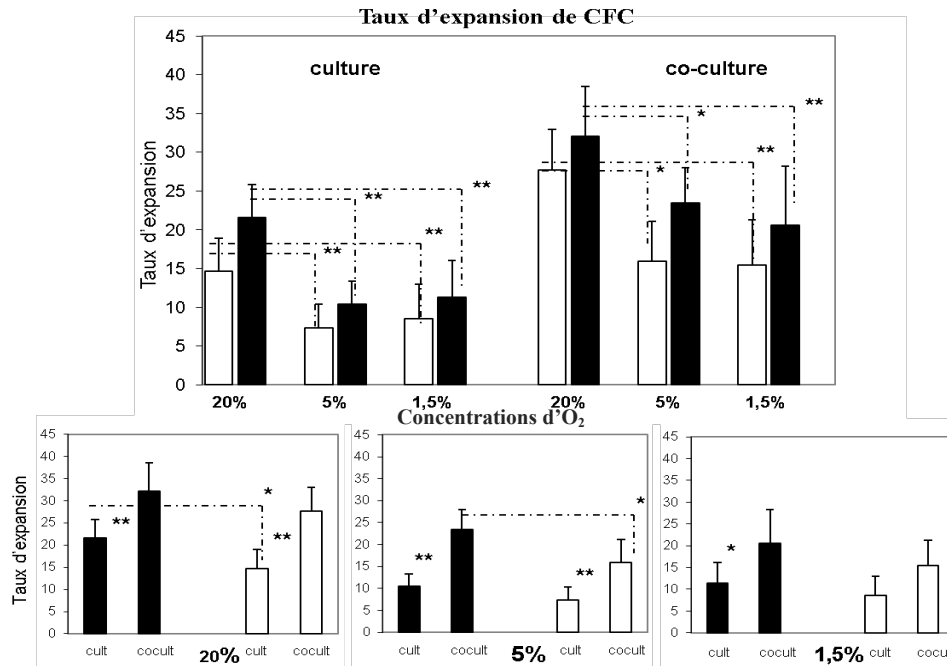


Figure 22 : Taux d'expansion des progéniteurs CFC.

Le taux d'expansion des progéniteurs CFC à J10 de co-culture (CO) ou de culture simple (S) à 20, 5 et 1,5% d'O₂. Les barres blanches et noires représentent les conditions - IL-3 et + IL-3 respectivement. Ces résultats représentent la moyenne de taux d'expansion \pm écartype (T-test : * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; $n = 12$). (CO+ 20% > CO+ 1,5% ** ; CO+ 20% > CO+ 5% *) (CO- 20% > CO- 1,5% ** ; CO- 20% > CO- 5% *) (S+ 20% > S+ 1,5% ** ; S+ 20% > S+ 5% **) (S- 20% > S- 1,5% ** ; S- 20% > S- 5% **) (CO+ 5% > CO- 5% * ; S+ 20% > S- 20% *).

Nous pouvons donc conclure que, hormis le taux de CFC dans quelques conditions, l'IL-3 n'a pas montré de rôle majeur sur les paramètres quantitatifs du produit d'expansion.

Dans ces expériences sans IL-3, nous avons observé que la tendance du rôle des CSM ainsi que des BC-O₂ sur l'expansion était relativement comparable à ce que nous avons démontré en présence d'IL-3. Ainsi, la diminution de concentrations d'O₂ (de 20 à 5 et 1,5%) provoque une diminution relative et significative du taux d'expansion des cellules totales à la fois dans la culture et dans la co-culture (20% CO- vs 5% CO- ; 5% CO- vs 1,5% CO- ; 20% S- vs 1,5% S-).

(Figure 20). L'expansion des cellules totales en co-culture est augmentée par rapport à la culture simple, néanmoins elle n'est statistiquement significative qu'à 20% d'O₂ (20% CO- vs 20% S-) (Figure 20).

Quant à l'expansion de cellules CD34⁺, elle est plus importante en co-culture qu'en culture simple avec une significativité à 5 et 1,5% d'O₂ (Figure 21). En revanche, dans ces expériences sans IL-3, la diminution des concentrations d'O₂ n'induit pas de différences importantes (Figure 21).

Enfin, l'analyse de l'expansion de progéniteurs engagés (CFU-GM, BFU-E et CFU mix) prouve que la co-culture induit une forte expansion par rapport à la culture simple (à l'exception de la condition 1,5% d'O₂ où la différence observée n'est pas significative). C'est à la concentration d'O₂ de 20% que l'expansion des CFC est la plus importante avec des valeurs environ 2 fois supérieures à celles observées à BC-O₂ à la fois en co-culture et en culture simple (Figure 22).

Cependant, il faut signaler que la co-culture aux faibles concentrations d'O₂ (5 et 1,5%) a égalé voire amélioré (dans certaines conditions) le taux d'expansion affiché avec la condition de la culture classique à 20% O₂ en ce qui concerne les cellules totales, les cellules CD34⁺ et les CFC.

II.D. Phénotypage en fin de culture (J10) réalisé sur les cellules totales

II.D.1. Marqueurs mégacaryocytaires CD41 et CD61

Le taux d'expression de ces marqueurs sur les cellules totales à la fin de culture primaire se situe aux alentours de 6%. Cependant, aux faibles concentrations d'O₂, nous constatons que la présence de la couche stromale ainsi que l'IL-3 est indispensable afin de préserver cette expression, à défaut, la production des progéniteurs mégacaryocytaires baisse considérablement (statistiquement significatif) (Figure 23a). Ceci se caractérise par une expression de CD41 et CD61 très basse en culture simple sans IL-3 par rapport à la co-culture en présence d'IL-3 à 5 et 1,5% O₂.

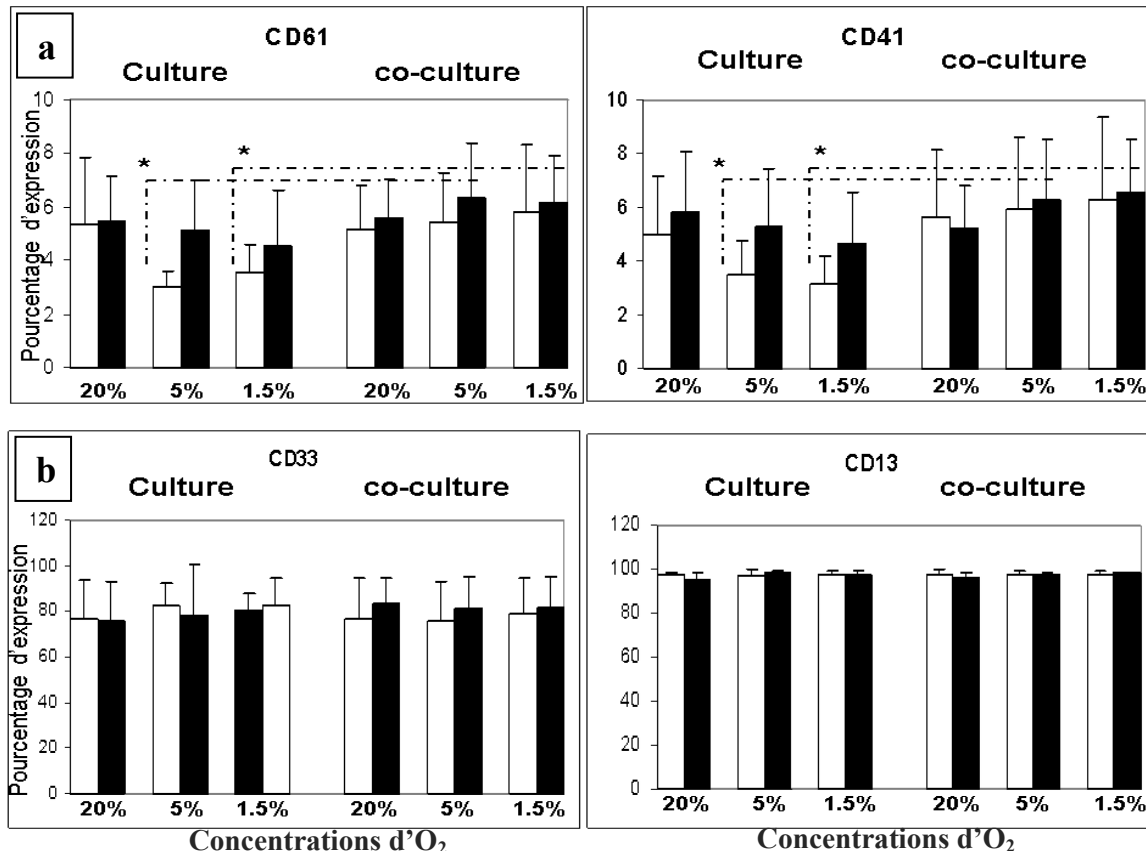


Figure 23 : Marqueurs mégacaryocytaires CD41 et CD61.

La moyenne de pourcentage de l'expression des marqueurs mégacaryocytaires CD41 et CD61(a) et des marqueurs myéloïdes CD13 et CD33 (b) sur les cellules totales à la fin de culture primaire. Les barres blanches et noires représentent les conditions – IL-3 et + IL-3 respectivement. Ces résultats représentent la moyenne de pourcentages d'expression \pm écartype (T-test : * $p < 0.05$; ** $P < 0,01$; $n = 8$). (a): CO+ 1,5% d'O₂ > S- 1,5% d'O₂ * ; CO+ 5% d'O₂ > S- 5% d'O₂ *. (b) non significatif.

II.D.2. Marqueurs myéloïdes (CD13 et CD33) et marqueur lymphoïde B CD19

Le taux d'expression de ces marqueurs CD13 et CD33 sur les cellules totales à la fin de culture primaire était très élevé (environ 95% et 80% respectivement) sans noter de différences importantes liées à nos conditions de culture (O₂, CSM, IL-3) (Figure 23b).

Quant au marqueur CD19, son expression n'a été détectable à J10 dans aucune de nos conditions de culture ce qui exclurait une éventuelle différenciation lymphocytaire B.

II.D.3. Marqueurs de « primitivité » CD133, ALDH et CD90

II.D.3.1. L'expression du marqueur CD133

L'expression du marqueur CD133 a été testée, conjointement avec l'activité d'ALDH, sur les cellules CD34⁺ sélectionnées en fin de culture dans les conditions avec ou sans IL-3.

Nos résultats montrent qu'en conditions de co-culture, la baisse des concentrations d'O₂ conduit à la diminution du pourcentage de cellules CD34⁺ CD133⁺. Cette diminution est statistiquement significative à 1,5% d'O₂ (environ 74% à 20% d'O₂ versus environ 50% à 1,5% d'O₂) (Figure 24). Inversement, le pourcentage de cellules CD34⁺ CD133⁻ est plus important à 1,5% d'O₂. Ces résultats sont comparables en présence ou en absence d'IL-3 sauf qu'en son absence la différence entre 20% et 5% d'O₂ devient significative.

Des résultats à partir des cellules CD34⁺ isolées des cultures simples montrent la même tendance mais sans que la différence soit statistiquement significative (résultats non montrés).

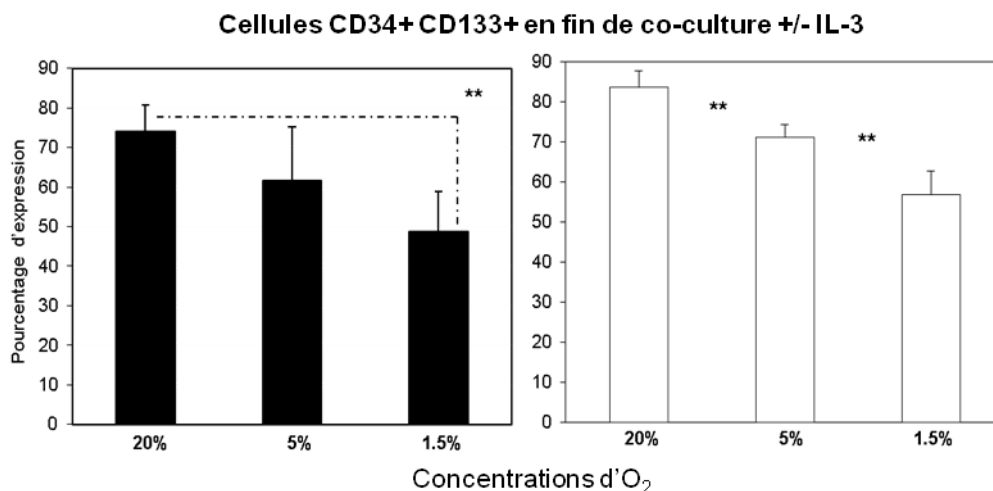


Figure 24 : Pourcentage de cellules CD133⁺ CD34⁺.

La moyenne de pourcentage de cellules CD133⁺ parmi les cellules CD34⁺ sélectionnées à la fin de co-culture avec IL-3 (en noir à gauche) ou sans IL-3 (en blanc à droite). Ces résultats représentent la moyenne d'expression \pm écartype (T-test : * $p < 0.05$; ** $P < 0,01$; $n = 6$ pour +IL-3 et 4 pour - IL-3).

II.D.3.2. L'activité de l'ALDH

Dans un premier temps, nous avons tenté d'évaluer l'activité d'ALDH sur les cellules totales en fin de culture primaire, mais sans succès. Nous avons finalement réalisé cette analyse en combinaison avec l'expression de l'antigène CD133 sur les cellules CD34⁺ préalablement isolées à l'issue de la culture primaire.

Les deux concentrations 5% et 1,5% d'O₂ ont entraîné une nette diminution (la moitié) du pourcentage des cellules CD34⁺ présentant une activité d'ALDH (environ 15% et 10% respectivement versus environ 30% à 20% d'O₂) (Figure 25).

L'activité d'ALDH a suivi la même tendance sur les populations CD34⁺ CD133⁺ et CD34⁺ CD133⁻ bien que les variations ainsi que le taux de positivité aient été moins importants (résultats non montrés).

De même, l'analyse de l'activité d'ALDH en co-culture sans IL-3 a montré un taux de cellules CD34⁺ présentant cette activité plus importante à 20% d'O₂ par rapport aux BC-O₂, avec cependant des valeurs mesurées inférieures en comparaison à la culture en présence d'IL-3.

La fraction CD34⁻ n'a quant à elle pas présenté d'activité d'ALDH.

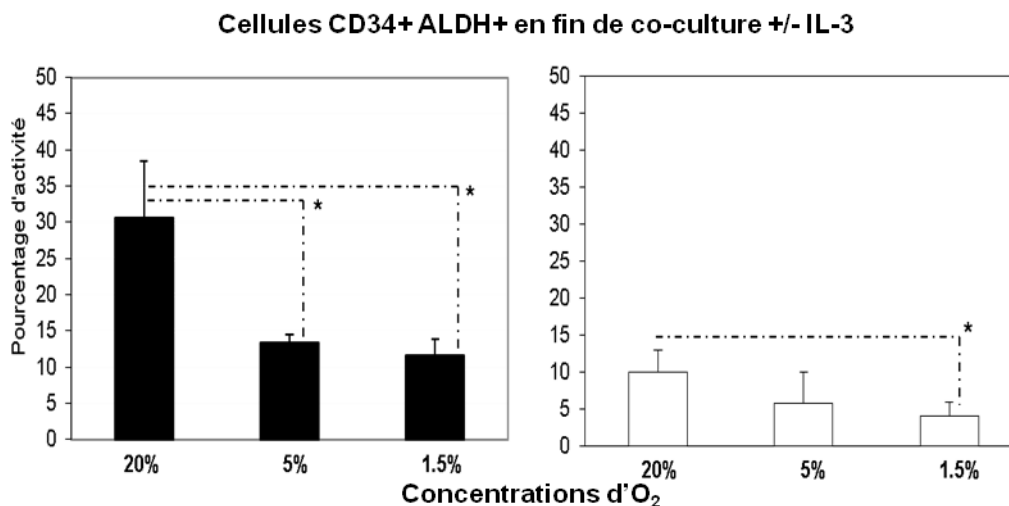


Figure 25 : Pourcentage de cellules ALDH⁺ CD34⁺.

La moyenne de pourcentage de cellules présentant l'activité d'ALDH parmi les cellules CD34⁺ sélectionnées à la fin de co-culture avec IL-3 (en noir à gauche) ou sans IL-3 (en blanc à droite). Ces résultats représentent la moyenne d'expression \pm écartype (T-test : * $p < 0.05$; ** $P < 0,01$; $n = 5$ pour +IL-3 et 4 pour - IL-3).

II.D.3.3. L'expression du marqueur CD90

Cette expression a été testée sur les cellules totales en fin de culture primaire sans que son expression soit détectée.

II.D.4. Molécules d'adhésion

Nous avons testé l'expression de VLA-4 (CD49d), LFA-1 (CD11a) et CXCR-4 (CD184) sur les cellules CD34⁺ sélectionnées en fin de culture primaire dans les conditions de co-culture.

Notre résultat n'a pas montré de différences quant à l'expression de ces molécules en fonction de concentration d'O₂, sachant qu'à 1,5% d'O₂ seules 2 expériences ont été réalisées (Figure 26). Au terme de ces expériences, nous n'avons trouvé d'effet ni des concentrations d'O₂ ni de l'IL-3 sur les expressions de ces molécules d'adhésion.

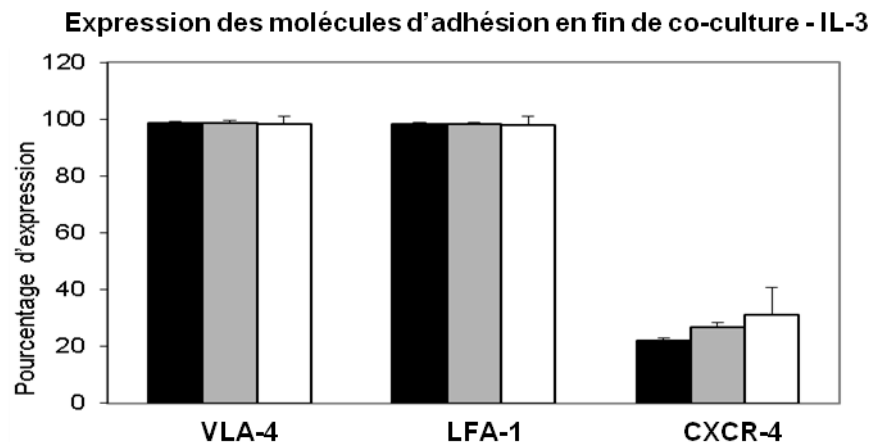


Figure 26 : Molécules d'adhésion VLA-4, LFA-1 et CXCR-4.

La moyenne de pourcentage d'expression de molécules d'adhésion VLA-4, LFA-1 et CXCR-4 sur les cellules CD34⁺ sélectionnées à la fin de co-culture sans IL-3 à 20% (en noir), à 5% (en gris) et à 1,5% d'O₂ (en blanc). (Résultats de co-culture avec IL-3 ne sont pas mentionnés). Ces résultats représentent la moyenne d'expression \pm écartype (n = 2- 4).

II.E. Activité *Scid Repopulating Cells* (SRC) - analyse de xénogreffe dans les conditions avec ou sans IL-3

L'effet de l'IL-3 le plus marquant a émergé dans l'activité SRC qui représente des cellules ayant une capacité de greffe. En effet, nous avons montré que l'IL-3 assure un meilleur maintien de cellules souches de type SRC dans les conditions de co-culture à BC-O₂, notamment à 1,5% d'O₂. Cette préservation de SRC semble IL-3 dépendante.

Nous évoquons ci-après les détails de résultats d'analyse des souris, d'abord en présence d'IL-3 (précédemment précisés dans la publication, mais pour plus de clarté j'ai choisi de les intégrer dans ces résultats) et puis sans IL-3 pour déterminer finalement son rôle exact dans ce domaine.

II.E.1. Analyses du potentiel de greffe dans les conditions avec IL-3 : SRC-CD

Comme nous l'avons décrit précédemment, la xénogreffe chez les souris NOG/SCID a été réalisée avec la descendance produite par 1000 cellules CD34⁺ du SP humain après 10 jours de culture (J10) dans les différentes conditions. Comme témoin J0, les souris reçoivent également

1000 cellules CD34⁺ du/des même(s) SP non manipulées - congelées après purification et conservées jusqu'à J10 avant d'être injectées.

Cette dose cellulaire de 1000 cellules a été choisie sur la base d'expériences déjà réalisées par notre équipe et qui montrent qu'elle représente la dilution limite dans nos conditions (cellules, souches de souris, conditionnement des souris, etc...). Elle constitue donc la dose optimale pour observer des effets sur la perte ou l'amplification des CSH de type SRC selon les conditions de cultures.

Les souris ont été analysées environ 7 à 8 semaines post-injection. Un fémur de chaque souris a été prélevé afin d'évaluer le contenu de la moelle osseuse en cellules humaines (chimérisme humain) sur la base de l'expression du marqueur pan-hématopoïétique CD45 spécifique de l'antigène humain (huCD45). Ces analyses ont effectivement révélé des différences selon les conditions de production des cellules injectées.

Comme le montre ma publication, dans les conditions +IL-3, il apparaît clairement que la co-culture préserve mieux les sous-populations souches dites « SRC-CD » que la culture simple (Figure 27a). En outre, nous avons observé que la proportion de souris positives pour l'expression du huCD45 est mieux maintenue (par rapport au T0) lorsque le taux d'O₂ diminue, y compris pour la culture simple, avec un maximum atteint pour la condition de co-culture dès 5% d'O₂ (environ 90% de souris étant positives) (Figure 27a). De ce point de vue, les co-cultures à 1,5 et à 5% d'O₂ semblent donc maintenir, voire amplifier, les SRC-CD présentes au sein de cellules de J-0.

L'analyse des souris pour le contenu en cellules huCD45 (le chimérisme humain) détectées par fémur montre que le pourcentage de ces cellules, est très accentué en conditions de « faible oxygénation-dépendante », avec un effet très marqué dans la co-culture à 1,5% d'O₂ (augmentation de taux de huCD45⁺ de l'ordre de 6 fois par rapport aux témoins de cellules J-0, valeur médiane) (figure 27b). Ce résultat conforte le meilleur maintien des SRC dans ces conditions de culture à BC-O₂.

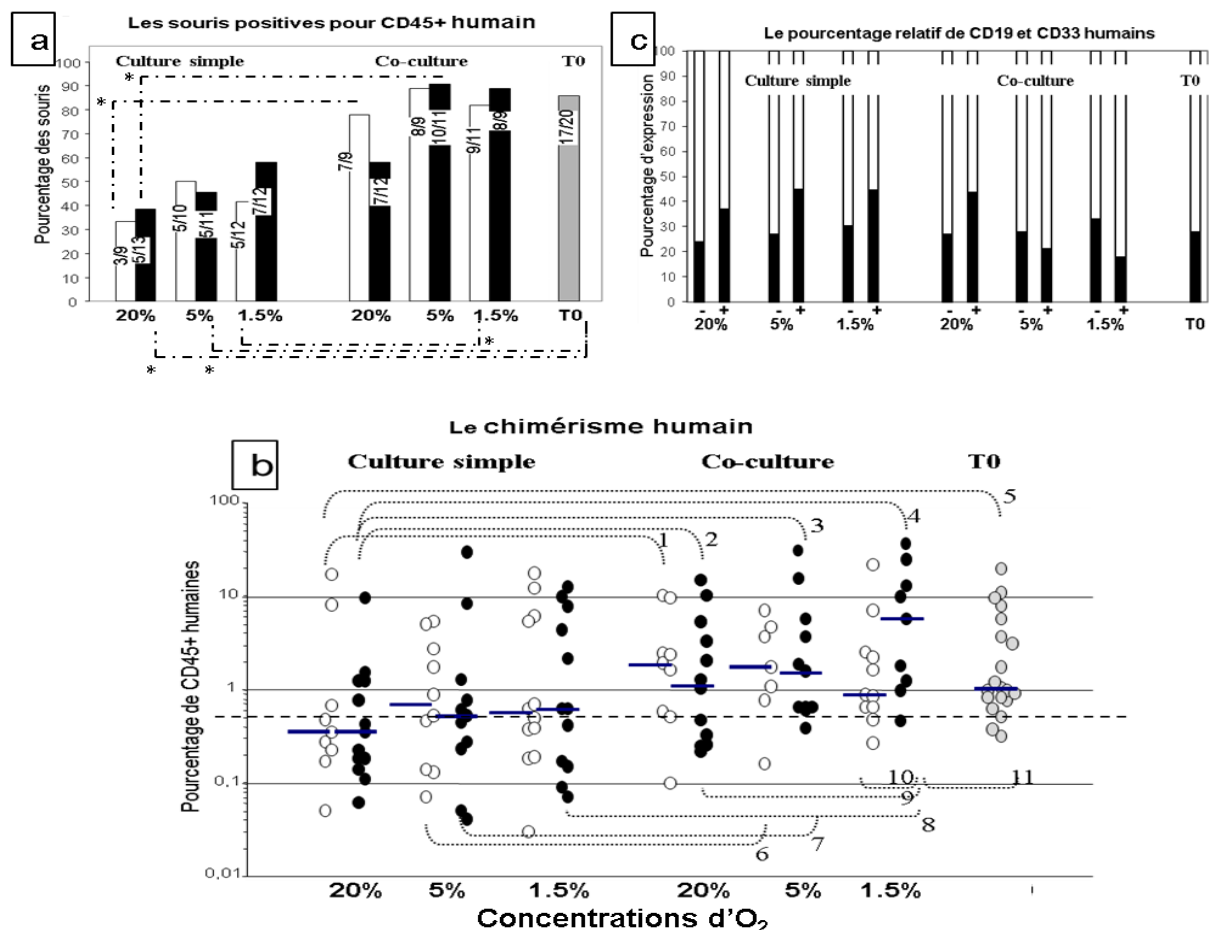


Figure 27 : Impact de BC-O₂, de CSM et d'IL-3 sur l'activité SRC-CD. L'activité *Scid Repopulating Cells* est évaluée sur la base de taux de cellules humaines CD45 (SRC-CD) (représentant le chimérisme humain chez la souris NOG/SCID). L'analyse est faite après 7 à 8 semaines d'injection de 1 000 cellules CD34⁺ placentaires (témoin de J-0) ou de leur produit d'expansion après 10 jours de cultures sans (cultures simples) ou avec CSM (co-cultures) et sans ou avec cytokine IL-3 (barres et cercles blancs et barres et cercles noirs respectivement, dans **a** et **b**) à 20%, 5%, ou 1,5% d'O₂. **a** : Fréquence des souris positives pour le marqueur CD45 humain (chimérisme humain CD45⁺ > 0,5%). Le nombre de souris positives parmi celles analysés est présenté à l'intérieur des barres pour chaque condition séparément. Nous observons que le pourcentage de souris greffées à l'égard du témoin de J0 a été maintenu dans la co-culture à de BC-O₂ (5% et 1,5%) alors qu'il est nettement réduit dans les cultures simples ($p < 0,05$). **b** : pourcentage de cellules CD45⁺ humaines dans chaque souris (les barres horizontales représentent les médianes). **c** : Proportion relative des cellules lymphoïdes B (CD19, barres blanches) et myéloïdes (CD33, barres noires) dans les cellules CD45 humaines, - et + représentent les conditions sans et avec IL-3 respectivement. Test de Mann & Whitney : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. [les chiffres mentionnés sur la figure (b) représentent les différences significatives: 1- CO- 20% > seul - 20%, 2- CO+ 20% > seul+ 20%, 3- CO+ 5% > seul+ 20%, 4- CO+ 1,5% > seul+ 20%, 5- T0 > seul- 20%, 6- CO- 5% > seul- 5%, 7- CO+ 5% > seul+ 5%, 8- CO+ 1,5% > seul+ 1,5%, 9- CO+ 1,5% > CO+ 20%, 10- CO+ 1,5% > CO- 1,5%, 11- CO+ 1,5% > T0]

Par ailleurs, l'analyse des cellules humaines lymphoïdes B (huCD19) et myéloïdes (huCD33) produites par les SRC dans la moelle osseuse des souris a montré que la combinaison de faibles taux d'O₂ avec la co-culture permet de maintenir la même répartition entre lignée lymphoïde (CD19) et myéloïdes (CD33) que celle observée pour des cellules non manipulées (témoin J0) (les différences restent pourtant non significatives). Ce résultat peut signifier que nos manipulations n'affectent pas le potentiel de différenciation des SRC (figure 27 c).

II.E.2. Analyses du potentiel de greffe dans les conditions sans IL-3 : SRC-CD

Ces expériences ainsi que les analyses sont identiques et ont été réalisées parallèlement avec celles effectuées en présence de l'IL-3.

Comme le montre la Figure (27 a), la proportion de souris positives en CD45 humaines est nettement plus importante dans les conditions de co-culture versus culture simple (environ 80% vs 40% respectivement) et ceci quelle que soit la concentration d'O₂. Lorsque la co-culture est réalisée aux BC-O₂, cette proportion atteint, voire dépasse, celle trouvée avec le contrôle de J-0. Cependant, lorsqu'on compare ces données avec celles obtenues en présence d'IL-3, on constate que l'effet des BC-O₂ est moins prononcé (Figure 27 b).

En analysant la médiane du pourcentage de cellules huCD45⁺ présentes par fémur chez les souris greffées, nous retrouvons un effet positif de la co-culture sur le maintien des cellules souches avec une activité SRC-CD comparable à celle du contrôle J0 et supérieure à celle de culture simple (T0 > simple 20% d'O₂ * ; CO- 5% d'O₂ > simple- 5% d'O₂ * ; CO- 20% d'O₂ > simple- 20% d'O₂ *). Cependant, nous n'observons aucun effet des faibles taux d'O₂ lorsque les cultures ne contiennent pas d'IL-3.

Par ailleurs, il est important de noter que dans la condition de co-culture à 1,5% d'O₂, l'activité SRC-CD est considérablement augmentée en présence d'IL-3 par rapport à la même condition sans IL-3 (de l'ordre de 6 fois), ce qui suggère un effet synergique de l'IL-3 avec les BC-O₂ (surtout à 1,5% d'O₂) (figure 27 b).

Quant à l'analyse de cellules huCD19 et huCD33 dans la moelle osseuse murine, les résultats ne montre pas de variations significatives liées à l'effet d'IL-3. En tous cas, nous avons constaté que l'absence de l'IL-3 conduit à une tendance de baisse de taux de différenciation myéloïde (CD33)

au bénéfice de la différenciation lymphoïde B (CD19) et ce dans toutes les conditions sauf dans les co-cultures aux BC-O₂ (augmentation visible à 1,5% d'O₂). Ceci peut suggérer que la tendance de différenciation en co-culture aux BC-O₂ (surtout à 1,5%) se comporte de façon particulière avec ou sans IL-3 (figure 27 c).

II.E.3. Analyses liées aux CFC humains dans les conditions avec IL-3 : SRC-CFC

Parallèlement à l'analyse des cellules CD45 humaines dans la moelle osseuse murine et au potentiel de différenciation lymphoïde B et myéloïde des SRC, nous avons procédé à l'évaluation de la capacité de ces SRC à générer des CFC (sous-population de cellules souches dites : SRC-CFC) par culture d'une fraction de la moelle osseuse de chaque souris dans un milieu semi solide enrichi en cytokines (relativement spécifiques aux cellules humaines).

Nos résultats montrent que la co-culture assure un meilleur maintien des SRC-CFC que la culture simple. En effet, la quantité de CFC générée n'est pas significativement différente du J0 dans les conditions de co-culture, ni dans les conditions de cultures simples à BC-O₂ malgré une tendance à la baisse. En revanche, la culture simple à 20% d'O₂ induit une production de CFC dans les moelles des souris significativement inférieure au T0. Cet effet de la co-culture atteint un niveau similaire à celui du contrôle de cellules de J0 (Figure 28 a et c).

Il apparaît donc clairement ici un effet des BC-O₂ dans les cultures simples où l'activité SRC-CFC était mieux maintenue. En revanche, en co-culture les différences n'apparaissent pas significatives.

Nous pouvons cependant noter le fait que les colonies BFU-E retrouvées à 1,5% d'O₂ étaient nettement plus volumineuses (comparables avec le contrôle de J0) en comparaison avec celles à 20% d'O₂.

En analysant le rapport de différenciation (CFU-GM et BFU-E), nous observons que la co-culture à 1,5% d'O₂ a maintenu le même rapport que celui du control J0 alors que dans les autres conditions de culture ou de co-cultures, ce rapport a changé en faveur de CFU- GM. Ce résultat suggère qu'une faible concentration O₂ est nécessaire pour maintenir non seulement la capacité proliférative des cellules souches, mais aussi leur potentiel de différenciation.

II.E.4. Analyses liées aux CFC humains dans les conditions sans IL-3: SRC-CFC

D'après nos résultats, les CFC se comportent en général de façon comparable à celle des CD45⁺. En effet, En analysant la moyenne du nombre de CFC par fémur détectées dans les souris positives en CD45 humaines, nous constatons que la co-culture permet un meilleur maintien de la capacité des SRC à générer des CFC par rapport à la culture simple, sans que les BC-O₂ n'influencent ce phénomène (T0 > S - 20% *; CO- 5% > S - 20% *; CO- 20% > S - 20%; * CO- 5% > S- 1,5%*; CO- 20% > S- 1,5% *; T0 > S- 1,5% *) (Figure 28 a, c).

Comme ce qui a été observé avec l'activité SRC-CD, l'activité SRC-CFC semble IL-3 - dépendante dans la concentration 1,5% d'O₂ en co-culture (production de CFC étant deux fois plus importante en présence de l'IL-3) ; même tendance a été noté culture simple à 1,5% d'O₂ bien que la différence ne soit pas significative (Figure 28 c).

Le retentissement de la culture sans IL-3 sur la distribution CFU-GM et BFU-E affiche une certaine divergence par rapport à +IL-3. En effet, nous constatons une augmentation remarquable du taux de BFU-E aux dépens de CFU-GM dans toutes les conditions mais à l'exception de co-culture à 1,5% d'O₂ où le nombre de BFU-E chute d'environ 70% (+IL-3) à 45% (Figure 28 b). Par ailleurs, la condition qui présente le même rapport que celui du contrôle de cellules de J 0 est la culture simple à 1,5% d'O₂.

Ainsi, nous pouvons conclure que l'absence d'IL-3 diminue drastiquement le nombre de CFC et qu'elle induit également un changement du rapport CFU-GM et BFU-E dans la condition co-culture 1,5% d'O₂.

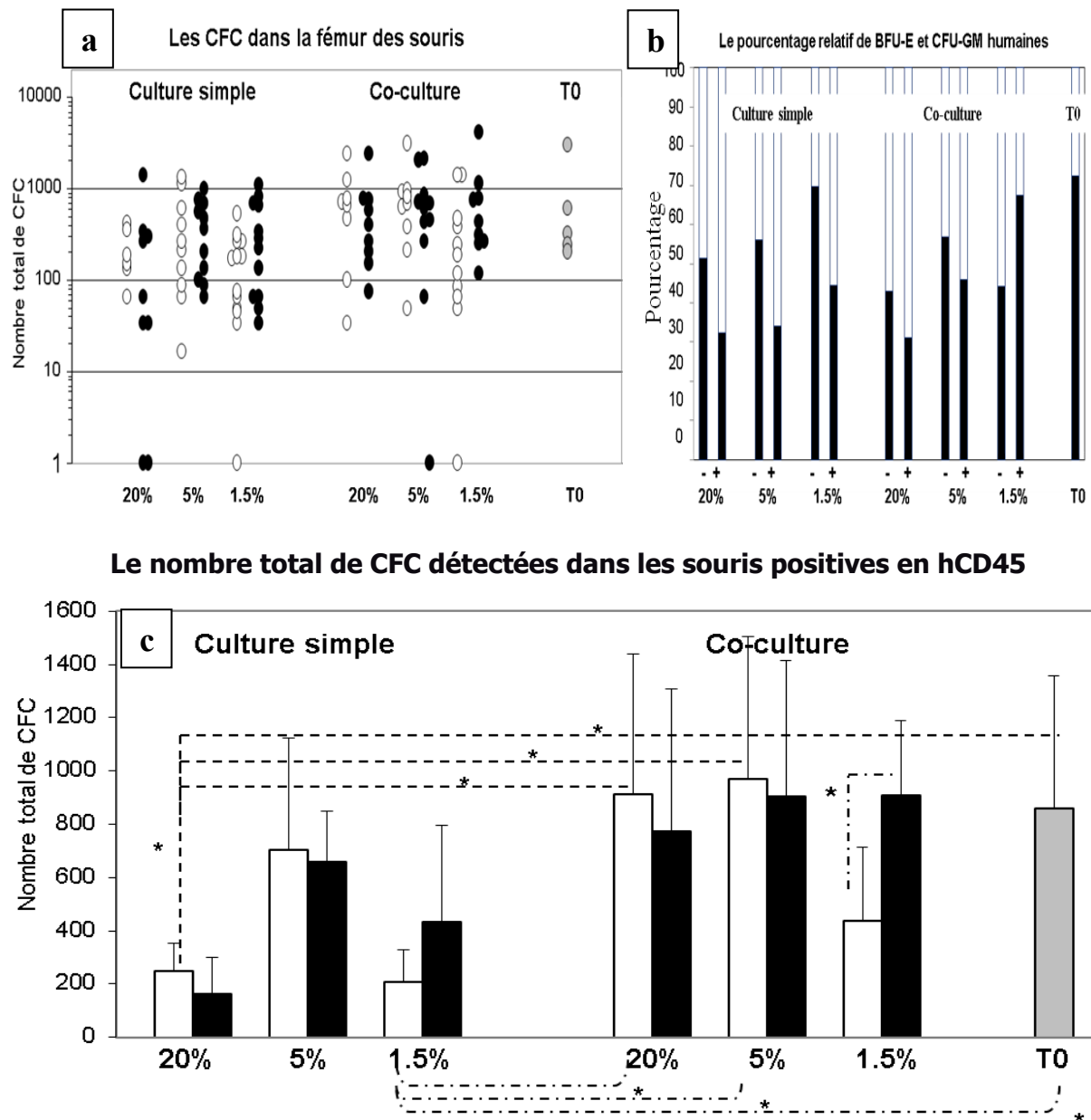


Figure 28 : Impact de BC-O₂, de CSM et d'IL-3 sur l'activité SRC-CFC. Une petite fraction de cellules prélevées de chaque moelle osseuse murine (contenant les cellules humaines) a été ensemencée dans la méthylcellulose afin d'estimer leur contenu en progéniteurs humains CFC. Dans **a** et **c**, le blanc : sans IL-3, le noir : avec IL-3, gris : T0. **a**. Nombre de CFC humaines détectées par souris. **b**. Proportion relative des colonies BFU-E (barres noires) et CFU-GM (barres blanches) dans les colonies humaines trouvées dans chaque condition, - et + représentent les conditions sans et avec IL-3 respectivement. **c**. Moyenne du nombre total de CFC détectées dans les souris positives en CD45⁺ humaines. Nous avons mentionné juste les différences significatives liées à la condition sans IL-3. Test de Mann & Whitney: * p<0.05.

III. Travaux sur les CSM

- Etude de l'influence des basses concentrations d'O₂ sur la production de CFU-F, le phénotype et sur la sécrétion de cytokines de CSM.
- Impact des surnageants sur la culture de cellules CD34⁺ SP

III.A. Caractérisation des préparations de CSM

Les CSM ont été purifiées par adhérence au plastique et amplifiées dans du milieu alpha MEM complet.

Dans nos expériences, les CSM ont été cultivées à 20% ou à 5% d'O₂ et ont été repiquées dès que la confluence est atteinte, environ toutes les semaines. Le nombre de doublements à chaque passage était de 2 à 4.

La prolifération des CSM a été maintenue au moins jusqu'au passage 5. Les cellules ont été récupérées à chaque passage pour l'étude de leur phénotype, de leur profil sécrétoire et de leur capacité à former des colonies cellulaires fibroblastiques dans les deux conditions d'oxygénation.

III.A.1. Production de colonies CFU-F (*Colony Forming Unit - Fibroblast*)

Nous avons comparé les CSM incubées à 5% d'O₂ versus 20% d'O₂ pour leur contenu en cellules générant des CFU-F. Pour réaliser ces analyses, le nombre de passages (entre P1 et P5) et la densité cellulaire (environ 8 000 cellule/cm²) sont les mêmes que ceux utilisés lors des co-cultures. Notre analyse a montré qu'à 5% d'O₂ les colonies sont plus denses et plus volumineuses avec un nombre moyen de de CFU-F obtenues de (36,8 ± 12,9) contre (22,4 ± 14,6) à 20% d'O₂. Ce qui signifie que les cellules productrices de CFU-F sont mieux préservées à 5% d'O₂ (Figure 29 et 30).

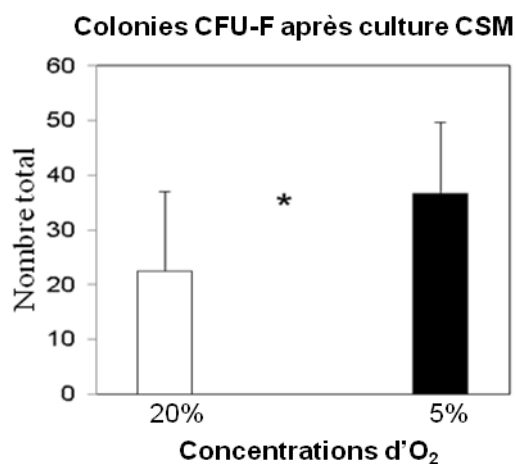


Figure 29 : Nombre de CFU-F en fonction de concentrations d'O₂.

Les CSM ont étéensemencées (à concentration de 8000 cellule/cm²) à 5 (barre noire) et à 20% d'O₂ (barre blanche) jusqu'à confluence (environ une semaine). A l'issue de cette culture, 600 CSM ont étéensemencées afin de déterminer le contenu en CFU-F. Ce résultat représente la moyenne du nombre de colonies CFU-F obtenues dans 9 expériences.

L'analyse statistique est effectuée avec le test Mann-Whitney.

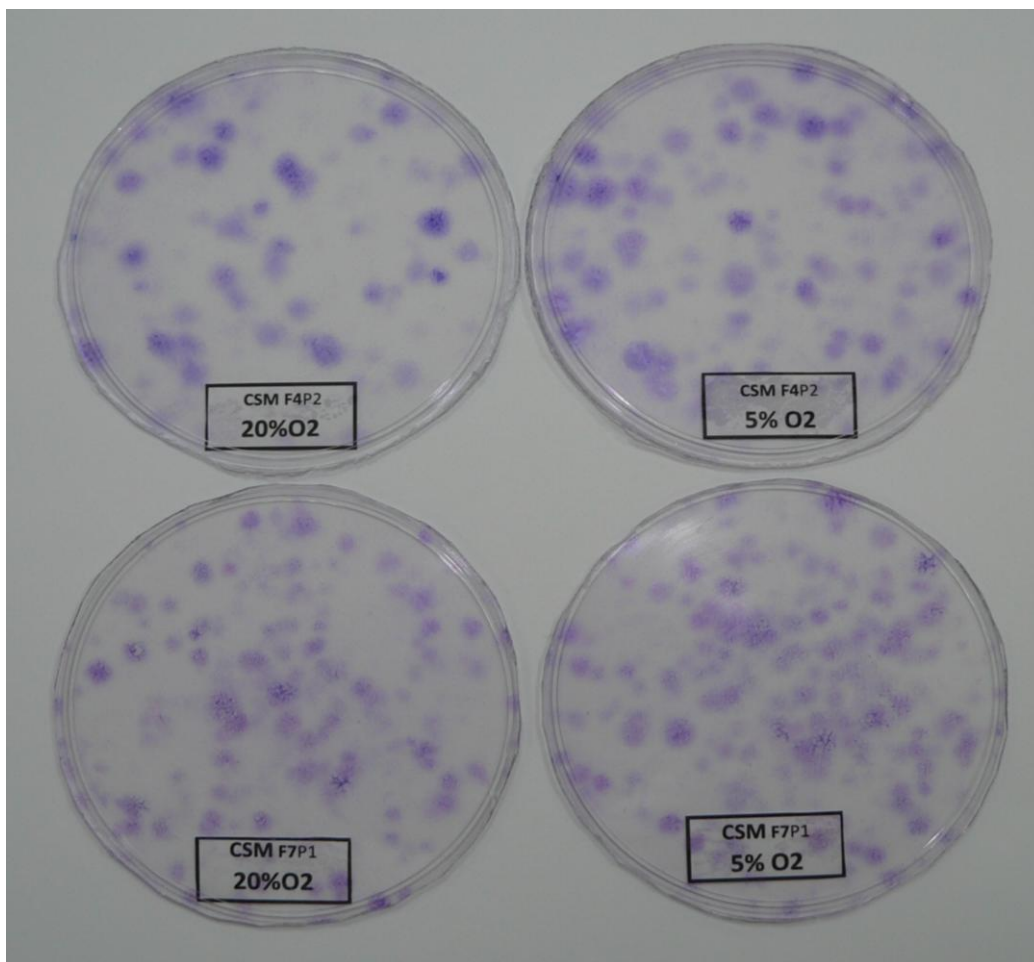


Figure 30 : Image représentative des colonies CFU-F obtenues des CSM à différentes concentrations d'O₂. Des colonies issues des CSM médullaires de deux donneurs différents, CSM F4 passage 2 et CSM F7 P1. Après la culture à 5% (droite) ou à 20% d'O₂ (gauche), 600 cellules ont étéensemencées pendant 14 jours et puis colorées et analysées afin de déterminer leur contenu en CFU-F.

III.A.2. Effet de basses concentrations d'O₂ sur le phénotype des CSM

Pour cette analyse, l'expression des antigènes CD106, CD105, CD146, CD49a, CD271, CD200, CD73, CD54, CD90 et CD13 a été mesurée par cytométrie en flux. Ces antigènes représentent pour la plupart, des molécules d'adhésion ayant un rôle important dans l'interaction cellulaire et susceptibles d'être impliquées dans le maintien et/ou l'induction de l'expansion de CSH. D'autre part, des antigènes hématopoïétiques, CD45 et CD34, ont également été testés.

Le phénotype des CSM a été analysé après chaque passage (P1 à P5).

Dès le second passage, les cellules apparaissent :

- (i) négatives pour les marqueurs hématopoïétiques CD34 et CD45 ainsi que pour le CD271 indétectable dès P0.
- (ii) faiblement positives pour les antigènes CD49a, CD54, CD106 et CD200
- (iii) et fortement positives pour CD13, CD105, CD146, CD73 et CD90.

En ce qui concerne l'influence des BC-O₂, sur le phénotype de CSM, nous observons que la concentration 5% d'O₂ permet de stimuler significativement l'expression des CD146, CD49a, CD200, CD54 et le CD105 par rapport à 20% d'O₂ mais reste sans effet sur l'expression des autres marqueurs (Tableau 8).

Nous avons par ailleurs constaté que les CSM cultivées à BC-O₂ se détachaient difficilement par l'action de la trypsine, y compris avec une durée d'incubation plus longue. Ceci pourrait s'expliquer par l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion aux BC-O₂, décrite ci-dessus.

Tableau 8 : Analyse phénotypique des CSM après culture à 20% et 5% d'O₂. Après une semaine de culture à 20% ou à 5% d'O₂, les CSM ont été immunophénotypées. Les marqueurs dont l'expression augmente avec la faible oxygénation sont indiqués en gras. Ces résultats représentent la moyenne de pourcentages d'expression \pm écartype (T-test : * $p < 0.05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Le marqueur	Taux O ₂	Pourcentage d'expression	n° d'expériences	Différences
CD146	20%	58,95 \pm 18,83	16	5% > 20% *
	5%	73,8 \pm 13,05		
CD49a	20%	6,25 \pm 3,19	16	5% > 20% **
	5%	10,94 \pm 4,19		
CD200	20%	3,39 \pm 1,324	15	5% > 20% ***
	5%	6,73 \pm 2,249		
CD54	20%	14,36 \pm 3,93	13	5% > 20% ***
	5%	28,18 \pm 9,89		
CD105	20%	56,18 \pm 19,29	11	5% > 20% *
	5%	73,73 \pm 11,75		
CD271		0	16	
CD90	20%	100	16	Pas de différences
	5%	100		
CD73	20%	83,38 \pm 14,08	16	Non significative
	5%	92,19 \pm 6,52		
CD106	20%	5,15 \pm 4,87	16	Non significative
	5%	7,94 \pm 7,05		
CD45		0	13	
CD34		0	13	
CD13	20%	87,29 \pm 15,35	6	Pas de différences
	5%	90,3 \pm 8,15		

III.A.3. Impact des concentrations d'O₂ sur la sécrétion de cytokines par les CSM

Les études quantitatives de la production de cytokines au cours de C1 (culture simple de cellules CD34⁺ et co-culture sur CSM) et de la culture de CSM seules (à 20 et 5% d'O₂) ont été réalisées par la technique Luminex.

Lors de cette étude, 16 cytokines différentes ont été testées dans les surnageants de culture collectés à différents temps de cultures selon le type de cytokines considéré :

- à **J3**, IL-3, IL-4, IL-17A, TNF- α , FGF-2 et G-CSF,
- à **J2, J4 et J7** pour VEGF-A, IL-8, TPO, HGF, TGF- β 1 et SDF-1 α + β
- à **J2, J3, J5 et J7** pour IL-1 β , IL-6, GM-CSF et IL-10

Nos résultats sont les suivants :

III.A.3.1. IL-6 : La production de l'IL-6 (qui a été mesurée à J2, J3, J5 et J7) augmente au cours de la culture mais est significativement plus élevée dans la co-culture à 5% par rapport à 20% d'O₂ jusqu'à J-5. À J-7 cette tendance n'est pas statistiquement significative. Dans la culture de CSM, la production d'IL-6 augmente de façon exponentielle affichant un écart considérable à J-7 vs J-5 (figure 31). Nous n'avons pas noté de sécrétion d'IL-6 dans les surnageants issus des cultures simples de cellules CD34⁺.

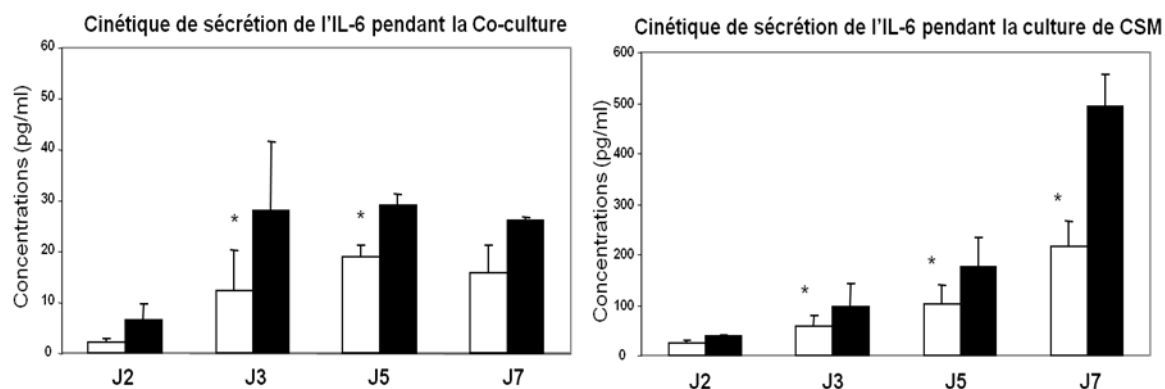


Figure 31 : Concentrations d'IL-6 dans les surnageants des co-cultures et cultures simples de CSM à J2, J3, J5 et J7. Barres blanches : 20% d'O₂ ; barres noires : 5% d'O₂. (T-test :* p<0.05 ; n= 3 à 6).

III.A.3.2. VEGF : dans la co-culture, le taux de production de VEGF est plus important à 5% qu'à 20% d'O₂ avec des différences significatives à J4 et à J7 (21.6 vs 12.6 et 42.52 vs 25.2 pg/mL respectivement). La même tendance est rencontrée avec les surnageants de culture de CSM où une augmentation significative est observée à J4 à 5% d'O₂. Par ailleurs, les quantités de VEGF générées par les CSM sont beaucoup plus importantes en comparaison à la co-culture (Figure 32).

Nous n'avons pas observé de sécrétion de VEGF dans les surnageants issus des cultures simples de cellules CD34⁺.

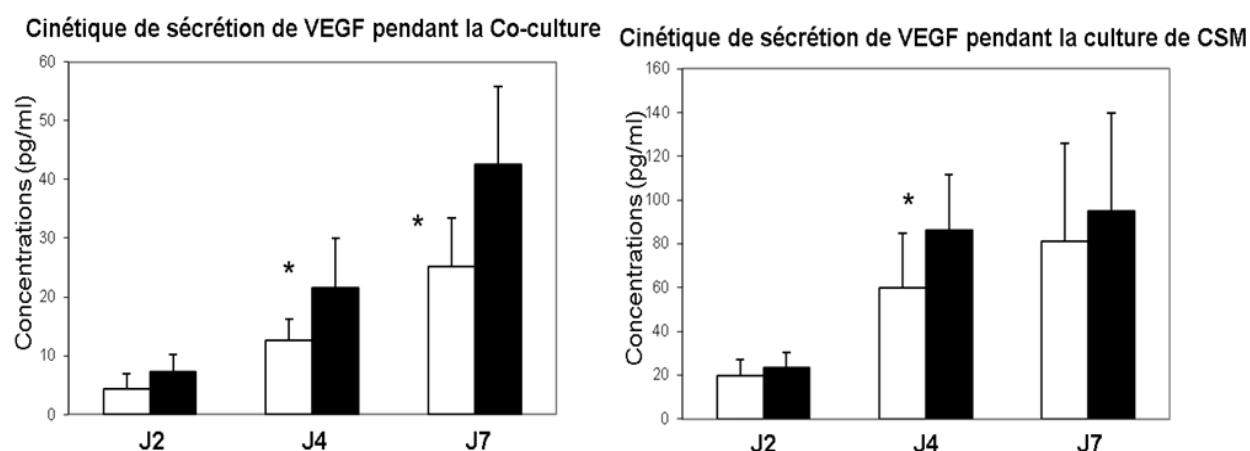


Figure 32 : Concentrations de VEGF dans les surnageants des co-cultures et cultures simples de CSM à J2, J4 et J7. Barres blanches : 20% d'O₂ ; barres noires : 5% d'O₂. (T-test :* p<0.05 ; n= 4 à 5).

III.A.3.3. IL-8 : la production d'IL-8 est également influencée par les BC-O₂. En effet, à 5% d'O₂, les quantités détectées d'IL-8 dans les surnageants de la co-culture ainsi que la culture de CSM sont supérieures à leurs homologues de 20% d'O₂ avec des différences significatives qui apparaissent à J4 (178 vs 60 pg/mL en co-culture et 1916 vs 958 pg/mL dans la culture de CSM) (Figure 33).

D'autre part, il semblerait que les surnageants de culture CD34⁺ à 5% d'O₂ contiennent plus d'IL-8 que les surnageants des cultures réalisées à 20% d'O₂ cependant, le nombre d'expériences n'étant pas suffisant, nous ne pouvons pas affirmer ce résultat.

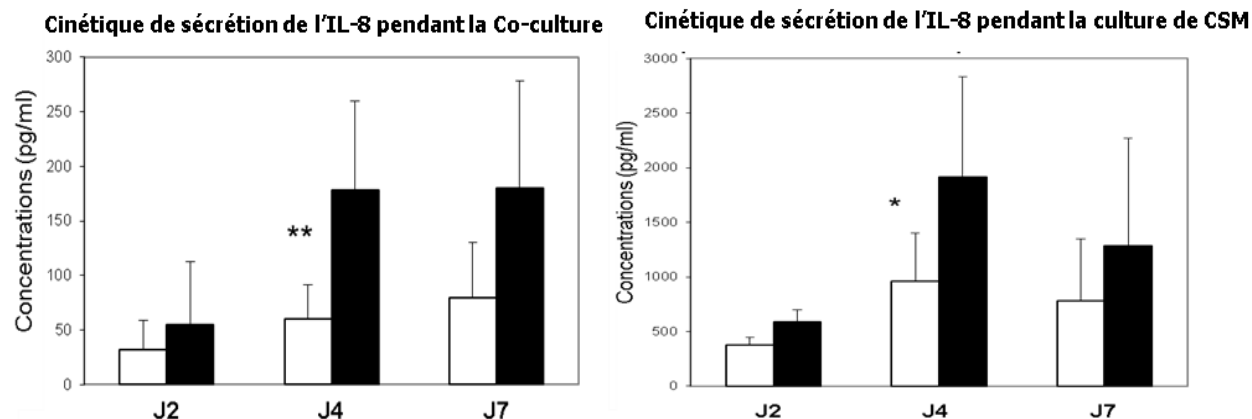


Figure 33 : Concentrations d'IL-8 dans les surnageants des co-cultures et cultures simples de CSM à J2, J4 et J7. Barres blanches : 20% d'O₂ ; barres noires : 5% d'O₂. (T-test :* p<0.05 ; n= 4 à 5).

III.A.3.4. TGF-β1 : nous avons mis en évidence une sécrétion importante de TGF-β1 avec une augmentation constante dans la co-culture ainsi que dans la culture de CSM sans pour autant trouver de variation liées à la concentration d'O₂ (Tableau 9).

La culture simple de cellules CD34⁺ ne présente pas de sécrétion de TGF-β1.

Tableau 9 : Concentrations de TGF-β1. Moyenne de concentrations de TGF-β1 (en pg/mL) dans les surnageants des co-cultures, cultures simples de cellules CD34⁺ et cultures simples de CSM. (n= 4 à 5)

Cytokine	Taux d'O ₂	Condition	J2	J4	J7
TGF-β1	20% d'O ₂	Co-culture	54,86 ± 41,54	65,08 ± 10,72	130,59 ± 64,72
		Culture CSM	315,29 ± 22,03	352,5 ± 154,91	479,66 ± 213,36
		Culture CD34 ⁺	0	0	0
	5% d'O ₂	Co-culture	42,04 ± 32,02	72,75 ± 27,79	119,16 ± 69,25
		Culture CSM	306,32 ± 70,09	358,41 ± 40,94	458,07 ± 358,56
		Culture CD34 ⁺	0	0	0

III.A.3.5. FGF-2 : les concentrations en FGF-2 trouvées en culture de CSM sont importantes, et ne varient pas en fonction des concentrations en O₂ (Tableau 10). Cependant, ce résultat doit être corrigé puisque du FGF-2 est ajouté dans le milieu de culture, l'amplification des CSM avant la co-culture étant toujours réalisée en présence de ce facteur de croissance. De plus, la co-culture

ne présentant pas de quantités plus importantes par rapport à la culture simple de CD34⁺, il est probable que ce facteur ne soit pas sécrété par les CSM dans nos conditions de culture.

Tableau 10 : Concentrations de FGF-2. Moyenne de concentrations de FGF-2 (en pg/mL) dans les surnageants des co-cultures, cultures simples de cellules CD34⁺ et cultures simples de CSM à J4. (n= 4 à 5)

Cytokine	Taux d'O ₂	Condition	J4
FGF-2	20% d'O ₂	Co-culture	7,19 ± 0,63
		Culture CSM	45,43 ± 14,94
		Culture CD34 ⁺	9,01 ± 1,3
	5% d'O ₂	Co-culture	8,78 ± 1,4
		Culture CSM	49,3 ± 19,04
		Culture CD34 ⁺	9,24 ± 0,79

III.A.3.6. IL-3 : seuls les surnageants des co-cultures et des cultures de cellules CD34⁺ contiennent de l'IL-3 alors qu'elle n'est pas détectée dans les cultures de CSM. Cependant, le milieu de culture étant initialement complétement en IL-3, et puisque les concentrations mesurées entre « co-culture » et « culture simple de cellules CD34⁺ » sont identiques et qu'aucune modification n'apparaît en fonction de l'oxygénation, il en résulte donc que l'IL-3 détectée est probablement exogène et non en provenance d'une sécrétion à partir des cellules CD34⁺ (Tableau 11).

Tableau 11 : Concentrations d'IL-3. Moyenne de concentrations d'IL-3 (en pg/mL) dans les surnageants des co-cultures, cultures simples de cellules CD34⁺ et cultures simples de CSM à J4. (n= 4 à 5)

Cytokine	Taux d'O ₂	Condition	J4
IL-3	20% d'O ₂	Co-culture	46,03 ± 6,12
		Culture CSM	0
		Culture CD34 ⁺	47,75 ± 12,53
	5% d'O ₂	Co-culture	53,26 ± 12,81
		Culture CSM	0
		Culture CD34 ⁺	45,54 ± 11,4

III.A.3.7. G-CSF : comme dans le cas de l'IL-3, les surnageants des cultures simples de cellules CD34⁺ ainsi que ceux des co-cultures possèdent des concentrations très importantes en G-CSF sans qu'il y ait de différences significatives liées aux concentrations d'O₂ (malgré une tendance plus élevée à 20% d'O₂ pour les cultures simples de CD34⁺).

Du G-CSF étant ajouté au début de ces cultures, il est donc probable cette fois encore que la très grande partie du G-CSF détectée soit exogène. De plus, les concentrations initiales étant beaucoup plus élevées (100 ng/mL), il est particulièrement difficile de conclure sur une sécrétion de cytokines par les cellules puisqu'il est impossible de connaître le flux entre consommation cellulaire et production. Finalement, la seule condition exploitable concerne les surnageants de CSM seules pour lesquels le taux de G-CSF mesuré à 20% d'O₂ est significativement plus élevé par rapport à 5% d'O₂ (environ 8,43 pg/mL contre seulement 0,38 pg/mL respectivement). Ceci suggère que les CSM participeraient à la production de G-CSF qui semble inhibée à 5% d'O₂ (Tableau 12).

Tableau 12 : Concentrations de G-CSF. Moyenne de concentrations de G-CSF (en pg/mL) dans les surnageants des co-cultures, cultures simples de cellules CD34⁺ et cultures simples de CSM à J4. (n= 4 à 5)

Cytokine	Taux d'O ₂	Condition	J4
G-CSF	20% d'O ₂	Co-culture	691,44 ± 177,88
		Culture CSM	8,43 ± 4,51*
		Culture CD34 ⁺	725,56 ± 259,6
	5% d'O ₂	Co-culture	653,96 ± 205,22
		Culture CSM	0,38 ± 0,13
		Culture CD34 ⁺	445,75 ± 54,93

* = p<0.05 (CSM 20% vs. CSM 5%).

III.A.3.8. TPO : la TPO a été détectée dans toutes les conditions de culture avec des quantités plus importantes en co-culture par rapport aux cultures simples de cellules CD34⁺ et de CSM. Les valeurs les plus élevées sont détectées au début de la culture (1960,14 pg/mL et 1656,36 pg/mL à 20% et à 5% d'O₂ à J2) puis elles diminuent de 3,5 à 4 fois à J7 pour les conditions 20% et 5% d'O₂ respectivement (Tableau 13). C'est à 20% d'O₂ que les quantités détectées sont les

plus importantes sans que cette différence soit significative. Dans la culture simple de CSM, la sécrétion de TPO est également favorisée à 20% d'O₂ (230,7 pg/mL à 20% et 81,1 pg/mL à 5% d'O₂) alors qu'il n'existe pas de différences pour la culture simple de CD34⁺.

La TPO faisant également partie des cytokines ajoutées à l'initiation de la co-culture, une partie des quantités détectées est probablement exogène ce qui pourrait expliquer la diminution progressive des doses détectées (à l'inverse de ce qui a été observé avec le VEGF et l'IL-6), du fait de la consommation de cette cytokine par les cellules. Cependant nous observons également que les CSM seules génèrent de la TPO, ce qui signifie que ces cellules participent à sa sécrétion en la co-culture, et ceci de façon plus marquée à 20% d'O₂ qu'à 5%.

Tableau 13: Concentrations de TPO. Moyenne de concentrations de TPO (en pg/mL) dans les surnageants des co-cultures à J2, J4 et J7 et des cultures simples de cellules CD34⁺ et de CSM à J4. (n= 4 à 5)

Cytokine	Taux d'O ₂	Condition	J2	J4	J7
TPO	20% d'O ₂	Co-culture	1960,14 ± 749,51	1028,89 ± 305,42	568,29 ± 488,29
		Culture CSM	n.d.	<u>230,74</u> ± 133,7 *	n.d.
		Culture CD34 ⁺	n.d.	330,95 ± 233,1	n.d.
	5% d'O ₂	Co-culture	1656,36 ± 636,88	669,67 ± 292,1	380,79 ± 246,25
		Culture CSM	n.d.	<u>81,11</u> ± 1,97	n.d.
		Culture CD34 ⁺	n.d.	395,38 ± 315,38	n.d.

* = p<0.05 (CSM 20% vs. CSM 5%) ; n.d. = non déterminé.

III.A.3.9. SDF-1 α + β : La co-culture ainsi que la culture de CSM présentent des taux importants et croissants de SDF-1 avec l'avancement de culture ce qui indique qu'il est au moins sécrété par les CSM. Les taux plus faibles mesurés en co-culture par rapport aux CSM seules suggèrent que cette chimiokine est consommée par les cellules CD34⁺, et/ou que le contact des cellules CD34⁺ avec les CSM induit des signaux inhibiteurs de sa sécrétion par les CSM.

La concentration d'oxygène de la culture ne montre pas d'effet sur la synthèse de SDF-1 (Tableau 14). En ce qui concerne la culture simple de cellules CD34⁺, le nombre insuffisant d'expériences ne permet pas de conclure sur la sécrétion de SDF-1.

Tableau 14 : Concentrations de SDF-1 α + β . Moyenne de concentrations de SDF-1 α + β (en pg/mL) dans les surnageants des co-cultures, cultures simples de cellules CD34⁺ et cultures simples de CSM à J2, J4 et J7. (n= 4 à 5).

Cytokine	Taux d'O ₂	Condition	J2	J4	J7
SDF-1 α + β	20% d'O ₂	Co-culture	850,62 \pm 126,5	1537,69 \pm 217,33	4081,16 \pm 1658,5
		Culture CSM	n.d.	2151,87 \pm 828,57	6111,93 \pm 2298,7
		Culture CD34 ⁺	n.d.	n.d.	1018,56 \pm
	5% d'O ₂	Co-culture	1028,66 \pm 215,3	1489,51 \pm 604,25	5141,6 \pm 2683,8
		Culture CSM	n.d.	1875,36 \pm 716,45	5688,03 \pm 2228,6
		Culture CD34 ⁺	n.d.	n.d.	925,57 \pm

n.d: non déterminé

III.A.3.10. IL-4, GM-CSF, IL-17A, IL-1 β , IL-10, HGF et TNF- α n'ont été détectés dans aucun surnageant quelles que soient nos conditions de culture.

En résumé, nous avons montré que, parmi les facteurs testés dans nos conditions, les CSM secrètent selon les conditions des doses importantes d'IL-6, VEGF, IL-8, TGF- β 1 et en SDF-1, ainsi que de faibles quantités en G-CSF et TPO. Les cytokines et facteurs de croissance tels que : IL-3, FGF-2, IL-4, GM-CSF, IL-17A, IL-1 β , IL-10, HGF et TNF- α n'ont pas été détectées dans les surnageants de CSM cultivées dans nos conditions.

Par ailleurs, il apparaît clairement que la sécrétion des interleukines IL-6 et IL-8 ainsi que du facteur VEGF par les CSM est augmentée en condition de BC-O₂ alors qu'elle parait diminuée pour G-CSF et la TPO par rapport à la concentration d'O₂ atmosphérique.

La sécrétion de SDF-1 et TGF- β 1 n'est quant à elle pas influencée par les changements de concentrations d'O₂.

Enfin, les IL-3, FGF-2, IL-4, GM-CSF, IL-17A, IL-1 β , IL-10, HGF, TNF- α ne sont pas synthétisés par les CSM ni par les cellules CD34⁺ dans nos conditions (Tableau 15).

Tableau 15 : Les variations de sécrétion des cytokines des CSM dans les surnageants.

Variations de sécrétion	cytokine	Concentrations d'oxygène
Significatif	IL-6	5%
	IL-8	5%
	VEGF	5%
	G-CSF	20%
	TPO	20%
Non Significatif	SDF-1, TGF- β 1	
Pas de sécrétion	IL-3, FGF-2, IL-4, GM-CSF, IL-17A, IL-1 β , IL-10, HGF et TNF- α	

Suite à ces données, nous proposons que l'effet bénéfique de CSM à BC-O₂ sur l'expansion de cellules CD34⁺ pourrait être médié, directement ou indirectement et au moins partiellement, par les cytokines : IL-6, IL-8 et VEGF (effet paracrine) et par les molécules : CD200, CD105, CD49a et CD149 (effet de contact direct) (Figure 34).

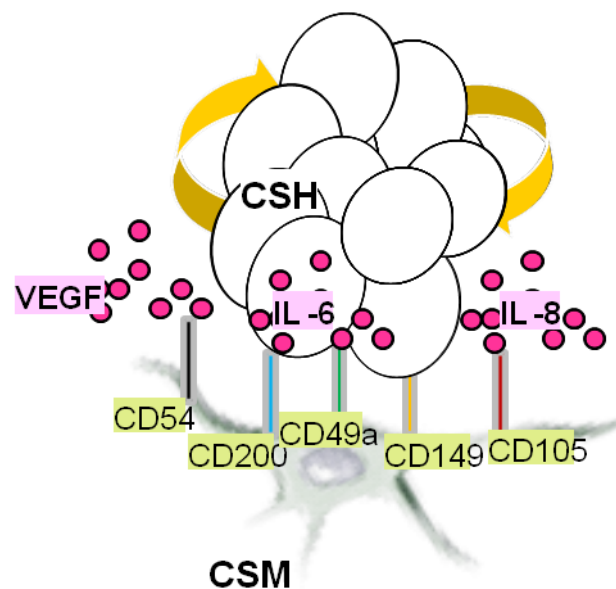


Figure 34 : Interactions entre CSM et cellules CD34⁺ à BC-O₂.

Les CSM cultivées à BC-O₂ expriment davantage certains antigènes de primitivité, CD200, CD49a et CD149 ainsi que des molécules d'adhésion CD105 et CD54 et sécrètent des taux élevés en VEGF, IL-6 et IL-8 impliquant ainsi des mécanismes de contact direct et paracrine responsables de l'orchestration d'une réponse équilibrée des CSH (auto-renouvellement ↔ engagement) après la stimulation cytokinique.

Enfin, il faut préciser qu'il aurait été plus représentatif de réaliser ces mesures cytokiniques dans les mêmes conditions de culture primaire que celles utilisées dans le reste de notre étude et de tester notamment la concentration de 1,5% d'O₂. Cependant, pour des raisons techniques, nous avons dû nous restreindre à la condition de 5% d'O₂. Nous ne pouvons donc pas exclure le fait que la sécrétion cytokinique soit modifiée avec des taux plus bas en O₂, notamment au vu des effets observés sur les cellules primitives à 1,5% d'O₂.

Il faut rappeler que cette liste de cytokines étudiées n'est pas exhaustive et bien entendu il existe d'autres cytokines qui peuvent avoir de l'influence dans les effets que nous avons observés.

III.B. Impact des surnageants (milieux pré-conditionnés riches en cytokines) sur la culture de cellules CD34⁺ SP (Expansion des cellules CD34⁺ à différentes concentrations en surnageant)

Il s'agit ici d'une analyse fonctionnelle de l'impact des surnageants de culture (riches en cytokines) sur l'induction de l'expansion de cellules CD34⁺ du SP. Celle-ci peut être considérée comme une évaluation de l'effet paracrine des CSM dans nos conditions d'oxygénation, c'est à dire que les cytokines sécrétées par les CSM et mises en évidence dans les surnageants de culture ont un effet significatif par elles-mêmes en dehors des interactions avec le stroma.

Pour cette étude, nous avons utilisé les surnageants de culture (milieux pré-conditionnés) prélevés au cours de C1 (cultures simples et co-cultures) et de la culture de CSM (à 20 et 5% d'O₂) qui constituent les conditions précédemment analysées pour leur contenu en cytokines. Les surnageants utilisés dans ces expériences ont été récoltés au troisième jour de culture et ajoutés à des concentrations de 10% et 20% dans le milieu de culture de cellules CD34⁺ sous oxygénation atmosphérique à 37 °C.

Les cultures sont réalisées dans des microplaques 96 puits, en volume final de 200 µL/puits en milieu Stem α A et avec 2 000 cellules CD34⁺ensemencées par puits.

Nous avons évalué le nombre total de cellules générées à partir de ces cultures à J5 et à J11 afin d'évaluer la contribution de l'effet paracrine de CSM sur l'expansion des cellules CD34⁺ en fonction des différentes concentrations d'oxygène.

Les résultats obtenus à J5 et J11 étant très similaires en termes de variations et de tendance, nous avons choisi de ne montrer que ceux qui concernent le **jour 11**.

III.B.1. Condition 1 : 10% de surnageant

La moyenne du taux d'amplification des cellules cultivées dans le milieu contenant 10% de surnageant de co-culture est significativement augmentée lorsque ce surnageant est issu d'une co-culture à 5% d'O₂ plutôt que d'une co-culture à 20% d'O₂ (7,39 vs 4,25) (Figure 35).

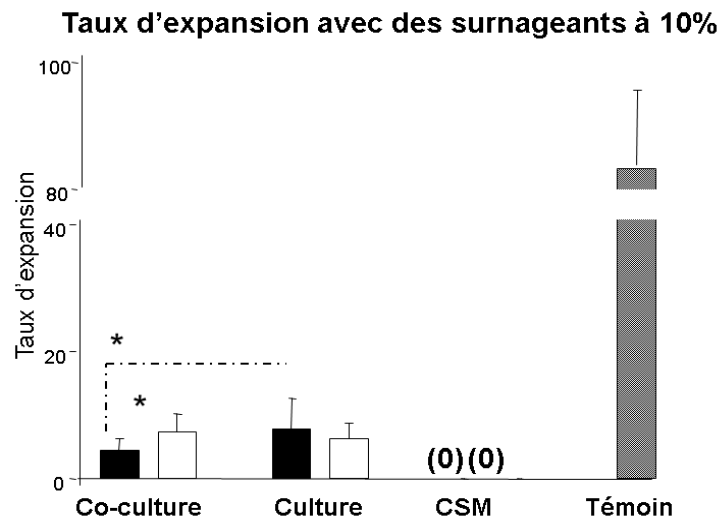


Figure 35 : Taux d'amplification moyen des cellules CD34⁺ dans un milieu contenant 10% de surnageant des différentes cultures à J11. Barres blanches : expériences avec des surnageants de 5% d'O₂ ; barres noires : expériences avec des surnageants de 20% d'O₂. (Test de Mann & Whitney : * p<0.05 ; n= 8 avec surnageants de co-culture ; 10 avec surnageants CSM ; 4 avec surnageants de culture simple de cellules CD34⁺).

En revanche, aucune différence significative n'est observée lorsque les surnageants sont issus des cultures de cellules CD34⁺ à 5% et à 20% d'O₂. Cependant, l'amplification des cellules cultivées avec le surnageant de cellules CD34⁺ 20% d'O₂ est significativement meilleure que l'amplification des cellules cultivées avec le surnageant de co-culture 20% d'O₂ (7,63 vs 4,25) (Figure 35).

Aucune amplification cellulaire n'est détectée en présence des surnageants de culture de CSM à 5% ou 20% d'O₂.

III.B.2. Condition 2 : 20% de surnageant

Aucune différence significative notable dans les taux d'expansion cellulaire à J11 liés à la présence de 20% de surnageants dans les couples surnageants co-cultures 20% d'O₂/surnageants co-cultures 5% d'O₂ et surnageants cultures simples 20% d'O₂/surnageants cultures simples 5% d'O₂ (Figure 36).

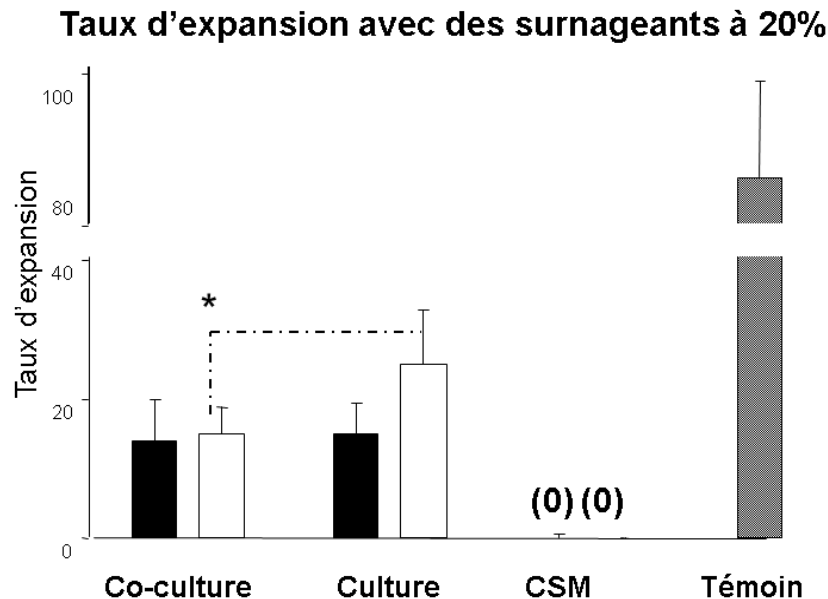


Figure 36 : Taux d'amplification moyen des cellules CD34⁺ dans un milieu contenant 20% de surnageant des différentes cultures à J11. Barres blanches : expériences avec des surnageants de 5% d'O₂ ; barres noires : expériences avec des surnageants de 20% d'O₂. (Test de Mann & Whitney :* p<0.05 ; n= 8 avec surnageants de co-culture ; 10 avec surnageants CSM ; 4 avec surnageants de culture simple de cellules CD34⁺)

En revanche, la moyenne des taux d'amplification des cellules cultivées avec 20% de surnageant de culture à 5% d'O₂ est significativement meilleure que celle des cellules cultivées avec 20% de surnageants de co-culture à 5% d'O₂ (13,84 vs 25,16) (à J5 la différence est significative avec les surnageants de co-culture à 20% d'O₂ également).

De même que pour les cultures avec 10% de surnageants, aucune amplification n'est détectée pour les cellules en présence des surnageants de CSM cultivées à 5% ou à 20% d'O₂.

Comme attendu, nous pouvons observer que les taux d'amplifications sont supérieurs lorsque les cultures sont réalisées avec 20% de milieu pré-conditionné, quelle que soit l'origine de ces milieux.

En résumé nous observons:

- une tendance vers une meilleure amplification avec des surnageants de co-cultures 5% d'O₂ versus des surnageants de co-cultures 20% d'O₂ (pour la concentration en surnageant de 10% notamment)

- une tendance vers une meilleure amplification avec des surnageants de cultures simples versus des surnageants de co-cultures

- L'absence d'effet stimulateur de la prolifération cellulaire avec les surnageants de CSM seules.

DISCUSSION

L'intérêt de l'expansion *ex vivo* du greffon hématopoïétique a été bien démontré dans les situations des greffes pauvres en CSH/PH notamment dans l'autogreffe (CSP) (Reiffers et al., 1999; McNiece et al., 2000; Pecora et al., 2001). Cependant, cette technique avec le greffon du sang placentaire, bien qu'essentielle, s'est heurtée à de nombreuses difficultés qui ont freiné son application dans ce domaine (Fernández et al., 2001; Shpall et al., 2002; Pecora et al., 2000).

Les BC-O₂ représentent un élément clé dans l'environnement physiologique des CSH et ont prouvé leurs intérêts dans la protection de ces CSH contre le stress oxydatif. Ce stress qui est susceptible de générer des dommages au niveau de l'ADN (Liu et al., 2012a), est provoqué par la culture dans les conditions classiques d'oxygénation atmosphérique (20%-21% d'O₂) «hyperoxique» qui sont favorables à une forte production de ROS entraînant ainsi des effets délétères importants dans différents types cellulaires (Yahata et al., 2011; Peterson et al., 2011; Ito et al., 2006; Fan et al., 2007; 2008; Kubo et al., 2008; Carrera et al., 2010).

Au terme de mon travail de thèse, nous avons prouvé que l'association de l'oxygénation à faible concentration (1,5% d'O₂) avec la co-culture en présence d'IL-3 représente une condition particulièrement favorable au maintien des cellules souches de type SRC et de leur potentiel de différenciation tout en assurant une prolifération importante. En effet, des cellules CD34⁺ après co-culture à BC-O₂ et injectées à des souris immunodéficientes permettent notamment d'obtenir des chimérismes humains 5 fois plus importants dans la moelle osseuse murine par rapport au témoin J0, sans qu'il n'y ait une forte diminution de l'expansion du greffon, puisque les taux d'expansion dans ces conditions ont égalé ceux affichés après la culture simple à 20% d'O₂.

Les résultats concernant les progéniteurs primitifs pré-CFC consolident également ces données de SRC. En effet, nous avons constaté que seules les conditions de faibles concentrations d'O₂ combinées avec la co-culture sont en mesure de préserver une grande capacité de repeuplement de la culture secondaire avec des progéniteurs engagés CFC. Alors que la concentration d'O₂ de 1,5% s'est montrée la plus efficace sur les SRC, c'est à la fois les concentrations 5% et 1,5% d'O₂ qui l'ont été pour la préservation de l'activité pré-CFC. Cela souligne la différence fonctionnelle entre ces deux populations de cellules souches (SRC et pré-CFC), et l'hétérogénéité au niveau de leurs réponses à l'égard de différentes concentrations d'O₂ (Cipolleschi et al., 1993; Simsek et al., 2010; Ivanovic, 2009; Parmar et al., 2007).

Nous trouvons donc que ces résultats répondent à l'enjeu majeur en matière de la fonctionnalité et l'efficacité de la greffe à savoir : disposer d'un nombre suffisant de cellules primitives et de progéniteurs engagés qui assureront respectivement la prise de greffe et le raccourcissement de la durée de l'aplasie consécutive au conditionnement du patient.

Cette partie du travail, fondée sur l'utilisation de ces deux tests fonctionnels identifiants les Pré-CFC et les SRC, a permis de générer des données très cohérentes. Nous n'avons donc pas fait appel à d'autres tests comme LTC-IC ou CAFC qui sont d'une part, moins pertinents que la xénogreffe pour refléter la sous population très primitive, et d'autre part, plus complexes techniquement et plus long que notre système de cultures primaires et secondaires pour détecter les progéniteurs primitif.

Dans notre protocole d'expansion nous avons utilisé des facteurs de croissance (SCF, TPO, G-CSF) couramment utilisés et disponibles sur le marché des molécules de grade clinique. Cette combinaison cytokinique a déjà prouvé son efficacité en termes d'induction de l'expansion de greffons hématopoïétiques (McNiece et al., 2004; Robinson et al., 2006; 2011; Reiffers et al., 1999). Par ailleurs, avec ce cocktail, nous avons choisi de tester l'IL-3 en faible dose (0,5 ng/mL) qui exige un milieu sans sérum pour jouer son rôle de maintien des cellules primitives.

Nous avons donc développé l'expansion en co-culture avec les CSM et à BC-O₂ afin de réguler et de moduler la forte stimulation des cellules primitives qui aboutit à l'épuisement du contenu du greffon en CSH (par prolifération et différenciation) et donc d'assurer les conditions permettant la préservation d'une sous-population cellulaire primitive.

Avec ce protocole, nous observons que le maintien des cellules souches aux BC-O₂ a été, sans surprise, accompagné par une baisse de l'expansion du greffon.

Toutefois, l'analyse des travaux rapportés dans la littérature (Robinson et al., 2006; 2011; Walenda et al., 2011; Magin et al., 2007; da Silva et al., 2005; Madkaikar et al., 2007; Fei et al., 2007; Jang et al., 2006; Wagner et al., 2007b; McNiece et al., 2004; Zhang et al., 2004; Zhang et al., 2006; Wang et al., 2004; Kögler et al., 2005; De Angeli et al., 2009; Yamaguchi et al., 2002; Kadereit et al., 2002) montre que les taux d'expansion que nous avons obtenus, y compris aux BC-O₂, demeurent très élevés par rapport à la majorité de ces études. De plus, dans la plupart de

ces travaux, les tests *in vivo* reflétant le contenu en cellules primitives ayant le potentiel de repoplement médullaire n'ont pas été réalisés.

L'équipe de Shpall EJ aux États-Unis avait obtenu une expansion intéressante en cellules totales, en CFC et en cellules CD34⁺ lors d'une co-culture avec les CSM (McNiece et al., 2004). Dans ce travail, les auteurs ont utilisé des CMN placentaires sans sélection phénotypique préalable. Ensuite, ils ont répété ces expériences dans le but de comparer la co-culture de CMN placentaires avec des CSM par rapport à la culture simple de cellules CD133⁺. Ainsi, ils observent que l'expansion sur des matériels sélectionnés (CD133⁺) par rapport à celle sans sélection conduit à une perte significative des cellules d'intérêt (les taux d'expansion étant respectivement de 2 versus 8 fois pour les cellules CD34⁺, 6 versus 31 fois pour les cellules CD133⁺ et 20 versus 202 fois pour les CFC) (Robinson et al., 2006). Cependant, cette étude a été conduite en présence de sérum animal (SVF irradié) dans le milieu de culture, et, en dehors du test CAFC (*Cobblestone Area Forming Cell*), aucun test fonctionnel permettant de mettre en évidence le maintien des cellules avec capacité de greffe n'a été réalisé malgré une durée de culture (14 jours) préjudiciable au bon maintien de ces cellules.

Malgré tout, les leçons tirées suite à ces études ont permis à cette équipe de développer la 1^{ère} et la seule étude clinique dans l'expansion de greffons placentaire en co-culture avec des CSM (Robinson et al., 2011). Dans ce travail, l'expansion concernait des unités de SP pauvres en CMN qui ont été co-cultivées avec des CSM en présence de SCF, FL, G-CSF et le TPO pendant 14 jours en 2 étapes. Dans cette étude les CSM utilisées étaient « intra-familiales » ou, faute d'un donneur apparenté disponible, des CSM issues d'angioblastes médullaires pré-isolées et stockées. Avec les CSM intra-familiales, le taux d'expansion des cellules totales et de cellules CD34⁺ était dans l'ordre de 12 fois (range, 1–13) et 12 fois (range, 1-27) respectivement, et avec les CSM issues d'angioblastes la médiane d'expansion était 14-fois (range 1–30) et 40-fois (range 4-140) respectivement. Après un traitement myéloablatif, la greffe a été réalisée avec une unité décongelée non manipulée perfusée simultanément avec celle expandue. Le résultat était encourageant dans la mesure où les patients sortent de la neutropénie et la thrombopénie après 14,5 jours et 30 jours (valeur médiane), respectivement. Dans tous les cas, notre stratégie est différente puisque nous cherchons à obtenir les meilleurs résultats possibles sans avoir recours à la deuxième unité non expandue afin de diminuer le coût financier ainsi que le risque de GVHD.

En réalité, l'originalité de notre travail est liée à l'utilisation d'un facteur clé et souvent négligé pour la culture de cellules souche : les BC-O₂, autrement dit, les concentrations physiologiques en O₂. Car les rares études combinant la co-culture avec les faibles teneurs en O₂ n'ont pas atteint l'objectif final s'agissant d'adapter ces conditions à une éventuelle application chez l'Homme. Dans ce domaine, Zhambalova et al ont cultivé des CMN du SP sur les cellules stromales à 5% d'O₂ dans le but d'étudier le phénomène de base mais sans ajouter des cytokines (Zhambalova et al., 2009). De même, Koller et al avait déjà trouvé que cette même approche avec différents combinaisons cytokiniques pourrait induire l'expansion du greffon placentaire en termes de CFC et en cellules primitives LTC-IC. A noter que la co-culture a été développée avec un stroma irradié et dans un milieu contenant du sérum animal (Koller et al., 1992b).

Un modèle original d'expansion de CMN de SP proposé par Song et al, a été effectué à 5% d'O₂ (comme la plupart de ces études) mais, cette fois-ci, en milieu 3-D avec des ostéoblastes encapsulés, ce qui a également montré un bénéfice (Song et al., 2009). Une étude japonaise récente avec des cellules murines soutient également ce modèle qui reste cependant très complexe et difficilement applicable en clinique (Miyoshi et al., 2011).

En réalité, le point commun dans toutes ces études revendiquant un meilleur maintien des cellules primitives en co-culture à des oxygénations faibles, se confirme dans notre travail avec le test standard pour la détection des CSH humaines (SRC) : la xénogreffe. En outre, notre étude introduit la notion de renforcement de l'activité proliférative de la SRC en co-culture avec des cellules stromales.

En se penchant sur l'étude des mécanismes impliqués dans le « dialogue » CSM/ (CSH/PH) dans cet environnement physiologique, nous avons trouvé que les BC-O₂ peuvent aussi influencer l'expansion de façon indirecte à travers les CSM. Ainsi, nous avons montré que l'expression de facteurs de croissance importants ainsi que de molécules d'adhésion par les CSM a été induite par les BC-O₂, traduisant à la fois des mécanismes paracrines et de communications intercellulaires par contact direct. En réalité, parmi les facteurs solubles ayant été explorés, l'IL-6, l'IL-8 et le VEGF sont clairement influencés positivement par les BC-O₂ (dans les surnageants de CSM et de co-culture), ce qui correspond aux données de la littérature (Potier et al., 2007; Annabi et al., 2003; Tamama et al., 2011; Zhambalova et al., 2009; Rasmussen et al., 2011; Lee et al., 2009; Jing et al., 2012). Cette activité des CSM est régulée directement ou indirectement par le facteur

HIF-1 α qui se stabilise au deçà de 5% d'O₂ pour agir sur les CSM à différents niveaux (Rehn et al., 2011; Okuyama et al., 2006).

Potier et al a confirmé cette différence de sécrétion du VEGF par les CSM liée à l'oxygénation de la culture sans qu'il ne trouve de variations des quantités d'IL-6 ni d'IL-8 (Potier et al., 2007). Cependant, ce dernier résultat pourrait s'expliquer par une durée de culture trop brève dans cette étude (48h) car les variations significatives dans notre étude se sont avérées seulement au-delà du 3^{ème} jour pour l'IL-6 et du 4^{ème} jour pour l'IL-8. Pourtant, dans une autre étude où les CSM humaines ont été incubées pendant 2 jours à BC-O₂ et sans sérum dans leur milieu de culture, IL-6 et MCP1, à côté de VEGF, ont été trouvés en quantités nettement plus importantes en comparaison avec la condition de 20% d'O₂ (Hung et al., 2007a).

Crisostomo et al (Crisostomo et al., 2008) montre qu'après 24 heures de culture de CSM à 1% d'O₂ les taux de VEGF de FGF-2 augmentent alors que le taux de HGF reste non influencé par l'oxygénation. Pour Tamama, ce sont les trois facteurs qui se trouvent stimulés à 1% d'O₂ (Tamama et al., 2011). Dans notre étude, il nous a été impossible de conclure quant à la stimulation de synthèse de FGF-2 puisque celui-ci est ajouté au milieu de culture de CSM.

Il existe plusieurs données dans la littérature suggérant l'implication de ces facteurs solubles, à savoir, l'IL-6 (Rodríguez et al., 2004; Ulich et al., 1991; Bordeaux-Rego et al., 2009; Nakahata, 2001), l'IL-8 (Kim et al., 2005; Zhambalova et al., 2009) et le VEGF (Rehn et al., 2011; Jing et al., 2012) dans le maintien des cellules hématopoïétiques primitives que ce soit *ex vivo* ou *in vivo*. Le rôle de l'IL-6 a été testé soit comme facteur sécrété par les cellules de support (endogène), soit comme facteur participant aux cocktails de cytokines destinés à induire l'expansion (exogène). En ce qui concerne l'IL-8 et le VEGF, ces facteurs sont toujours issus d'une sécrétion des cellules de support (endogène), ce qui souligne l'intérêt de ces cellules et son rôle paracrine.

L'oxygénation physiologique a également prouvé son intérêt dans l'amélioration de l'action de l'IL-6 notamment sur les cellules hématopoïétiques primitives. Dans ce contexte, il a été démontré une diminution de l'expansion des cellules hématopoïétiques cultivées avec des surnageants des CMN médullaires suite au traitement avec un inhibiteur de l'IL-6. Cet effet n'a en effet été observé qu'avec les surnageants de culture à faible concentration d'O₂ (Li et al., 2011). De même, notre équipe avait constaté que les effets positifs sur les progéniteurs engagés

dans des co-cultures à faible concentration d'O₂ après la stimulation par l'IL-17, semblaient être associés à une augmentation de la sécrétion d'IL-6 (Krstic et al., 2009). En outre, ce scénario est consolidé par les données obtenues avec des cellules médullaires murines rapportant que l'IL-6 exogène agit en synergie avec les BC-O₂ (1% en l'occurrence) afin de maintenir la fonctionnalité de la sous-population pré-CFC, effet indétectable à 20% d'O₂ (Kovacevic-Filipovic et al., 2007).

La relation entre VEGF et BC-O₂ a été déjà établie dans le micro-environnement des cellules cancéreuses. En ce qui concerne l'hématopoïèse, plusieurs études soulignent le rôle crucial de ce facteur dans le maintien des cellules hématopoïétiques primitives. En effet, Rehn et al montre dans un modèle murin dont les HRE du promoteur de *vegf* sont mutés que l'oxygénation physiologique de la niche médullaire agit sur les CSH principalement à travers cette voie du VEGF-A (Rehn et al., 2011). Le VEGF est par ailleurs connu parmi les cibles directes du facteur HIF-1 dans les CSH (Kirito et al., 2005). Une étude très récente a montré que la co-culture de cellules CD34⁺ de CSP mobilisées avec des CSM à 0,5% d'O₂ s'accompagne d'une hyper sécrétion de VEGF (Jing et al., 2012).

Après identification de l'effet des BC-O₂ sur la sécrétion cytokinique nous avons effectué des tests fonctionnels dans le but de vérifier l'implication réelle de cet effet dans l'expansion.

Avec les réserves liées à l'utilisation de quantité de surnageants dilués induisant un manque d'efficacité, nos résultats montrent que les surnageants de CSM n'induisent pas l'expansion des cellules CD34⁺ alors qu'elle l'est par les surnageants de la co-culture et de façon plus importante par les surnageants de la culture de cellules CD34⁺. Pour expliquer ce dernier résultat, il faut d'abord noter que bien que les surnageants de CSM soient très riches en IL-6, IL-8, VEGF, FGF-2, TGF-β1 et en SDF-1, ils restent cependant très pauvres en cytokines G-CSF, IL-3, SCF et TPO (endogènes ou exogènes) contrairement aux autres surnageants. Ces cytokines secrétées par les CSM ne sont pas connues pour agir positivement sur l'hématopoïèse. Au contraire, le TGF-β1 est un facteur inhibiteur puissant de l'hématopoïèse comme nous l'avons déjà souligné (Larsson et al., 2003) et qui diminue l'entrée en cycle des CSH même après la stimulation par la TPO et IL-6 (Fortunel et al., 2003). L'IL-8, dans ce sens, est également considérée par plusieurs auteurs comme agissant négativement sur l'hématopoïèse (Broxmeyer et al., 2005; de Vasconcellos et al., 2011). En réalité, on peut se demander si les cytokines non abondantes dans les surnageants des CSM sont les responsables de la stimulation de l'expansion dans le cas des autres surnageants.

De plus, comme les surnageants de la co-culture ont induit l'expansion cellulaire moins que les surnageants de la culture de CD34⁺, ce qui va à l'encontre des résultats que nous avons obtenus avec notre protocole d'expansion, ceci suggère que, d'une part les cytokines de CSM n'interviennent pas directement sur la prolifération de cellules CD34⁺ et d'autre part, le contact cellulaire direct occupe une place primordiale dans l'effet que nous avons obtenu (l'amplification massive du produit d'expansion constatée dans les conditions de co-culture) en réagissant en synergie avec les cytokines exogènes.

Bien entendu, ces dernières données ne permettent pas de négliger l'implication de l'effet paracrine des CSM stimulées par les BC-O₂ dans l'état fonctionnel des cellules hématopoïétiques dont la détermination exige d'autres types de tests.

Le contact cellulaire est décrit par certains auteurs comme indispensable pour l'expansion de CSH (Breems et al., 1998). Il pourrait également avoir un rôle dans le maintien de primitivité cellulaire comme l'indiquent les travaux de Wagner qui montrent que c'est précisément dans la fraction de cellules hématopoïétiques adhérentes à la couche stromale que se trouvent les cellules très primitives (Wagner et al., 2007a). Quant à nous, notre travail a mentionné une régulation positive des antigènes CD146, CD49a, CD200, CD54, CD105, sur les CSM incubées à 5% d'O₂. Ils sont donc probablement impliqués dans un mécanisme de contact cellulaire direct participant à l'effet des CSM à BC-O₂. Les CD146, CD200, CD49a sont considérés parmi les marqueurs de primitivité de CSM (Delorme et al., 2008; Jones et al., 2002; Sacchetti et al., 2007), ce qui suggère que les BC-O₂ favorisent un profil primitif de CSM, une hypothèse confortée par nos données obtenues avec l'analyse de CFU-F. Le CD54 (ICAM-1) est exprimé, non seulement par les cellules stromales, mais également par des progéniteurs hématopoïétiques immatures. Il est susceptible d'avoir un rôle important dans l'interaction cellules hématopoïétiques- cellules stromales et donc dans la régulation de l'hématopoïèse (Arkin et al., 1991). Zhambalova et al ont également décrit dans leurs travaux une régulation positive de CD54 sur les CSM incubées à 5% d'O₂ (Zhambalova et al., 2009).

Il faut signaler néanmoins que sur les cellules hématopoïétiques issues de l'expansion à J10 nous n'avons pas mis en évidence de variations quant à l'expression des molécules d'adhésion VLA-4, LFA-1 ni de CXCR-4. Ceci a également été observé par Jing et al concernant les mêmes molécules, à l'exception de LFA-1 pour lequel ils montrent une expression plus importante sur les cellules hématopoïétiques à 0,5% d'O₂ (Jing et al., 2012).

Toutefois, l'aspect mécanistique de ce dialogue CSM \Leftrightarrow CSH/PH sera étudié de façon plus approfondie. En effet, le rôle du contact direct dans notre étude doit être testé en effectuant la co-culture avec ou sans contact direct entre les CSM et les CSH/PH (utilisation d'une membrane *Transwell*). Ceci permettra de mettre en évidence le retentissement d'effet paracrine en abolissant l'interaction directe.

Nous comptons par ailleurs avoir recours à un anticorps neutralisant directement l'IL-6 (Li et al., 2011), à un inhibiteur indirect de la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 : le SN50 (*N-acetyl cysteine*) (Rafiee et al., 2009) et à un anticorps monoclonal anti-VEGF Avastin : l'Avastin (bévacizumab). L'inhibition de ces facteurs lors de la co-culture à BC-O₂ apportera sans doute des informations intéressantes concernant le rôle réel de chacun.

En ce qui concerne l'analyse phénotypique et métabolique des cellules issues de nos conditions de culture, nous avons observé que le nombre de cellules CD34⁺/CD133⁺, ainsi que l'activité ALDH dans les populations CD34⁺ diminuent de manière synchrone à la baisse des concentrations d'O₂, un comportement similaire à celui du nombre de progéniteurs engagés. Ce constat semble logique puisque même à l'état basal (cellules fraîchement isolées), la plupart des cellules CD34⁺ CD133⁺ et des cellules CD34⁺ ALDH⁺ sont, en réalité, des progéniteurs engagés en prenant en considération la faible fréquence de cellules souches au sein de ces populations identifiées phénotypiquement/métaboliquement. En conséquence, le niveau plus élevé de la fraction ALDH⁺ à 20% O₂ est cohérent avec l'amplification plus importante des progéniteurs. Ainsi les cellules primitives (SRC et pré-CFC) maintenues ou augmentée à des concentrations faibles d'O₂ demeurent très minoritaires au sein du produit d'expansion. Le critère ALDH ne s'avère donc pas suffisamment discriminant pour révéler ces cellules primitives ALDH⁺ ou sein d'une population majoritaire en progéniteurs et eux-mêmes ALDH⁺. La mise en évidence des CSH dans ces conditions devrait faire appel à d'autres marqueurs (*side population* par exemple).

En tout état de cause, il faut souligner que la relation phénotype/fonction est assez complexe en ce qui concerne les cellules souches. Bien que les marqueurs phénotypiques/métaboliques (CD34, CD133, ALDH, *Side Population* ...etc.) représentent un outil incontournable pour identifier et isoler des cellules primitives sur du matériel fraîchement isolé, permettant ainsi d'enrichir le greffon hématopoïétique en cellules primitives, leur utilité et leur expression sur des cellules ayant subi une hyperstimulation au cours de la culture n'ont pas fait l'objet d'études et demeurent donc des paramètres discutables. Dans ce sens, il a été montré qu'au cours de l'expansion *ex vivo*

de greffons hématopoïétiques on obtient, le plus souvent, un nombre considérable de CD34⁺ suite à la culture. Cependant, ces cellules pour la plupart perdent le caractère souche (ne possédant pas d'activité SRC) (Danet et al., 2001; holyoake et al., 1997; Dorrell et al., 2000). Cette problématique de l'instabilité du rapport phénotype/fonction nous laisse supposer que les cellules souches sont plutôt une entité fonctionnelle ayant des expressions phénotypiques qui peuvent être hétérogènes (Zipori, 2004).

Concernant le rôle de l'IL-3, l'examen détaillé des expériences faites avec cette cytokine indique que son effet différenciateur sur les CSH est lié d'une part, à la présence de sérum dans le milieu et d'autre part (Herrera et al., 2001), à l'utilisation d'une dose élevée (Ivanovic, 2004). Ainsi, l'IL-3 en faible dose dans une culture sans sérum exerce un effet bénéfique synergique avec les BC-O₂ sur le maintien de cellules primitives, en même temps que sur l'expansion des progéniteurs engagés (Ivanovic et al., 2004). En ce qui concerne notre travail, l'exclusion du sérum dans notre culture nous a permis de faire appel à l'IL-3 en faible dose. Ainsi, nous avons montré que, sur le plan quantitatif, l'IL-3 a stimulé les taux d'expansion dans quelques conditions ; sur le plan fonctionnel, l'IL-3 s'est montré indispensable pour le maintien de l'activité SRC en co-culture aux BC-O₂ ; elle a même permis d'amplifier nettement le nombre de SRC en co-culture à 1,5% d'O₂ où l'effet était IL-3-dépendant. L'importance du rôle de l'IL-3 a été démontrée dans plusieurs travaux (Bordeaux-Rego et al., 2009).

Dans les études basées sur la culture cellulaire, il est important de réaliser des analyses génomiques visant à vérifier éventuelles aberrations chromosomiques. Ces analyses n'ont pas été faites à ce stade de notre travail. Néanmoins, nous estimons que notre recours aux BC-O₂, se montrant faiblement stimulateur de la production de ROS par rapport à 20% d'O₂, pourrait constituer un point positif dans ce domaine.

En conclusion, les données présentées dans ce document soutiennent fermement la thèse selon laquelle une faible concentration d'O₂ est un régulateur physiologique de l'hématopoïèse assurant, en association avec les CSM et le cocktail cytokinique, les conditions favorables pour développer l'expansion *ex vivo* des « petits greffons », ce qui est aujourd'hui primordial pour l'hématologie expérimentale.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le recours au sang placentaire pour la transplantation de CSH/PH est primordial étant donné qu'il reste la seule solution potentielle pour 30% des receveurs. Toutefois, 50% des unités de SP prélevées sont non-conformes. Ceci a donc été le point de départ pour développer les protocoles d'expansion *ex vivo* de ce type de greffon afin d'exploiter cette source de manière optimale. Malgré une réussite indéniable dans le domaine de l'autogreffe de CSP mobilisées, l'expansion de SP s'est d'abord heurtée à de sérieux obstacles liés notamment à l'épuisement des cellules primitives capables de greffer à long terme.

Dans ce travail de thèse, nous avons proposé que le fait de se rapprocher des conditions physiologiques, en cultivant les CSH/PH avec les CSM à de BC-O₂, serait optimal pour préserver la sous-population souche du greffon au cours de l'expansion. Ainsi, au terme de cette étude, nous avons démontré que la co-culture sous oxygène à de faibles concentrations et en présence d'IL-3 (à faible dose) représente une condition particulièrement favorable au maintien des cellules souches (SRC).

L'ensemble de nos résultats suggère que l'effet de co-culture à BC-O₂ pourrait être schématiquement décrit comme suit (Figure 37) : Le greffon hématopoïétique placentaire de cellules CD34⁺ à J0 possède des cellules primitives (SRC et pré-CFC) en faible quantité avec des progéniteurs engagés qui représentent la majorité des cellules CD34⁺. Après l'expansion à 20% d'O₂, de nouveaux compartiments de précurseurs ainsi que de cellules matures apparaissent suite à la différenciation que subissent les progéniteurs. En même temps, le compartiment de progéniteurs engagés s'amplifie avec l'engagement massif de cellules primitives dont le stock s'épuise rapidement. Ce processus est valable également pour l'expansion en co-culture aux faibles taux d'O₂ mais néanmoins avec des différences fondamentales. En effet, la stimulation et l'engagement de cellules primitives n'étant pas excessifs, le compartiment de progéniteurs engagés est moins amplifié; sous l'influence de BC-O₂, ces cellules primitives s'auto-renouvellent ce qui augmente ce compartiment.

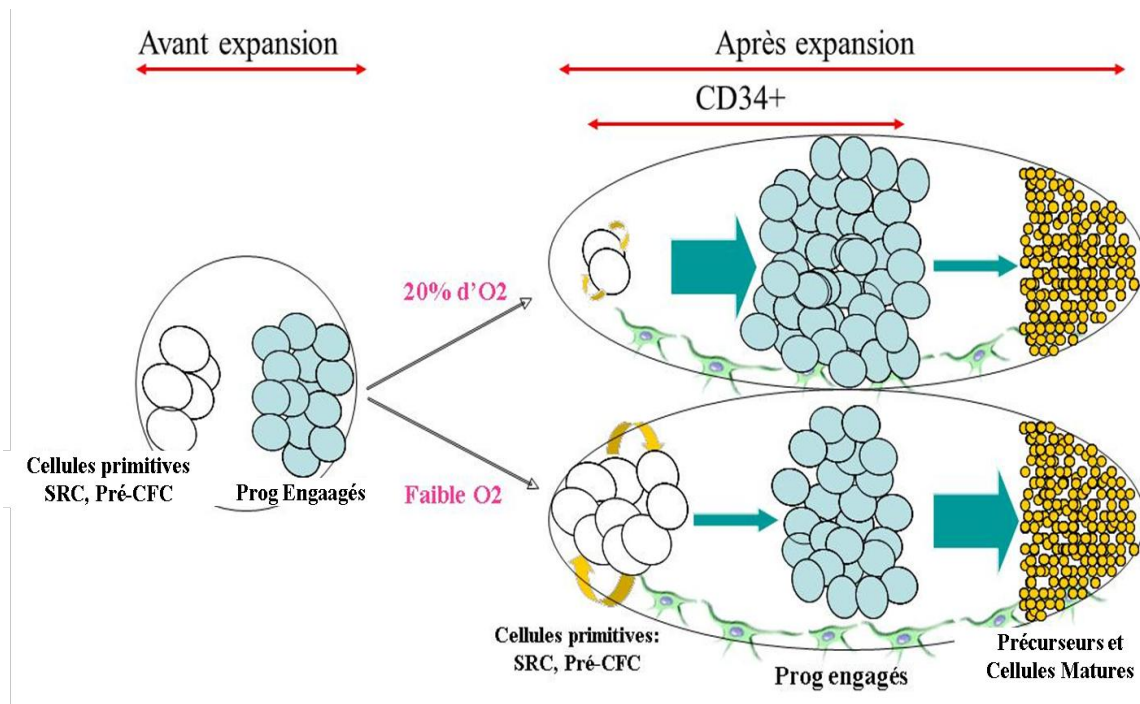


Figure 37 : Schéma représentant le greffon avant et après expansion dans nos conditions de culture.

Aujourd'hui, devant la pauvreté d'une unité de SP, le recours à l'injection de deux unités est systématique. Toutefois, comme nous l'avons déjà cité, cette solution ne permet pas d'éviter une durée prolongée de la cytopénie post-greffe ; de plus, elle s'accompagne d'une incidence élevée de GVHD, sans oublier le coût élevé de cette procédure. Ainsi, l'amélioration et la maîtrise de l'expansion *ex vivo* pourrait logiquement permettre à cette méthode de s'imposer comme choix numéro 1 offrant la possibilité d'utiliser une seule unité de SP pour la greffe évitant, par conséquent, tous les inconvénients précédemment cités. Ces avancées dans l'optimisation de l'expansion pourront également élargir ses champs d'application pour devenir systématique non seulement dans le domaine du SP mais dans tous les types de greffons.

Ce point constituait le but final de notre étude et nos résultats permettent donc de répondre à l'enjeu majeur de la greffe à savoir, la fonctionnalité et l'efficacité. Ils méritent donc d'être pris en considération comme nouvelle voie qui pourrait améliorer les procédures d'expansion *ex vivo* et avoir des retentissements importants sur l'hématologie expérimentale.

Perspectives

Comme nous avons évoqué précédemment, nous envisageons de vérifier notre hypothèse concernant le rôle du contact direct et de l'effet paracrine en effectuant la co-culture CSM/CSH/PH en utilisant des transwell. Avec ce système de co-culture nous allons utiliser des anticorps dirigés à la fois contre l'IL-6 et l'IL-8 ou uniquement anti-IL-6 ou anti-VEGF.

L'impact sur le maintien ou l'épuisement des CSH dans ces conditions de cultures sera évalué par des tests de xénogreffe en utilisant un nombre similaire de cellules CD34⁺ sélectionnées à J10. Sur ces cellules nous réaliserons également des tests métaboliques (*Side Population*, Activité ROS ... etc) ainsi qu'une étude du cycle cellulaire.

Bien qu'il soit établi aujourd'hui leur stabilité génomique in vitro, il demeure indispensable de réaliser des contrôles caryotypiques sur les CSM avant toute utilisation clinique. Ceci concerne également les cellules du produit d'expansion.

D'autre part, nous sommes en train de travailler sur les cellules issues des filtres de déleucocytation (FD) qui représentent une autre source prometteuse non négligeable de CSH. Notre équipe a déjà mis au point une technique permettant d'isoler des cellules CD34⁺ ayant le caractère souche (Ivanovic et al., 2006). Comme dans le cas de greffe utilisant des cellules issues du sang placentaire, l'expansion *ex vivo* trouve facilement sa raison d'être dans la perspective des greffes qui font appel à ce type de source de greffon qualifié de « pauvre ». A la lumière des résultats obtenus avec l'expansion du SP, nous avons appliqué notre protocole d'expansion consistant en une co-culture avec des CSM à BC-O₂ sur le greffon de cellules CD34⁺ issues de FD. Nos résultats préliminaires montrent que ces conditions de culture assurent le maintien de cellules CD34⁺ primitives de façon plus importante que la culture classique à 20% d'O₂. Ces résultats sont obtenus sur la base d'une analyse du cycle cellulaire des cellules CD34⁺ sélectionnées en fin de culture et marquées par Ki 67-IP. Nous prévoyons d'effectuer des tests fonctionnels sur le produit d'expansion de ces cellules afin de mettre en évidence l'intérêt réel de notre protocole dans l'expansion de ce type de greffon.

BIBLIOGRAPHIE

Ahmed N, Berridge MV. Regulation of glucose transport by interleukin-3 in growth factor-dependent and oncogene-transformed bone marrow-derived cell lines. *Leuk Res.* 1997;21(7):609-18.

Alakel N, Jing D, Muller K, Bornhauser M, Ehninger G, Ordemann R. Direct contact with mesenchymal stromal cells affects migratory behavior and gene expression profile of CD133+ hematopoietic stem cells during ex vivo expansion. *Exp Hematol.* 2009; 37(4):504-13.

Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci.* 2002; 22(3):629-34.

Ando K, Yahata T, Sato T, Miyatake H, Matsuzawa H, Oki M, et al. Direct evidence for ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood.* 2006;107(8):3371-7

Andrade PZ, dos Santos F, Almeida-Porada G, da Silva CL, S Cabral JM. Systematic delineation of optimal cytokine concentrations to expand hematopoietic stem/progenitor cells in co-culture with mesenchymal stem cells. *Mol Biosyst.* 2010; 6(7):1207-15.

Annabi B, Lee YT, Turcotte S, Naud E, Desrosiers RR, Champagne M, et al. Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. *Stem Cells* 2003; 21(3): 337-47.

Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell.* 2002;109(1):39-45.

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):149-61.

Arai F, Suda T. Regulation of hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 602:61-7.

Arai F, Yoshihara H, Hosokawa K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, et al. Niche regulation of hematopoietic stem cells in the endosteum. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1176:36-46.

Arkin S, Naprstek B, Guarini L, Ferrone S, Lipton JM. Expression of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) on hematopoietic progenitors. *Blood.* 1991; 77(5):948-53.

Arroyo AG, Taverna D, Whittaker CA, Strauch UG, Bader BL, Rayburn H, et al. In vivo roles of integrins during leukocyte development and traffic: insights from the analysis of mice chimeric for alpha 5, alpha v, and alpha 4 integrins. *J Immunol.* 2000; 165(8):4667-75.

Askmyr M, Sims NA, Martin TJ, Purton LE. What is the true nature of the osteoblastic hematopoietic stem cell niche? *Trends Endocrinol Metab.* 2009; 20(6):303-9.

Astori G, Malangone W, Adami V, Risso A, Dorotea L, Falasca E, et al. A novel protocol that allows short-term stem cell expansion of both committed and pluripotent hematopoietic progenitor cells suitable for clinical use. *Blood Cells Mol Dis.* 2001; 27(4):715-24; discussion 725-7.

Auletta JJ, Zale EA, Welter JF, Solchaga LA. Fibroblast Growth Factor-2 Enhances Expansion of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells without Diminishing Their Immunosuppressive Potential. *Stem Cells Int.* 2011; 2011:235176.

Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, Tejada R, Liao F, Shido K, et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med.* 2004; 10(1):64-71.

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

Bakhshi T, Zabriskie RC, Bodie S, Kidd S, Ramin S, Paganessi LA, et al. Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of umbilical cord segments provide stromal support for the

maintenance of cord blood hematopoietic stem cells during long-term ex vivo culture. *Transfusion*. 2008; 48(12):2638-44.

Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*. 2003; 108(7):863-8.

Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, McGlave PB, Miller JS, et al. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood*. 2005; 105(3):1343-7.

Baron F, Storb R, Little MT. Hematopoietic cell transplantation: five decades of progress. *Arch Med Res*. 2003;34(6):528-44.

Basciano L, Nemos C, Foliguet B, de Isla N, de Carvalho M, Tran N, et al. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC Cell Biol*. 2011; 12:12.

Bertram C, Hass R. Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging. *Biol Chem*. 2008; 389(3):211-20.

Bertrand JY, Chi NC, Santoso B, Teng S, Stainier DY, Traver D. Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development. *Nature*. 2010; 464(7285) : 108- 11.

Beshlawy AE, Metwally HG, Khalek KA, Hammoud RF, Mousa SM. The effect of freezing on the recovery and expansion of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *Exp Clin Transplant*. 2009; 7(1):50-5.

Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(6):652-7.

Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K, et al. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol*. 2001; 2(2):172-80.

Bhatia M, Bonnet D, Wu D, Murdoch B, Wrana J, Gallacher L, et al. Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 1999;189(7):1139-48.

Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, et al. Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp Cell Res*. 2003; 287(1):98-105.

Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2008; 2(4):313-9.

Boiron JM, Dazey B, Cailliot C, Launay B, Attal M, Mazurier F, et al. Large-scale expansion and transplantation of CD34(+) hematopoietic cells: in vitro and in vivo confirmation of neutropenia abrogation related to the expansion process without impairment of the long-term engraftment capacity. *Transfusion*. 2006;46(11):1934-42.

Bonig H, Wundes A, Chang KH, Lucas S, Papayannopoulou T. Increased numbers of circulating hematopoietic stem/progenitor cells are chronically maintained in patients treated with the CD49d blocking antibody natalizumab. *Blood*. 2008;111(7):3439-41

Bonnet D, Bhatia M, Wang JC, Kapp U, Dick JE. Cytokine treatment or accessory cells are required to initiate engraftment of purified primitive human hematopoietic cells transplanted at limiting doses into NOD/SCID mice. *Bone Marrow Transplant*. 1999;23(3):203-9.

Bonnet D. Les cellules souches hématopoïétiques chez la souris et chez l'homme : CD34 positives et/ou négatives ? *Hématologie*. 1999; 5, Numéro 6, 431-8.

Bonnet D. Haematopoietic stem cells. *J Pathol*. 2002;197(4):430-40.

Bordeaux-Rego P, Luzo A, Costa FF, Olalla Saad ST, Crosara-Alberto DP. Both interleukin-3 and interleukin-6 are necessary for better ex vivo expansion of CD133+ cells from umbilical cord blood. *Stem Cells Dev.* 2010; 19(3):413-22.

Bowie MB, Kent DG, Copley MR, Eaves CJ. Steel factor responsiveness regulates the high self-renewal phenotype of fetal hematopoietic stem cells. *Blood.* 2007; 109(11):5043-8.

Bradford GB, Williams B, Rossi R, Bertoncetto I. Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment. *Exp Hematol.* 1997; 25(5):445-53.

Bradley TR, Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 1966; 44(3):287-99.

Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett.* 2007; 581(19):3582-91.

Breems DA, Blokland EA, Neben S, Ploemacher RE. Frequency analysis of human primitive haematopoietic stem cell subsets using a cobblestone area forming cell assay. *Leukemia.* 1994; 8(7):1095-104.

Breems DA, Blokland EA, Siebel KE, Mayen AE, Engels LJ, Ploemacher RE. Stroma-contact prevents loss of hematopoietic stem cell quality during ex vivo expansion of CD34+ mobilized peripheral blood stem cells. *Blood.* 1998; 91(1):111-7.

Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, Ribeiro RC, Graves V, Yoder M, et al. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(9):4109-13.

Broxmeyer HE, Cooper S, Hangoc G, Kim CH. Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 selectively counteracts inhibitory effects of myelosuppressive chemokines on hematopoietic progenitor cell proliferation in vitro. *Stem Cells Dev.* 2005;14(2):199-203.

Brugger W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L. Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated ex vivo. *N Engl J Med.* 1995; 333(5):283-7.

Brunet de la Grange, P. Régulation de l'Hématopoïèse par les basses concentrations d'oxygène : Rôles de l'antigène CD34 et du facteur de croissance VEGF165. In *Sciences Biologiques et Medicales* (2004). These n°1254 (Bordeaux, Victor Segalen Bordeaux 2).

Bruno E, Cooper RJ, Wilson EL, Gabilove JL, Hoffman R. Basic fibroblast growth factor promotes the proliferation of human megakaryocyte progenitor cells. *Blood.* 1993; 82(2):430-5.

Bryder D, Jacobsen SE. Interleukin-3 supports expansion of long-term multilineage repopulating activity after multiple stem cell divisions in vitro. *Blood.* 2000; 96(5):1748-55.

Busuttil RA, Rubio M, Dollé ME, Campisi J, Vijg J. Oxygen accelerates the accumulation of mutations during the senescence and immortalization of murine cells in culture. *Aging Cell.* 2003; 2(6):287-94.

Butler JM, Nolan DJ, Vertes EL, Varnum-Finney B, Kobayashi H, Hooper AT, et al. Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010; 6(3):251-64.

Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 2003; 425(6960):841-6.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991; 9(5):641-50.

Carion A, Benboubker L, Hérault O, Roingeard F, Degenne M, Senecal D, et al. Stromal-derived factor 1 and matrix metalloproteinase 9 levels in bone marrow and peripheral blood of patients mobilized by granulocyte colony-stimulating factor and chemotherapy. Relationship with mobilizing capacity of haematopoietic progenitor cells. *Br J Haematol.* 2003;122(6) :918-26.

Carlo-Stella C, Mangoni L, Rizzoli V. Biology and clinical applications of long-term bone marrow cultures. *Int J Artif Organs*. 1993;16 Suppl 5:76-9.

Carrancio S, López-Holgado N, Sánchez-Guijo FM, Villarón E, Barbado V, Tabera S, et al. Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp Hematol*. 2008; 36(8): 1014-21.

Carrera S, de Verdier PJ, Khan Z, Zhao B, Mahale A, Bowman KJ, et al. Protection of cells in physiological oxygen tensions against DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2010; 285(18): 13658-65.

Cashman J, Bockhold K, Hogge DE, Eaves AC, Eaves CJ. Sustained proliferation, multi-lineage differentiation and maintenance of primitive human haemopoietic cells in NOD/SCID mice transplanted with human cord blood. *Br J Haematol*. 1997; 98(4):1026-36.

Cashman JD, Eaves CJ, Sarris AH, Eaves AC. MCP-1, not MIP-1 α , is the endogenous chemokine that cooperates with TGF- β to inhibit the cycling of primitive normal but not leukemic (CML) progenitors in long-term human marrow cultures. *Blood*. 1998; 92(7):2338-44.

Chadwick K, Wang L, Li L, Menendez P, Murdoch B, Rouleau A, Bhatia M. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood*. 2003; 102(3):906-15.

Cheng L, Qasba P, Vanguri P, Thiede MA. Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *J Cell Physiol*. 2000a; 184(1):58-69.

Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, Sykes M, et al. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21^{cip1}/waf1. *Science*. 2000b; 287(5459):1804-8.

Cheng X, Macvittie T, Meisenberg B, Welty E, Farese A, Tadaki D, et al. Human brain endothelial cells (HUBEC) promote SCID repopulating cell expansion through direct contact. *Growth Factors*. 2007; 25(3):141-50.

Cheung AM, Kwong YL, Liang R, Leung AY. Stem cell model of hematopoiesis. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2006;1(3):305-15.

Chiba H, Kobune M, Kato J, Kawano Y, Ito Y, Nakamura K, et al. Wnt3 modulates the characteristics and cobblestone area-supporting activity of human stromal cells. *Exp Hematol*. 2004; 32(12):1194-203.

Chivu M, Diaconu CC, Bleotu C, Alexiu I, Brasoveanu L, Cernescu C. The comparison of different protocols for expansion of umbilical-cord blood hematopoietic stem cells. *J Cell Mol Med*. 2004;8(2):223-31.

Cho S, Spangrude GJ. Enrichment of functionally distinct mouse hematopoietic progenitor cell populations using CD62L. *J Immunol*. 2011; 187(10):5203-1.

Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*. 1998; 125(4):725-32.

Choi BK, Joo SY, Moon C, Park KS, Kim SH, Park JB, et al. Reconstitution of human lymphocytes following ex vivo expansion of human umbilical cord blood CD34+ cells and transplantation in Rag2^{-/-} gamma c^{-/-} mice model. *Transplant Proc*. 2008; 40(8):2655-60.

Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. Modeling pO(2) distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model. *Biophys J*. 2001;81(2):675-84.

Christensen JL, Weissman IL. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(25) :14541-6.

Chung YJ, Park BB, Kang YJ, Kim TM, Eaves CJ, Oh IH. Unique effects of Stat3 on the early phase of hematopoietic stem cell regeneration. *Blood*. 2006; 108(4):1208-15.

Chute JP, Muramoto GG, Whitesides J, Colvin M, Safi R, Chao NJ, et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(31):11707-12.

Cipolleschi MG, Dello Sbarba P, Olivotto M. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood*. 1993; 82(7): 2031-7.

Cipolleschi MG, Rovida E, Ivanovic Z, Praloran V, Olivotto M, Dello Sbarba P. The expansion of murine bone marrow cells preincubated in hypoxia as an in vitro indicator of their marrow-repopulating ability. *Leukemia*. 2000;14(4):735-9.

Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol*. 1984;133(1):157-65.

Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(7):3213-8.

Confer DL. Unrelated marrow donor registries. *Curr Opin Hematol*. 1997;4(6):408-12.

COOPER PD, BURT AM, WILSON JN. Critical effect of oxygen tension on rate of growth of animal cells in continuous suspended culture. *Nature*. 1958;182(4648):1508-9.

Copin JC, Gasche Y, Chan PH. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase does not prevent neonatal lethality in mutant mice that lack manganese superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(10):1571-6.

Corre J, Planat-Benard V, Corberand JX, Pénicaud L, Casteilla L, Laharrague P. Human bone marrow adipocytes support complete myeloid and lymphoid differentiation from human CD34 cells. *Br J Haematol*. 2004;127(3):344-7.

Coulombel L, Auffray I, Gaugler MH, Roseblatt M. Expression and function of integrins on hematopoietic progenitor cells. *Acta Haematol*. 1997;97(1-2):13-21.

Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):301-13.

Crisostomo PR, Wang Y, Markel TA, Wang M, Lahm T, Meldrum DR. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-alpha, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;294(3):C675-82.

D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Roos BA, Schiller PC. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. *Bone*. 2006; 39(3):513-22.

da Silva CL, Gonçalves R, Crapnell KB, Cabral JM, Zanjani ED, Almeida-Porada G. A human stromal-based serum-free culture system supports the ex vivo expansion/maintenance of bone marrow and cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Exp Hematol*. 2005;33(7):828-35.

da Silva CL, Gonçalves R, dos Santos F, Andrade PZ, Almeida-Porada G, Cabral JM. Dynamic cell-cell interactions between cord blood haematopoietic progenitors and the cellular niche are essential for the expansion of CD34+, CD34+CD38- and early lymphoid CD7+ cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2010; 4(2):149-58.

Danet GH, Lee HW, Luongo JL, Simon MC, Bonnet DA. Dissociation between stem cell phenotype and NOD/SCID repopulating activity in human peripheral blood CD34(+) cells after ex vivo expansion. *Exp Hematol*. 2001; 29(12): 1465-73.

Danet GH, Pan Y, Luongo JL, Bonnet DA, Simon MC. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *J Clin Invest*. 2003; 112(1):126-35.

Dao MA, Arevalo J, Nolta JA. Reversibility of CD34 expression on human hematopoietic stem cells that retain the capacity for secondary reconstitution. *Blood*. 2003;101(1):112-8.

De Angeli S, Del Pup L, Febas E, Conconi MT, Tommasini M, Di Liddo R, et al. Adrenomedullin and endothelin-1 stimulate in vitro expansion of cord blood hematopoietic stem cells. *Int J Mol Med*. 2004;14(6):1083-6.

de Haan G, Nijhof W, Van Zant G. Mouse strain-dependent changes in frequency and proliferation of hematopoietic stem cells during aging: correlation between lifespan and cycling activity. *Blood*. 1997;89(5):1543-50.

de Haan G, Weersing E, Dontje B, van Os R, Bystrikh LV, Vellenga E, et al. In vitro generation of long-term repopulating hematopoietic stem cells by fibroblast growth factor-1. *Dev Cell*. 2003;4(2):241-51.

de Lima M, McMannis J, Gee A, Komanduri K, Couriel D, Andersson BS, et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41(9):771-8.

de Vasconcellos JF, Laranjeira AB, Zanchin NI, Otubo R, Vaz TH, Cardoso AA, et al. Increased CCL2 and IL-8 in the bone marrow microenvironment in acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2011;56(4):568-77.

Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000;28(8):875-84.

DeKoter RP, Singh H. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science*. 2000;288(5470):1439-41.

Delaney C, Varnum-Finney B, Aoyama K, Brashem-Stein C, Bernstein ID. Dose-dependent effects of the Notch ligand Delta1 on ex vivo differentiation and in vivo marrow repopulating ability of cord blood cells. *Blood*. 2005;106(8):2693-9.

Delaney C, Heimfeld S, Brashem-Stein C, Voorhies H, Manger RL, Bernstein ID. Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat Med*. 2010;16(2):232-6.

Delorme B, Ringe J, Gallay N, Le Vern Y, Kerboeuf D, Jorgensen C, et al. Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood*. 2008;111(5):2631-5.

Delorme B, Ringe J, Pontikoglou C, Gaillard J, Langonné A, Sensebé L, et al. Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity. *Stem Cells*. 2009;27(5):1142-51.

Dello Sbarba P, Cipolleschi MG, Olivotto M. Hemopoietic progenitor cells are sensitive to the cytostatic effect of pyruvate. *Exp Hematol*. 1987;15(2):137-42.

Dexter TM, Moore MA, Sheridan AP. Maintenance of hemopoietic stem cells and production of differentiated progeny in allogeneic and semiallogeneic bone marrow chimeras in vitro. *J Exp Med*. 1977a;145(6):1612-6.

Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol*. 1977b; 91(3):335-44.

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002; 99(10):3838-43.

Dick JE. Normal and leukemic human stem cells assayed in SCID mice. *Semin Immunol*. 1996; 8(4):197-206.

Dings J, Meixensberger J, Jäger A, Roosen K. Clinical experience with 118 brain tissue oxygen partial pressure catheter probes. *Neurosurgery*. 1998; 43(5):1082-95.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4):315-7.

Dominici M, Rasini V, Bussolari R, Chen X, Hofmann TJ, Spano C, et al. Restoration and reversible expansion of the osteoblastic hematopoietic stem cell niche after marrow radioablation. *Blood*. 2009; 114(11):2333-43.

Dorrell C, Gan OI, Pereira DS, Hawley RG, Dick JE. Expansion of human cord blood CD34(+)CD38(-) cells in ex vivo culture during retroviral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency: dissociation of SRC phenotype and function. *Blood*. 2000;95(1):102-10.

Dos Santos F, Andrade PZ, Boura JS, Abecasis MM, da Silva CL, Cabral JM. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J Cell Physiol* 2010; 223(1):27-35.

Douay L. Experimental culture conditions are critical for ex vivo expansion of hematopoietic cells. *J Hematother Stem Cell Res*. 2001; 10(3):341-6.

Drake AC, Khoury M, Leskov I, Iliopoulou BP, Fragoso M, Lodish H, et al. Human CD34+ CD133+ hematopoietic stem cells cultured with growth factors including Angptl5 efficiently engraft adult NOD-SCID Il2 γ ^{-/-} (NSG) mice. *PLoS One*. 2011; 6(4):e18382.

Drouet M, Mourcin F, Grenier N, Delaunay C, Mayol JF, Lataillade JJ, et al. Mesenchymal stem cells rescue CD34+ cells from radiation-induced apoptosis and sustain hematopoietic reconstitution after coculture and cograftering in lethally irradiated baboons: is autologous stem cell therapy in nuclear accident settings hype or reality? *Bone Marrow Transplant*. 2005; 35(12):1201-9.

Duchez P, Chevaleyre J, Vlaski M, Dazey B, Milpied N, Boiron JM, et al. Definitive set-up of clinical-scale procedure for ex-vivo expansion of cord blood hematopoietic cells for transplantation. *Cell Transplant*. 2012; 28 In press.

Duncan AW, Rattis FM, DiMascio LN, Congdon KL, Pazianos G, Zhao C, et al. Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol*. 2005; 6(3):314-22.

Durand C, Robin C, Bollerot K, Baron MH, Ottersbach K, Dzierzak E. Embryonic stromal clones reveal developmental regulators of definitive hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(52):20838-43.

Eaves AC, Eaves CJ. Maintenance and proliferation control of primitive hemopoietic progenitors in long-term cultures of human marrow cells. *Blood Cells*. 1988; 14(2-3):355-68.

Eaves CJ. Peripheral blood stem cells reach new heights. *Blood*. 1993; 82(7):1957-9.

Eliasson P, Karlsson R, Jönsson JI. Hypoxia expands primitive hematopoietic progenitor cells from mouse bone marrow during in-vitro culture and preserves the colony-forming ability. *J Stem Cells*. 2006 1:47-257.

Eliasson P, Jönsson JI. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J Cell Physiol*. 2010; 222(1):17-22.

Eliasson P, Rehn M, Hammar P, Larsson P, Sirenko O, Flippin LA, et al. Hypoxia mediates low cell-cycle activity and increases the proportion of long-term-reconstituting hematopoietic stem cells during in vitro culture. *Exp Hematol*. 2010; 38(4) : 301-310.e2.

Ende M, Ende N. Hematopoietic transplantation by means of fetal (cord) blood. A new method. *Va Med Mon (1918)*. 1972; 99(3):276-80.

Engelhardt M, Douville J, Behringer D, Jähne A, Smith A, Henschler R, et al. Hematopoietic recovery of ex vivo perfusion culture expanded bone marrow and unexpanded peripheral blood progenitors after myeloablative chemotherapy. *Bone Marrow Transplant*. 2001; 27(3):249-59.

Erecińska M, Silver IA. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol*. 2001; 128(3):263-76.

Etheridge SL, Spencer GJ, Heath DJ, Genever PG. Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2004;22(5):849-60.

Ezashi T, Das P, Roberts RM. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(13):4783-8.

Fallon P, Gentry T, Balber AE, Boulware D, Janssen WE, Smilee R, et al. Mobilized peripheral blood SSCloALDHbr cells have the phenotypic and functional properties of primitive haematopoietic cells and their number correlates with engraftment following autologous transplantation. *Br J Haematol*. 2003;122(1):99-108.

Fan J, Cai H, Tan WS. Role of the plasma membrane ROS-generating NADPH oxidase in CD34⁺ progenitor cells preservation by hypoxia. *J Biotechnol*. 2007; 130 (4): 455-62.

Fan J, Cai H, Yang S, Yan L, Tan W. Comparison between the effects of normoxia and hypoxia on antioxidant enzymes and glutathione redox state in ex vivo culture of CD34(+) cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2008; 151(2):153-8.

Fehrer C, Brunauer R, Laschob G, Unterluggauer H, Reitingen S, Kloss F, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell*. 2007; 6(6):745-57.

Fei XM, Wu YJ, Chang Z, Miao KR, Tang YH, Zhou XY, et al. Co-culture of cord blood CD34(+) cells with human BM mesenchymal stromal cells enhances short-term engraftment of cord blood cells in NOD/SCID mice. *Cytotherapy*. 2007; 9(4):338-47.

Feller N, van der Pol MA, Waaijman T, Weijers GW, Westra G, Ossenkoppele GJ, et al. Immunologic purging of autologous peripheral blood stem cell products based on CD34 and CD133 expression can be effectively and safely applied in half of the acute myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(13):4793-801.

Feng Q, Chai C, Jiang XS, Leong KW, Mao HQ. Expansion of engrafting human hematopoietic stem/progenitor cells in three-dimensional scaffolds with surface-immobilized fibronectin. *J Biomed Mater Res A*. 2006;78(4):781-91.

Fernández-Sánchez V, Pelayo R, Flores-Guzmán P, Flores-Figueroa E, Villanueva-Toledo J, Garrido E, et al. In vitro effects of stromal cells expressing different levels of Jagged-1 and Delta-1 on the growth of primitive and intermediate CD34(+) cell subsets from human cord blood. *Blood Cells Mol Dis*. 2011;47(4):205-13.

Fernández MN, Regidor C, Cabrera R, García-Marco J, Briz M, Forés R, et al. Cord blood transplants: early recovery of neutrophils from co-transplanted sibling haploidentical progenitor cells and lack of engraftment of cultured cord blood cells, as ascertained by analysis of DNA polymorphisms. *Bone Marrow Transplant*. 2001; 28(4):355-63.

Fortunel NO, Hatzfeld JA, Monier MN, Hatzfeld A. Control of hematopoietic stem/progenitor cell fate by transforming growth factor-beta. *Oncol Res*. 2003;13(6-10):445-53.

Frassoni F, Varaldo R, Gualandi F, Bacigalupo A, Sambuceti G, Sacchi N, et al. The intra-bone marrow injection of cord blood cells extends the possibility of transplantation to the majority of patients with malignant hematopoietic diseases. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010;23(2):237-44.

Freund D, Bauer N, Boxberger S, Feldmann S, Steller U, Ehninger G, et al. Polarization of human hematopoietic progenitors during contact with multipotent mesenchymal stromal cells: effects on proliferation and clonogenicity. *Stem Cells Dev.* 2006; 15(6):815-29.

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970; 3(4):393-403.

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation.* 1974; 17(4):331-40.

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976; 4(5):267-74.

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet.* 1987; 20(3):263-72.

Fuchs O, Simakova O, Kliner P, Cmejlova J, Zivny J, Zavadil J, et al. Inhibition of Smad5 in human hematopoietic progenitors blocks erythroid differentiation induced by BMP4. *Blood Cells Mol Dis.* 2002; 28(2):221-33.

Gentry T, Foster S, Winstead L, Deibert E, Fiordalisi M, Balber A. Simultaneous isolation of human BM hematopoietic, endothelial and mesenchymal progenitor cells by flow sorting based on aldehyde dehydrogenase activity: implications for cell therapy. *Cytotherapy.* 2007;9(3):259-74.

Gering M, Patient R. Hedgehog signaling is required for adult blood stem cell formation in zebrafish embryos. *Dev Cell.* 2005; 8(3):389-400.

Giebel B, Corbeil D, Beckmann J, Höhn J, Freund D, Giesen K, et al. Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 2004; 104(8):2332-8.

Glimm H, Tang P, Clark-Lewis I, von Kalle C, Eaves C. Ex vivo treatment of proliferating human cord blood stem cells with stroma-derived factor-1 enhances their ability to engraft NOD/SCID mice. *Blood.* 2002; 99(9):3454-7.

Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med.* 1989;321(17):1174-8.

Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med.* 1997;337(6):373-81.

Gnecchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med.* 2005; 11(4):367-8.

Goldman DC, Bailey AS, Pfaffle DL, Al Masri A, Christian JL, Fleming WH. BMP4 regulates the hematopoietic stem cell niche. *Blood.* 2009;114(20):4393-401.

Gonçalves R, Lobato da Silva C, Cabral JM, Zanjani ED, Almeida-Porada G. A Stro-1(+) human universal stromal feeder layer to expand/maintain human bone marrow hematopoietic stem/progenitor cells in a serum-free culture system. *Exp Hematol.* 2006; 34(10):1353-9.

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):1797-806.

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):1337-45.

Goodell MA. Multipotential stem cells and 'side population' cells. *Cytotherapy*. 2002; 4(6):507-8.

Gordon PR, Leimig T, Babarin-Dorner A, Houston J, Holladay M, Mueller I, et al. Large-scale isolation of CD133+ progenitor cells from G-CSF mobilized peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant*. 2003; 31(1):17-22.

Gothié E, Richard DE, Berra E, Pagès G, Pouyssegur J. Identification of alternative spliced variants of human hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem*. 2000; 275(10):6922-7.

Gothot A, Pyatt R, McMahon J, Rice S, Srour EF. Functional heterogeneity of human CD34(+) cells isolated in subcompartments of the G0 /G1 phase of the cell cycle. *Blood*. 1997; 90(11):4384-93.

GRANT WC, ROOT WS. The relation of O2 in bone marrow blood to post-hemorrhagic erythropoiesis. *Am J Physiol*. 1947; 150(4):618-27.

Grassinger J, Haylock DN, Williams B, Olsen GH, Nilsson SK. Phenotypically identical hemopoietic stem cells isolated from different regions of bone marrow have different biologic potential. *Blood*. 2010; 116(17):3185-96.

Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 358(3):948-53.

Greijer AE, van der Groep P, Kemming D, Shvarts A, Semenza GL, Meijer GA, et al. Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). *J Pathol*. 2005; 206(3):291-304.

Guenechea G, Segovia JC, Albella B, Lamana M, Ramírez M, Regidor C, et al. Delayed engraftment of nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice transplanted with ex vivo-expanded human CD34(+) cord blood cells. *Blood*. 1999; 93(3):1097-105.

Guenechea G, Gan OI, Dorrell C, Dick JE. Distinct classes of human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential. *Nat Immunol*. 2001; 2(1):75-82.

Guiducci S, Manetti M, Romano E, Mazzanti B, Ceccarelli C, Dal Pozzo S et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells from early diffuse systemic sclerosis exhibit a paracrine machinery and stimulate angiogenesis in vitro. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(11):2011-21.

Guitart AV, Hammoud M, Dello Sbarba P, Ivanovic Z, Praloran V. Slow-cycling/quiescence balance of hematopoietic stem cells is related to physiological gradient of oxygen. *Exp Hematol*. 2010; 38(10): 847-51.

Guitart AV, Debeissat C, Hermitte F, Villacreses A, Ivanovic Z, Boeuf H, et al. Very low oxygen concentration (0.1%) reveals two FDCP-Mix cell subpopulations that differ by their cell cycling, differentiation and p27KIP1 expression. *Cell Death Differ*. 2011; 18(1):174-82.

Gürman G, Kahveci G, Akan H I, Ilhan O, Koç H, Bektaş M, et al. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation as a second transplant for severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant*. 1995; 15(3):485-6.

Gyurkocza B, Rezvani A, Storb RF. Allogeneic hematopoietic cell transplantation: the state of the art. *Expert Rev Hematol*. 2010;3(3):285-99.

Harms KM, Li L, Cunningham LA. Murine neural stem/progenitor cells protect neurons against ischemia by HIF-1alpha-regulated VEGF signaling. *PLoS One*. 2010;5(3):e9767.

Harrison JS, Rameshwar P, Chang V, Bandari P. Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. *Blood*. 2002; 99(1):394.

Hassan HT, Zander A. Stem cell factor as a survival and growth factor in human normal and malignant hematopoiesis. *Acta Haematol*. 1996; 95(3-4):257-62.

Hauser SP, Kajkenova O, Lipschitz DA. The pivotal role of interleukin 6 in formation and function of hematopoietically active murine long-term bone marrow cultures. *Stem Cells*. 1997; 15(2):125-32.

Hayashi N, Takahashi K, Abe Y, Kashiwakura I. Placental/umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell-like stromal cells support hematopoietic recovery of X-irradiated human CD34⁺ cells. *Life Sci*. 2009; 84(17-18):598-605.

Hayashida K, Kitamura T, Gorman DM, Arai K, Yokota T, Miyajima A. Molecular cloning of a second subunit of the receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): reconstitution of a high-affinity GM-CSF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87(24):9655-9.

Hemphill JC 3rd, Smith WS, Sonne DC, Morabito D, Manley GT. Relationship between brain tissue oxygen tension and CT perfusion: feasibility and initial results. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2005; 26(5):1095-100.

Hermitte F. Role des variations des concentrations d'oxygene sur la proliferation, le cycle cellulaire et la fonctionnalite des cellules souches hematopoietiques. In *Sciences Biologiques et Medicales* (2005) - These n°1254 (Bordeaux, Victor Segalen Bordeaux 2).

Hermitte F, Brunet de la Grange P, Belloc F, Praloran V, Ivanovic Z. Very low O₂ concentration (0.1%) favors G0 return of dividing CD34⁺ cells. *Stem Cells* 2006 ; 24(1):65-73.

Herrera C, Sánchez J, Torres A, Bellido C, Rueda A, Alvarez MA. Early-acting cytokine-driven ex vivo expansion of mobilized peripheral blood CD34⁺ cells generates post-mitotic offspring with preserved engraftment ability in non-obese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Br J Haematol*. 2001; 114(4):920-30

Hess DA, Wirthlin L, Craft TP, Herrbrich PE, Hohm SA, Lahey R, et al. Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood*. 2006; 107(5):2162-9.

Hess DA, Craft TP, Wirthlin L, Hohm S, Zhou P, Eades WC, et al. Widespread nonhematopoietic tissue distribution by transplanted human progenitor cells with high aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells*. 2008; 26(3):611-20.

Ho AD, Wagner W. The beauty of asymmetry: asymmetric divisions and self-renewal in the haematopoietic system. *Curr Opin Hematol*. 2007; 14(4):330-6.

Hodgson GS, Bradley TR. Properties of haematopoietic stem cells surviving 5-fluorouracil treatment: evidence for a pre-CFU-S cell? *Nature*. 1979; 281(5730):381-2.

Hogan CJ, Shpall EJ, McNiece I, Keller G. Multilineage engraftment in NOD/LtSz-scid/scid mice from mobilized human CD34⁺ peripheral blood progenitor cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 1997; 3(5):236-46.

Holyoake TL, Alcorn MJ, Richmond L, Farrell E, Pearson C, Green R, et al. CD34 positive PBPC expanded ex vivo may not provide durable engraftment following myeloablative chemoradiotherapy regimens. *Bone Marrow Transplant*. 1997; 19(11):1095-101.

Holyoake T, Jiang X, Eaves C, Eaves A. Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1999; 94(6):2056-64.

Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, Pfister SM, Handgretinger R, Kerst G, et al. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol*. 2010; 11:11.

Hosokawa K, Arai F, Yoshihara H, Iwasaki H, Nakamura Y, Gomei Y, et al. Knockdown of N-cadherin suppresses the long-term engraftment of hematopoietic stem cells. *Blood*. 2010 29; 116(4):554-63.

Hu X, Yu SP, Fraser JL, Lu Z, Ogle ME, Wang JA, et al. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008; 135(4):799-808.

Huang GP, Pan ZJ, Jia BB, Zheng Q, Xie CG, Gu JH, et al. Ex vivo expansion and transplantation of hematopoietic stem/progenitor cells supported by mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *Cell Transplant*. 2007; 16(6):579-85.

Hübel K, Fresen MM, Apperley JF, Basak GW, Douglas KW, Gabriel IH, et al. European data on stem cell mobilization with plerixafor in non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma patients. A subgroup analysis of the European Consortium of stem cell mobilization. *Bone Marrow Transplant*. 2011 doi: 10.1038/bmt.2011.216

Hung SC, Pochampally RR, Chen SC, Hsu SC, Prockop DJ. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells*. 2007a; 25(9):2363-70.

Hung SC, Pochampally RR, Hsu SC, Sanchez C, Chen SC, Spees J, et al. Short-term exposure of multipotent stromal cells to low oxygen increases their expression of CX3CR1 and CXCR4 and their engraftment in vivo. *PLoS One*. 2007b; 2(5):e416.

Hussain MM, Mahley RW, Boyles JK, Lindquist PA, Brecht WJ, Innerarity TL. Chylomicron metabolism. Chylomicron uptake by bone marrow in different animal species. *J Biol Chem*. 1989; 264(30):17931-8.

Hussein MH, Daoud GA, Kakita H, Kato S, Goto T, Kamei M, et al. High cerebrospinal fluid antioxidants and interleukin 8 are protective of hypoxic brain damage in newborns. *Free Radic Res*. 2010; 44(4):422-9.

Hwang JH, Shim SS, Seok OS, Lee HY, Woo SK, Kim BH, et al. Comparison of cytokine expression in mesenchymal stem cells from human placenta, cord blood, and bone marrow. *J Korean Med Sci*. 2009; 24(4):547-54.

Ichikawa M, Goyama S, Asai T, Kawazu M, Nakagawa M, Takeshita M, et al. AML1/Runx1 negatively regulates quiescent hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *J Immunol*. 2008; 180(7):4402-8.

Ikehara S. Intra-bone marrow-bone marrow transplantation: a new strategy for treatment of stem cell disorders. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1051:626-34.

Ikuta K, Weissman IL. Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(4):1502-6.

In 't Anker PS, Noort WA, Kruisselbrink AB, Scherjon SA, Beekhuizen W, Willemze R, et al. Nonexpanded primary lung and bone marrow-derived mesenchymal cells promote the engraftment of umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol*. 2003; 31(10):881-9.

Issaad C, Croisille L, Katz A, Vainchenker W, Coulombel L. A murine stromal cell line allows the proliferation of very primitive human CD34⁺⁺/CD38⁻ progenitor cells in long-term cultures and semisolid assays. *Blood*. 1993; 81(11):2916-24.

Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, et al. NOD/SCID/gamma (c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*. 2002; 100(9):3175-82.

Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I, et al. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2004; 431(7011):997-1002.

Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, et al. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med*. 2006; 12(4): 446-51.

Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR. A stem cell molecular signature. *Science*. 2002; 298(5593):601-4.

Ivanovic' Z, Dello Sbarba P, Trimoreau F, Faucher JL, Praloran V. Primitive human HPCs are better maintained and expanded in vitro at 1 percent oxygen than at 20 percent. *Transfusion* 2000; 40(12):1482–1488.

Ivanovic Z, Belloc F, Faucher JL, Cipolleschi MG, Praloran V, Dello Sbarba P. Hypoxia maintains and interleukin-3 reduces the pre-colony-forming cell potential of dividing CD34(+) murine bone marrow cells. *Exp Hematol*. 2002; 30(1): 67-73.

Ivanovic Z. Interleukin-3 and ex vivo maintenance of hematopoietic stem cells: facts and controversies. *Eur Cytokine Netw* 2004a; 15(1):6-13.

Ivanovic Z, Hermitte F, Brunet de la Grange P, Dazey B, Belloc F, Lacombe F, et al. Simultaneous maintenance of human cord blood SCID-repopulating cells and expansion of committed progenitors at low O₂ concentration (3%). *Stem Cells*. 2004b; 22(5):716-24.

Ivanovic Z, Duchez P, Morgan DA, Hermitte F, Lafarge X, Chevaleyre J, et al. Whole-blood leuko-depletion filters as a source of CD 34+ progenitors potentially usable in cell therapy. *Transfusion*. 2006; 46(1):118-25.

Ivanovic Z, Boiron JM. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells: concept and clinical benefit. *Transfus Clin Biol* 2009a; 16(5-6):489-500.

Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *J. Cell. Physiol* 2009b; 219(2): 271–275.

Ivanovic Z. Hematopoietic stem cells in research and clinical applications: The "CD34 issue". *World J Stem Cells*. 2010; 2(2):18-23.

Ivanovic Z, Duchez P, Chevaleyre J, Vlaski M, Lafarge X, Dazey B, et al. Clinical-scale cultures of cord blood CD34(+) cells to amplify committed progenitors and maintain stem cell activity. *Cell Transplant*. 2011; 20(9):1453-63.

Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, et al. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev*. 1998; 12(2):149-62.

Jang YK, Jung DH, Jung MH, Kim DH, Yoo KH, Sung KW, et al. Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol*. 2006; 85(4):212-25.

Jang YY, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*. 2007; 110(8):3056-63

Jaroscak J, Goltry K, Smith A, Waters-Pick B, Martin PL, Driscoll TA, et al. Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo-expanded UCB cells: results of a phase 1 trial using the AastromReplicell System. *Blood*. 2003; 101(12):5061-7.

Ji JF, He BP, Dheen ST, Tay SS. Expression of chemokine receptors CXCR4, CCR2, CCR5 and CX3CR1 in neural progenitor cells isolated from the subventricular zone of the adult rat brain. *Neurosci Lett*. 2004; 355(3):236-40.

Ji L, Liu YX, Yang C, Yue W, Shi SS, Bai CX, et al. Self-renewal and pluripotency is maintained in human embryonic stem cells by co-culture with human fetal liver stromal cells expressing hypoxia inducible factor 1alpha. *J Cell Physiol*. 2009; 221(1):54-66.

Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1996a;271(30): 17771-8.

Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol* 1996b; 271(4 Pt 1):C1172-80.

Jiang Y, Prosper F, Verfaillie CM. Opposing effects of engagement of integrins and stimulation of cytokine receptors on cell cycle progression of normal human hematopoietic progenitors. *Blood*. 2000; 95(3):846-54.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41-9.

Jin Y, Kato T, Furu M, Nasu A, Kajita Y, Mitsui H, et al. Mesenchymal stem cells cultured under hypoxia escape from senescence via down-regulation of p16 and extracellular signal regulated kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391(3):1471-6.

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):542-50.

Jing D, Wobus M, Poitz DM, Bornhäuser M, Ehninger G, Ordemann R. Oxygen tension plays a critical role in the hematopoietic microenvironment in vitro. *Haematologica*. 2012; 97 (3):331-9.

Johnson PC, Vandegriff K, Tsai AG, Intaglietta M. Effect of acute hypoxia on microcirculatory and tissue oxygen levels in rat cremaster muscle. *J Appl Physiol*. 2005; 98(4):1177-84.

Jones RJ, Collector MI, Barber JP, Vala MS, Fackler MJ, May WS, et al. Characterization of mouse lymphohematopoietic stem cells lacking spleen colony-forming activity. *Blood*. 1996; 88(2):487-91.

Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum*. 2002; 46(12):3349-60.

Jones E, English A, Churchman SM, Kouroupis D, Boxall SA, Kinsey S, et al. Large-scale extraction and characterization of CD271+ multipotential stromal cells from trabecular bone in health and osteoarthritis: implications for bone regeneration strategies based on uncultured or minimally cultured multipotential stromal cells. *Arthritis Rheum*. 2010;62(7):1944-54.

Jovčić G, Bugarski D, Petakov M, Krstić A, Vlaski M, Stojanović N, et al. In vivo effects of interleukin-17 on haematopoietic cells and cytokine release in normal mice. *Cell Prolif*. 2004; 37(6):401-12.

Jung Y, Wang J, Havens A, Sun Y, Wang J, Jin T, Taichman RS. Cell-to-cell contact is critical for the survival of hematopoietic progenitor cells on osteoblasts. *Cytokine*. 2005; 32(3-4):155-62.

Jung Y, Song J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Z, Williams B, et al. Hematopoietic stem cells regulate mesenchymal stromal cell induction into osteoblasts thereby participating in the formation of the stem cell niche. *Stem Cells*. 2008; 26(8):2042-51.

Jungermann K, Kietzmann T. Role of oxygen in the zonation of carbohydrate metabolism and gene expression in liver. *Kidney Int*. 1997; 51(2):402-12.

Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, et al. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO J*. 1998; 17(22):6573-86.

Kamel-Reid S, Dick JE. Engraftment of immune-deficient mice with human hematopoietic stem cells. *Science*. 1988; 242(4886):1706-9.

Kadereit S, Deeds LS, Haynesworth SE, Koc ON, Kozik MM, Szekely E, et al. Expansion of LTC-ICs and maintenance of p21 and BCL-2 expression in cord blood CD34(+)/CD38(-) early progenitors cultured over human MSCs as a feeder layer. *Stem Cells*. 2002; 20(6):573-82.

Kaushansky K. Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1044:139-41.

Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang SK. IL-17 cytokine family. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 114(6):1265-73; quiz 1274.

Kawano Y, Kobune M, Chiba H, Nakamura K, Takimoto R, Takada K, et al. Ex vivo expansion of G-CSF-mobilized peripheral blood CD133+ progenitor cells on coculture with human stromal cells. *Exp Hematol*. 2006; 34(2):150-8.

Kelly S, Bliss TM, Shah AK, Sun GH, Ma M, Foo WC, et al. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(32):11839-44.

Khoo ML, Shen B, Tao H, Ma DD. Long-term serial passage and neuronal differentiation capability of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008; 17(5):883-96.

Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005; 121(7):1109-21.

Kiel MJ, Morrison SJ. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8(4):290-301.

Kilroy GE, Foster SJ, Wu X, Ruiz J, Sherwood S, Heifetz A, et al. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J Cell Physiol*. 2007; 212(3):702-9.

Kim SJ, Letterio J. Transforming growth factor-beta signaling in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia*. 2003;17(9):1731-7.

Kim DH, Yoo KH, Choi KS, Choi J, Choi SY, Yang SE, et al. Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell. *Cytokine*. 2005; 31(2):119-26.

Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*. 2006; 3(3):177-85.

Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*. 2004; 94(5):678-85.

Kirito K, Fox N, Komatsu N, Kaushansky K. Thrombopoietin enhances expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in primitive hematopoietic cells through induction of HIF-1alpha. *Blood*. 2005; 105(11):4258-63.

Kirito K, Hu Y, Komatsu N. HIF-1 prevents the overproduction of mitochondrial ROS after cytokine stimulation through induction of PDK-1. *Cell Cycle* 2009; 8(17):2844-9.

Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*. 1995; 86(4):1243-54.

Kissa K, Herbomel P. Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. *Nature* 2010; 464(7285):112-5.

Knudtzon S. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* 1974; 43(3):357-61.

Ko KH, Nordon R, O'Brien TA, Symonds G, Dolnikov A. Ex vivo expansion of haematopoietic stem cells to improve engraftment in stem cell transplantation. *Methods Mol Biol*. 2011; 761:249-60.

Kobari L, Pflumio F, Giarratana M, Li X, Titeux M, Izac B, et al. In vitro and in vivo evidence for the long-term multilineage (myeloid, B, NK, and T) reconstitution capacity of ex vivo expanded human CD34(+) cord blood cells. *Exp Hematol*. 2000; 28(12):1470-80.

Kobari L, Giarratana MC, Pflumio F, Izac B, Coulombel L, Douay L. CD133+ cell selection is an alternative to CD34+ cell selection for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *J Hematother Stem Cell Res*. 2001; 10(2):273-81.

Kobune M, Ito Y, Kawano Y, Sasaki K, Uchida H, Nakamura K, et al. Indian hedgehog gene transfer augments hematopoietic support of human stromal cells including NOD/SCID-beta2m^{-/-} repopulating cells. *Blood*. 2004; 104(4):1002-9.

Koç ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2000; 18(2):307-16.

Kofoed H, Sjøtoft E, Siemssen SO, Olesen HP. Bone marrow circulation after osteotomy. Blood flow, pO₂, pCO₂, and pressure studied in dogs. *Acta Orthop Scand*. 1985;56(5): 400-3.

Kögler G, Nürnberger W, Fischer J, Niehues T, Somville T, Göbel U, et al. Simultaneous cord blood transplantation of ex vivo expanded together with non-expanded cells for high risk leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 1999; 24(4):397-403.

Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Müschen M, Feldhahn N, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med*. 2004;200(2):123-35.

Koller MR, Bender JG, Miller WM, Papoutsakis ET. Reduced oxygen tension increases hematopoiesis in long-term culture of human stem and progenitor cells from cord blood and bone marrow. *Exp Hematol*. 1992a; 20(2):264–270.

Koller MR, Bender JG, Papoutsakis ET, Miller WM. Effects of synergistic cytokine combinations, low oxygen, and irradiated stroma on the expansion of human cord blood progenitors. *Blood* 1992b; 80(2):403–411.

Koller MR, Manchel I, Maher RJ, Goltry KL, Armstrong RD, Smith AK. Clinical-scale human umbilical cord blood cell expansion in a novel automated perfusion culture system. *Bone Marrow Transplant*. 1998; 21(7):653-63.

Kollet O, Dar A, Shviti S, Kalinkovich A, Lapid K, Sztainberg Y, et al. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med*. 2006; 12(6):657-64.

Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, Rafii S. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda)*. 2005;20:349-56.

Kovacević-Filipović M, Petakov M, Hermitte F, Debeissat C, Krstić A, Jovčić G, et al. Interleukin-6 (IL-6) and low O₂ concentration (1%) synergize to improve the maintenance of hematopoietic stem cells (pre-CFC). *J Cell Physiol*. 2007; 212(1):68-75.

Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 1996; 87(1):1-13.

Krstić A, Vlaski M, Hammoud M, Chevalere J, Duchez P, Jovčić G, et al. Low O₂ concentrations enhance the positive effect of IL-17 on the maintenance of erythroid progenitors during co-culture of CD34+ and mesenchymal stem cells. *Eur Cytokine Netw*. 2009; 20(1):10-6.

Kubo M, Li TS, Suzuki R, Shirasawa B, Morikage N, Ohshima M, et al. Hypoxic preconditioning increases survival and angiogenic potency of peripheral blood mononuclear cells via oxidative stress resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294(2):H590-5.

Kubota Y, Takubo K, Suda T. Bone marrow long label-retaining cells reside in the sinusoidal hypoxic niche. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 366(2):335-9.

Kuçi S, Wessels JT, Bühring HJ, Schilbach K, Schumm M, Seitz G, et al. Identification of a novel class of human adherent CD34- stem cells that give rise to SCID-repopulating cells. *Blood*. 2003; 101(3):869-76.

Kuroiwa T, Kakishita E, Hamano T, Kataoka Y, Seto Y, Iwata N, et al. Hepatocyte growth factor ameliorates acute graft-versus-host disease and promotes hematopoietic function. *J Clin Invest*. 2001; 107(11):1365-73.

Kurtzberg J, Prasad VK, Carter SL, Wagner JE, Baxter-Lowe LA, Wall D, et al. Results of the Cord Blood Transplantation Study (COBLT): clinical outcomes of unrelated donor umbilical cord blood transplantation in pediatric patients with hematologic malignancies. *Blood*. 2008;112(10):4318-27.

Laharrague P Patrick Laharrague, Corberand JX, Cousin B, Penicaud L, Casteilla L. Adipocytes médullaires et hématopoïèse. *Hématologie*. 1999; Volume 5, Numéro 4, 255-63.

Lapidot T, Pflumio F, Doedens M, Murdoch B, Williams DE, Dick JE. Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science*. 1992; 255(5048):1137-41.

Larsson J, Blank U, Helgadottir H, Björnsson JM, Ehinger M, Goumans MJ, et al. TGF-beta signaling-deficient hematopoietic stem cells have normal self-renewal and regenerative ability in vivo despite increased proliferative capacity in vitro. *Blood*. 2003;102(9):3129-35.

Lataillade JJ, Clay D, Dupuy C, Rigal S, Jasmin C, Bourin P, et al. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood*. 2000;95(3):756-68.

Lataillade JJ, Pierre-Louis O, Hasselbalch HC, Uzan G, Jasmin C, Martyré MC, et al. Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence. *Blood*. 2008; 112(8):3026-35.

Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, Wagner JE, Zhang MJ, Champlin RE, et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med*. 2004; 351(22):2265-75.

Laywell ED, Steindler DA, Silver DJ. Astrocytic stem cells in the adult brain. *Neurosurg Clin N Am*. 2007; 18(1):21-30, viii.

Lang P, Bader P, Schumm M, Feuchtinger T, Einsele H, Führer M, et al. Transplantation of a combination of CD133+ and CD34+ selected progenitor cells from alternative donors. *Br J Haematol*. 2004; 124(1):72-9.

Le Berre C. Haematopoietic stem cell specimens. *Transfus Clin Biol*. 2005; 12(2):160-2.

Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2003; 31(10):890-6.

Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004; 363(9419):1439-41.

Lee EY, Xia Y, Kim WS, Kim MH, Kim TH, Kim KJ, et al. Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair Regen*. 2009; 17(4):540-7.

Lee SH, Lee YJ, Song CH, Ahn YK, Han HJ. Role of FAK phosphorylation in hypoxia-induced hMSCS migration: involvement of VEGF as well as MAPKS and eNOS pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010; 298(4):C847-56.

Lekli I, Gurusamy N, Ray D, Tosaki A, Das DK. Redox regulation of stem cell mobilization. *Can J Physiol Pharmacol*. 2009; 87(12):989-95.

Lennon DP, Edmison JM, Caplan AI. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *J Cell Physiol*. 2001; 187(3):345-55.

Lerner C, Harrison DE. 5-Fluorouracil spares hemopoietic stem cells responsible for long-term repopulation. *Exp Hematol*. 1990; 18(2):114-8.

Levac K, Karanu F, Bhatia M. Identification of growth factor conditions that reduce ex vivo cord blood progenitor expansion but do not alter human repopulating cell function in vivo. *Haematologica*. 2005; 90(2):166-72.

Lévesque JP, Winkler IG, Hendy J, Williams B, Helwani F, Barbier V, et al. Hematopoietic progenitor cell mobilization results in hypoxia with increased hypoxia-inducible transcription factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor A in bone marrow. *Stem Cells*. 2007; 25(8):1954-65.

Lévesque JP, Winkler IG. Hierarchy of immature hematopoietic cells related to blood flow and niche. *Curr Opin Hematol*. 2011; 18(4):220-5.

Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol*. 2003a; 170(6):3369-76.

Li W, Johnson SA, Shelley WC, Ferkowicz M, Morrison P, Li Y, et al. Primary endothelial cells isolated from the yolk sac and para-aortic splanchnopleura support the expansion of adult marrow stem cells in vitro. *Blood*. 2003b; 102(13):4345-53.

Li W, Johnson SA, Shelley WC, Yoder MC. Hematopoietic stem cell repopulating ability can be maintained in vitro by some primary endothelial cells. *Exp Hematol*. 2004; 32(12):1226-37.

Li N, Feugier P, Serrurier B, Latger-Cannard V, Lesesve JF, Stoltz JF, et al A. Human mesenchymal stem cells improve ex vivo expansion of adult human CD34+ peripheral blood progenitor cells and decrease their allostimulatory capacity. *Exp Hematol*. 2007; 35(3): 507-15.

Li L, Clevers H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science*. 2010a; 327(5965):542-5.

Li Z, Wei H, Deng L, Cong X, Chen X. Expression and secretion of interleukin-1 β , tumour necrosis factor- α and interleukin-10 by hypoxia- and serum-deprivation-stimulated mesenchymal stem cells. *FEBS J*. 2010b; 277:3688-98.

Li P, Huang J, Tian HJ, Huang QY, Jiang CH, Gao YQ. Regulation of bone marrow hematopoietic stem cell is involved in high-altitude erythrocytosis. *Exp Hematol*. 2011; 39(1):37-46.

Lin KK, Goodell MA. Purification of hematopoietic stem cells using the side population. *Methods Enzymol*. 2006; 420:255-64.

Lisovsky M, Braun SE, Ge Y, Takahira H, Lu L, Savchenko VG, Lyman SD, Broxmeyer HE. Flt3-ligand production by human bone marrow stromal cells. *Leukemia*. 1996; 10(6):1012-8.

Liu CH, Hwang SM. Cytokine interactions in mesenchymal stem cells from cord blood. *Cytokine*. 2005; 32(6):270-9.

Liu J, Cao L, Chen J, Song S, Lee IH, Quijano C, et al. Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. *Nature*. 2009a; 459(7245):387-92.

Liu K, Wong EW, Schutzer SE, Connell ND, Upadhyay A, Bryan M, et al. Non-canonical effects of anthrax toxins on haematopoiesis: implications for vaccine development. *J Cell Mol Med*. 2009b; 13(8B):1907-19.

Liu AM, Qu WW, Liu X, Qu CK. Chromosomal instability in in vitro cultured mouse hematopoietic cells associated with oxidative stress. *Am J Blood Res*. 2012a; 2(1):71-6.

Liu L, Papa EF, Dooner MS, Machan JT, Johnson KW, Goldberg LR, et al. Homing and long-term engraftment of long- and short-term renewal hematopoietic stem cells. *PLoS One*. 2012b; 7(2):e31300.

Locatelli F, Rocha V, Chastang C, Arcese W, Michel G, Abecasis M, et al. Factors associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia. Eurocord-Cord Blood Transplant Group. *Blood*. 1999; 93(11):3662-71.

Lombard DB, Chua KF, Mostoslavsky R, Franco S, Gostissa M, Alt FW. DNA repair, genome stability, and aging. *Cell*. 2005; 120(4):497-512.

Long GD, Laughlin M, Madan B, Kurtzberg J, Gasparetto C, Morris A, et al. Unrelated umbilical cord blood transplantation in adult patients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2003; 9(12):772-80.

Luens KM, Travis MA, Chen BP, Hill BL, Scollay R, Murray LJ. Thrombopoietin, kit ligand, and flk2/flt3 ligand together induce increased numbers of primitive hematopoietic progenitors from human CD34⁺Thy-1⁺Lin⁻ cells with preserved ability to engraft SCID-hu bone. *Blood*. 1998; 91(4):1206-15.

Luis TC, Staal FJ. WNT proteins: environmental factors regulating HSC fate in the niche. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1176:70-6.

Lyman SD, Jacobsen SE. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood*. 1998; 91(4):1101-34.

Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, et al. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(16):9448-53.

MacMillan ML, Weisdorf DJ, Brunstein CG, Cao Q, DeFor TE, Verneris M et al. Acute graft-versus-host disease after unrelated donor umbilical cord blood transplantation: analysis of risk factors. *Blood*. 2009; 113(11):2410-5.

Madkaikar M, Ghosh K, Gupta M, Swaminathan S, Mohanty D. Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells using different combinations of cytokines and stromal cells. *Acta Haematol*. 2007; 118(3):153-9.

Magin AS, Körfer NR, Partenheimer H, Lange C, Zander A, Noll T. Primary cells as feeder cells for coculture expansion of human hematopoietic stem cells from umbilical cord blood--a comparative study. *Stem Cells Dev*. 2009; 18(1): 173-86.

Magnusson M, Brun AC, Lawrence HJ, Karlsson S. Hoxa9/hoxb3/hoxb4 compound null mice display severe hematopoietic defects. *Exp Hematol*. 2007a; 35(9):1421-8.

Magnusson M, Brun AC, Miyake N, Larsson J, Ehinger M, Bjornsson JM, et al. HOXA10 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and erythroid/megakaryocyte development. *Blood*. 2007b; 109(9):3687-96.

Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrzkowski Z, Kowalska MA, et al. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood*. 2001; 97(10):3075-85.

Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol*. 1998; 176(1):57-66.

Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term

hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res.* 2000; 9(6):841-8.

Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci.* 2003; 10(2):228-41.

Makino Y, Uenishi R, Okamoto K, Ise T, Hosono O, Tanaka H, Kanopka A, et al. Transcriptional up-regulation of inhibitory PAS domain protein gene expression by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1): a negative feedback regulatory circuit in HIF-1-mediated signaling in hypoxic cells. *J Biol Chem.* 2007; 282(19):14073-82.

Malladi P, Xu Y, Chiou M, Giaccia AJ, Longaker MT. Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006; 290(4):C1139-46.

Malladi P, Xu Y, Chiou M, Giaccia AJ, Longaker MT. Hypoxia inducible factor-1 α deficiency affects chondrogenesis of adipose-derived adult stromal cells. *Tissue Eng.* 2007; 13(6):1159-71.

Mancini SJ, Mantei N, Dumortier A, Suter U, MacDonald HR, Radtke F. Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood.* 2005;105(6):2340-2.

Martin-Rendon E, Hale SJ, Ryan D, Baban D, Forde SP, Roubelakis M, et al. Transcriptional profiling of human cord blood CD133+ and cultured bone marrow mesenchymal stem cells in response to hypoxia. *Stem Cells.* 2007; 25(4):1003-12.

Matsumoto A, Matsumoto S, Sowers AL, Koscielniak JW, Trigg NJ, Kuppusamy P, et al. Absolute oxygen tension (pO₂) in murine fatty and muscle tissue as determined by EPR. *Magn Reson Med.* 2005; 54(6):1530-5.

Matsunaga T, Kato T, Miyazaki H, Ogawa M. Thrombopoietin promotes the survival of murine hematopoietic long-term reconstituting cells: comparison with the effects of FLT3/FLK-2 ligand and interleukin-6. *Blood.* 1998; 92(2):452-6.

Mauch P, Constine L, Greenberger J, Knospe W, Sullivan J, Liesveld JL, et al. Hematopoietic stem cell compartment: acute and late effects of radiation therapy and chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995; 31(5):1319-39.

Mayani H. A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance. *Arch Med Res.* 2003; 34(1):3-15.

Mazurier F, Doedens M, Gan OI, Dick JE. Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. *Nat Med.* 2003;9(7):959-63.

McCoy KD, Ahmed N, Tan AS, Berridge MV. The hemopoietic growth factor, interleukin-3, promotes glucose transport by increasing the specific activity and maintaining the affinity for glucose of plasma membrane glucose transporters. *J Biol Chem.* 1997; 272(28):17276-82.

McKinley BA, Butler BD. Comparison of skeletal muscle PO₂, PCO₂, and pH with gastric tonometric P(CO₂) and pH in hemorrhagic shock. *Crit Care Med.* 1999; 27(9):1869-77.

McNiece I, Jones R, Bearman SI, Cagnoni P, Nieto Y, Franklin W, et al. Ex vivo expanded peripheral blood progenitor cells provide rapid neutrophil recovery after high-dose chemotherapy in patients with breast cancer. *Blood.* 2000; 96(9):3001-7.

McNiece I, Harrington J, Turney J, Kellner J, Shpall EJ. Ex vivo expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells. *Cytotherapy.* 2004; 6(4):311-7.

Méndez-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):829-34.

Metcalf D. Hemopoietic colonies: in vitro cloning of normal and leukemic cells. *Recent Results Cancer Res*. 1977; (61): Title page, 1-227.

Metcalf D. Hematopoietic cytokines. *Blood*. 2008 Jan 15; 111(2):485-91.

Mik EG, van Leeuwen TG, Raat NJ, Ince C. Quantitative determination of localized tissue oxygen concentration in vivo by two-photon excitation phosphorescence lifetime measurements. *J Appl Physiol*. 2004; 97(5):1962-9.

Milenković P, Biljanović-Paunović L, Lukic M, Pavlović-Kentera V. Erythroid-committed progenitors and spleen colony-forming cells in adult thymus-deprived mice. *Cell Tissue Kinet*. 1983; 16(5):429-40.

Milhem M, Mahmud N, Lavelle D, Araki H, DeSimone J, Sauntharajah Y, et al. Modification of hematopoietic stem cell fate by 5aza 2'deoxyctidine and trichostatin A. *Blood*. 2004; 103(11):4102-10.

Milner LA, Kopan R, Martin DI, Bernstein ID. A human homologue of the *Drosophila* developmental gene, Notch, is expressed in CD34⁺ hematopoietic precursors. *Blood*. 1994; 83(8):2057-62.

Milpied JN, Marit Gerald, Dazey B, Boiron JM, Ivanovic Z, Foucaud Carine, et al. Ex vivo Expanded peripheral Blood stem Cells (EVEC) Compared with Un Manipulated Peripheral Blood Stem Cells (PBSC). Autologous Transplantation for Multiple Myeloma: a pair match analysis. ASH Annual Meeting Abstracts, volume 114, issue 22, p 207. 51th ASH annual Meeting. New Orleans. December 2009.

Milpied N, Dazey B, Ivanovic Z, Duchez P, Vigourous S, Tabrizi R, et al. Rapid and Sustained Dngraftment of a Single Allogeneic ex-vivo Expanded Cord Blood Unit (CBU) After Reduced Intensity Conditioning in Adults. Preliminary results of a Prospective Trial. ASH Congress, San Diego, USA. December 2011.

Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*. 1997; 90(12):5013-21.

Mishima S, Nagai A, Abdullah S, Matsuda C, Taketani T, Kumakura S, et al. Effective ex vivo expansion of hematopoietic stem cells using osteoblast-differentiated mesenchymal stem cells is CXCL12 dependent. *Eur J Haematol*. 2010; 84(6):538-46.

Mitchell JA, Yochim JM. Intrauterine oxygen tension during the estrous cycle in the rat: its relation to uterine respiration and vascular activity. *Endocrinology*. 1968; 83(4):701-5.

Miyake K, Weissman IL, Greenberger JS, Kincade PW. Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis. *J Exp Med*. 1991; 173(3):599-607.

Miyamoto K, Araki KY, Naka K, Arai F, Takubo K, Yamazaki S, et al. Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell*. 2007; 1(1):101-12.

Miyoshi H, Murao M, Ohshima N, Tun T. Three-dimensional culture of mouse bone marrow cells within a porous polymer scaffold: effects of oxygen concentration and stromal layer on expansion of haematopoietic progenitor cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011; 5(2):112-8.

Mizokami T, Hisha H, Okazaki S, Takaki T, Wang XL, Song CY, et al. Preferential expansion of human umbilical cord blood-derived CD34-positive cells on major histocompatibility complex-matched amnion-derived mesenchymal stem cells. *Haematologica*. 2009; 94(5):618-28.

Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*. 2010; 7(2):150-61.

Moore MA. Cytokine and chemokine networks influencing stem cell proliferation, differentiation, and marrow homing. *J Cell Biochem. Suppl.* 2002; 38:29-38.

Moore MA. Converging pathways in leukemogenesis and stem cell self-renewal. *Exp Hematol.* 2005;33(7):719-37.

Moreau I, Duvert V, Caux C, Galmiche MC, Charbord P, Banchereau J, et al. Myofibroblastic stromal cells isolated from human bone marrow induce the proliferation of both early myeloid and B-lymphoid cells. *Blood.* 1993; 82(8):2396-405.

Moreaux J, Legouffe E, Jourdan E, Quittet P, Rème T, Lugagne C, et al. BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone. *Blood.* 2004;103(8):3148-57

Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity.* 1994; 1(8):661-73.

Morrison SJ, Prowse KR, Ho P, Weissman IL. Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential. *Immunity.* 1996; 5(3):207-16.

Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE, Weissman IL. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development.* 1997; 124(10):1929-39.

Morrison SJ, Csete M, Groves AK, Melega W, Wold B, Anderson DJ. Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells. *J Neurosci.* 2000; 20(19):7370-6.

Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, Wilson DB. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature.* 1988; 335(6187): 256-9.

Mostafa SS, Miller WM, Papoutsakis ET. Oxygen tension influences the differentiation, maturation and apoptosis of human megakaryocytes. *Br J Haematol.* 2000; 111(3):879-89.

Mourcin F, Grenier N, Mayol JF, Lataillade JJ, Sotto JJ, Hérodin F, et al. Mesenchymal stem cells support expansion of in vitro irradiated CD34(+) cells in the presence of SCF, FLT3 ligand, TPO and IL3: potential application to autologous cell therapy in accidentally irradiated victims. *Radiat Res.* 2005; 164(1):1-9.

Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, et al. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood.* 2006; 107(5):1878-87.

Muir C, Chung LW, Carson DD, Farach-Carson MC. Hypoxia increases VEGF-A production by prostate cancer and bone marrow stromal cells and initiates paracrine activation of bone marrow endothelial cells. *Clin Exp Metastasis.* 2006; 23(1):75-86.

Müller J, Benz K, Ahlers M, Gaissmaier C, Mollenhauer J. Hypoxic conditions during expansion culture prime human mesenchymal stromal precursor cells for chondrogenic differentiation in three-dimensional cultures. *Cell Transplant.* 2011;8.

Murphy MJ Jr, Lord BI. Hematopoietic stem cell regulation. I. Acute effects of hypoxic-hypoxia on CFU kinetics. *Blood.* 1973; 42(1): 81-7.

Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2003; 48(12):3464-74.

Mylotte LA, Duffy AM, Murphy M, O'Brien T, Samali A, Barry F, et al. Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment. *Stem Cells.* 2008; 26(5):1325-36.

Nagasawa T, Omatsu Y, Sugiyama T. Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. *Trends Immunol.* 2011; 32(7):315-20.

Nakahata T. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells. *Int J Hematol.* 2001; 73(1):6-13.

Nakamura Y, Yahata T, Muguruma Y, Uno T, Sato T, Matsuzawa H, et al. Angiopoietin-1 supports induction of hematopoietic activity in human CD34- bone marrow cells. *Exp Hematol*. 2007; 35(12):1872-83.

Nakamura Y, Arai F, Iwasaki H, Hosokawa K, Kobayashi I, Gomei Y, et al. Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells. *Blood*. 2010; 116(9):1422-32.

Nakamura I, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Suda T. Regulation of osteoclast function. *Mod Rheumatol*. 2012; 22(2):167-77

Nichogiannopoulou A, Trevisan M, Neben S, Friedrich C, Georgopoulos K. Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice. *J Exp Med*. 1999; 190(9):1201-14.

Nickoloff BJ. The human progenitor cell antigen (CD34) is localized on endothelial cells, dermal dendritic cells, and perifollicular cells in formalin-fixed normal skin, and on proliferating endothelial cells and stromal spindle-shaped cells in Kaposi's sarcoma. *Arch Dermatol*. 1991; 127(4):523-9.

Nie Y, Han YC, Zou YR. CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J Exp Med*. 2008; 205(4):777-83.

Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood*. 2001; 97(8):2293-9.

Noël D, Djouad F, Bouffi C, Mrugala D, Jorgensen C. Multipotent mesenchymal stromal cells and immune tolerance. *Leuk Lymphoma*. 2007; 48(7):1283-9.

Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS, Kruger M, van Bezooijen RL, de Paus RA, et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol*. 2002; 30(8):870-8.

Norol F, Drouet M, Pflumio F, Léonardi M, Mourcin F, Debili N, et al. Ex vivo expansion marginally amplifies repopulating cells from baboon peripheral blood mobilized CD34+ cells. *Br J Haematol*. 2002; 117(4):924-34.

Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poepl A, Jurisica I, Dick JE. Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science*. 2011; 333(6039):218-21.

Novelli EM, Ramirez M, Civin CI. Biology of CD34+CD38- cells in lymphohematopoiesis. *Leuk Lymphoma*. 1998; 31(3-4):285-93.

Ohnishi S, Yasuda T, Kitamura S, Nagaya N. Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells. *Stem Cells*. 2007; 25(5):1166-77.

Okuyama H, Krishnamachary B, Zhou YF, Nagasawa H, Bosch-Marce M, Semenza GL. Expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 in bone marrow-derived mesenchymal cells is dependent on hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 2006; 281(22):15554-63.

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):387-9.

Omori Y, Honmou O, Harada K, Suzuki J, Houkin K, Kocsis JD. Optimization of a therapeutic protocol for intravenous injection of human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Res*. 2008; 1236:30-8.

Orlic D. Adult bone marrow stem cells regenerate myocardium in ischemic heart disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 996:152-7.

Panepucci RA, Oliveira LH, Zanette DL, Viu Carrara Rde C, Araujo AG, Orellana MD, et al. Increased levels of NOTCH1, NF-kappaB, and other interconnected transcription factors characterize primitive sets of hematopoietic stem cells. *Stem Cells Dev.* 2010; 19(3):321-32.

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):9647-51.

Paquette RL, Dergham ST, Karpf E, Wang HJ, Slamon DJ, Souza L, et al. Culture conditions affect the ability of ex vivo expanded peripheral blood progenitor cells to accelerate hematopoietic recovery. *Exp Hematol.* 2002; 30(4):374-80.

Park IK, He Y, Lin F, Laerum OD, Tian Q, Bumgarner R, et al. Differential gene expression profiling of adult murine hematopoietic stem cells. *Blood.* 2002; 99(2):488-98.

Park IK, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihajla M, Weissman IL, et al. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature.* 2003; 423 (6937):302-5.

Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(13): 5431-6.

Passegué E, Wagers AJ, Giuriato S, Anderson WC, Weissman IL. Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J Exp Med.* 2005; 202(11):1599-611.

Pearce DJ, Bonnet D. The combined use of Hoechst efflux ability and aldehyde dehydrogenase activity to identify murine and human hematopoietic stem cells. *Exp Hematol.* 2007; 35(9):1437-46.

Péault B, Weissman IL, Buckle AM, Tsukamoto A, Baum C. Thy-1-expressing CD34+ human cells express multiple hematopoietic potentialities in vitro and in SCID-hu mice. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1993; 35(1):91-3.

Pecora AL, Stiff P, Jennis A, Goldberg S, Rosenbluth R, Price P, et al. Prompt and durable engraftment in two older adult patients with high risk chronic myelogenous leukemia (CML) using ex vivo expanded and unmanipulated unrelated umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 25(7):797-9.

Pecora AL, Stiff P, LeMaistre CF, Bayer R, Bachier C, Goldberg SL, et al. A phase II trial evaluating the safety and effectiveness of the AastromReplicell system for augmentation of low-dose blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2001; 28(3):295-303.

Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, Petit I, Franitza S, Grabovsky V, et al. 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.* 2000; 95(11):3289-96.

Pereira RE, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(11):4857-61.

Perkins S, Fleischman RA. Hematopoietic microenvironment. Origin, lineage, and transplantability of the stromal cells in long-term bone marrow cultures from chimeric mice. *J Clin Invest.* 1988; 81(4):1072-80.

Peterson KM, Aly A, Lerman A, Lerman LO, Rodriguez-Porcel M. Improved survival of mesenchymal stromal cell after hypoxia preconditioning: role of oxidative stress. *Life Sci.* 2011; 88(1-2):65-73.

Petropoulou AD, Rocha V. Risk factors and options to improve engraftment in unrelated cord blood transplantation. *Stem Cells Int.* 2011;2011:610514.

Pflumio F, Izac B, Katz A, Shultz LD, Vainchenker W, Coulombel L. Phenotype and function of human hematopoietic cells engrafting immune-deficient CB17-severe combined immunodeficiency mice and nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice after transplantation of human cord blood mononuclear cells. *Blood.* 1996; 88(10):3731-40.

Pierre-Louis O, Clay D, Brunet de la Grange P, Blazsek I, Desterke C, Guerton B, Blondeau C, et al. Dual SP/ALDH functionalities refine the human hematopoietic Lin-CD34+CD38-stem/progenitor cell compartment. *Stem Cells.* 2009;27(10):2552-62.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284(5411):143-7.

Ploemacher RE, Brons RH. Separation of CFU-S from primitive cells responsible for reconstitution of the bone marrow hemopoietic stem cell compartment following irradiation: evidence for a pre-CFU-S cell. *Exp Hematol.* 1989;17(3):263-6

Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonné A, Delorme B, Hérault O, et al. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells.* 2007;25(7):1737-45

Pontikoglou C, Deschaseaux F, Sensebé L, Papadaki HA. Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and their role in hematopoiesis and hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cell Rev.* 2011; 7(3):569-89.

Potier E, Ferreira E, Andriamanalijaona R, Pujol JP, Oudina K, Logeart-Avramoglou D, et al. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone* 2007; 40(4):1078-87.

Prince HM, Simmons PJ, Whitty G, Wall DP, Barber L, Toner GC, et al. Improved haematopoietic recovery following transplantation with ex vivo-expanded mobilized blood cells. *Br J Haematol.* 2004; 126(4):536-45.

Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ. Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem.* 1997; 272(17):11205-14.

Qian H, Georges-Labouesse E, Nyström A, Domogatskaya A, Tryggvason K, Jacobsen SE, et al. Distinct roles of integrins alpha6 and alpha4 in homing of fetal liver hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 2007;110(7):2399-407.

Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Delilieri GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol.* 2002; 30(7):783-91.

Rafiee P, Nelson VM, Manley S, Wellner M, Floer M, Binion DG, et al. Effect of curcumin on acidic pH-induced expression of IL-6 and IL-8 in human esophageal epithelial cells (HET-1A): role of PKC, MAPKs, and NF-kappaB. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;296(2):G388-98.

Rafii S, Mohle R, Shapiro F, Frey BM, Moore MA. Regulation of hematopoiesis by microvascular endothelium. *Leuk Lymphoma.* 1997; 27(5-6):375-86.

Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med.* 2003; 9(6):702-12.

Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science.* 2002; 298(5593):597-600.

Rameshwar P, Wong EW, Connell ND. Effects by anthrax toxins on hematopoiesis: a key role for cytokines as mediators. *Cytokine.* 2012; 57(1):143-9.

Rasmussen JG, Frøbert O, Pilgaard L, Kastrup J, Simonsen U, Zachar V, et al. Prolonged hypoxic culture and trypsinization increase the pro-angiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy*. 2011; 13(3):318-28.

Rasmusson I, Ringdén O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation*. 2003; 76(8):1208-13.

Randall TD, Lund FE, Howard MC, Weissman IL. Expression of murine CD38 defines a population of long-term reconstituting hematopoietic stem cells. *Blood*. 1996; 87(10):4057-67.

Rege TA, Hagood JS. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J*. 2006; 20(8):1045-54.

Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004; 109(10):1292-8.

Rehn M, Olsson A, Reckzeh K, Diffner E, Carmeliet P, Landberg G, et al. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor regulates murine hematopoietic stem cell function in the low-oxygenic niche. *Blood*. 2011; 118(6):1534-43.

Reiffers J, Cailliot C, Dazey B, Attal M, Caraux J, Boiron JM. Abrogation of post-myeloablative chemotherapy neutropenia by ex-vivo expanded autologous CD34-positive cells. *Lancet*. 1999; 354(9184):1092-3.

Reimold AM. TNFalpha as therapeutic target: new drugs, more applications. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2002; 1(4):377-92.

Reisbach G, I Bartke, B Kempkes, G Kostka, J Ellwart, A Birner, et al. Characterization of hemopoietic cell populations from human cord blood expressing c-kit. *Exp Hematol*. 1993; 21(1):74-79.

Ren H, Cao Y, Zhao Q, Li J, Zhou C, Liao L, et al. Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 18;347(1):12-21.

Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003;423(6938):409-14.

Reyes H, Reisz-Porszasz S, Hankinson O. Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science*. 1992;256(5060):1193-5.

Robert-Richard E, Ged C, Ortet J, Santarelli X, Lamrissi-Garcia I, de Verneuil H, et al. Human cell engraftment after busulfan or irradiation conditioning of NOD/SCID mice. *Haematologica*. 2006; 91(10): 1384.

Robinson SN, Seina SM, Gohr JC, Kuszynski CA, Sharp JG. Evidence for a qualitative hierarchy within the Hoechst-33342 'side population' (SP) of murine bone marrow cells. *Bone Marrow Transplant*. 2005; 35(8):807-18.

Robinson SN, Ng J, Niu T, Yang H, McMannis JD, Karandish S, et al. Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant*. 2006; 37(4): 359-66.

Robinson SN, Simmons PJ, Yang H, Alousi AM, Marcos de Lima J, Shpall EJ. Mesenchymal stem cells in ex vivo cord blood expansion. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011; 24(1): 83-92.

Rocha V, Labopin M, Sanz G, Arcese W, Schwerdtfeger R, Bosi A, et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med*. 2004; 351(22):2276-85.

Rocheffort GY, Delorme B, Lopez A, Hérault O, Bonnet P, Charbord P, et al. Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells*. 2006; 24(10):2202-8.

Rodríguez Mdel C, Bernad A, Aracil M. Interleukin-6 deficiency affects bone marrow stromal precursors, resulting in defective hematopoietic support. *Blood*. 2004; 103(9): 3349-54.

Rosler ES, Brandt JE, Chute J, Hoffman R. An in vivo competitive repopulation assay for various sources of human hematopoietic stem cells. *Blood*. 2000;96(10):3414-21.

Rosová I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolte JA. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008; 26(8):2173-82.

Rouault K. Rôle des facteurs de transcription HIF (Hypoxia Inducible Factor) dans le maintien à long terme des cellules souches hématopoïétiques humaines chez la souris immunodéficiente. In *Sciences Technologie, Santé* (2010)- thèse n°1758 (Bordeaux, Université Victor Segalen Bordeaux 2).

Roy S, Khanna S, Wallace WA, Lappalainen J, Rink C, Cardounel AJ, et al. Characterization of perceived hyperoxia in isolated primary cardiac fibroblasts and in the reoxygenated heart. *J Biol Chem*. 2003; 278(47):47129-35.

Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J*. 1998; 17(11):3005-15.

Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007; 131(2):324-36.

Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem*. 1997; 272(36):22642-7.

Salingcarnboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K, Obinata M, Amagasa T, Nifuji A, et al. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res*. 2003; 287(2):289-300.

Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowska WH, Reid DS, et al. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(25):12223-7.

Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 2006;441(7097):1075-9.

Scandura JM, Boccuni P, Massagué J, Nimer SD. Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(42):15231-6.

Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978; 4(1-2): 7-25.

Schrezenmeier H, Jenal M, Herrmann F, Heimpel H, Raghavachar A. Quantitative analysis of cobblestone area-forming cells in bone marrow of patients with aplastic anemia by limiting dilution assay. *Blood*. 1996; 88(12):4474-80.

Schwarzenberger P, Kolls JK. Interleukin 17: an example for gene therapy as a tool to study cytokine mediated regulation of hematopoiesis. *J Cell Biochem. Suppl*. 2002; 38:88-95.

Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003 Oct; 3(10):721-32.

Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology* (Bethesda). 2004; 19:176-82.

Sensébé L et Bourin P. Production des cellules souches mésenchymateuses à usage clinique. *Hématologie* 2005; 11 (6): 373-83.

Shao L, Li H, Pazhanisamy SK, Meng A, Wang Y, Zhou D. Reactive oxygen species and hematopoietic stem cell senescence. *Int J Hematol*. 2011; 94(1):24-32.

Sharkis SJ, Collector MI, Barber JP, Vala MS, Jones RJ. Phenotypic and functional characterization of the hematopoietic stem cell. *Stem Cells*. 1997; 15 Suppl 1:41-4; discussion 44-5.

Sharma S, Gurudutta GU, Satija NK, Pati S, Afrin F, Gupta P, et al. Stem cell c-KIT and HOXB4 genes: critical roles and mechanisms in self-renewal, proliferation, and differentiation. *Stem Cells Dev*. 2006; 15(6):755-78.

Shima H, Takubo K, Iwasaki H, Yoshihara H, Gomei Y, Hosokawa K, et al. Reconstitution activity of hypoxic cultured human cord blood CD34-positive cells in NOG mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 378(3): 467-72.

SHOOTER RA, GEY GO. Studies of the mineral requirements of mammalian cells. *Br J Exp Pathol*. 1952; 33(1):98-103.

Shpall EJ, Quinones R, Giller R, Zeng C, Baron AE, Jones RB, et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002; 8(7):368-76.

Shu SN, Wei L, Wang JH, Zhan YT, Chen HS, Wang Y. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. *World J Gastroenterol*. 2004; 10(19):2818-22.

Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol*. 1995; 154(1):180-91.

Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol*. 2005; 174(10):6477-89.

Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7(2):118-30.

Silván U, Díez-Torre A, Arluzea J, Andrade R, Silió M, Aréchaga J. Hypoxia and pluripotency in embryonic and embryonal carcinoma stem cell biology. *Differentiation*. 2009; 78(2-3):159-68.

Silvestri F, Banavali S, Baccarani M, Preisler HD. The CD34 hemopoietic progenitor cell associated antigen: biology and clinical applications. *Haematologica*. 1992; 77(3):265-73.

Siminovitch L, McCulloch Ea, Till Je. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Physiol*. 1963; 62:327-36.

Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*. 1991; 78(1):55-62.

Simmons PJ, Masinovsky B, Longenecker BM, Berenson R, Torok-Storb B, Gallatin WM. Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1992; 80(2):388-95.

Simmons PJ, Levesque JP, Zannettino AC. Adhesion molecules in haemopoiesis. *Baillieres Clin Haematol*. 1997; 10(3):485-505.

Simon MC. Coming up for air: HIF-1 and mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab*. 2006; 3(3):150-1.

Simon MC, Keith B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9(4):285-96.

Simsek T, Kocabas F, Zheng J, Deberardinis RJ, Mahmoud AI, Olson EN, et al. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell*. 2010; 7(3):380-90.

Solar GP, Kerr WG, Zeigler FC, Hess D, Donahue C, de Sauvage FJ, et al. Role of c-mpl in early hematopoiesis. *Blood*. 1998; 92(1):4-10.

Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M, Wysoczynski M, Turner AR, Ratajczak J, et al. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells*. 2006; 24(5):1254-64.

Song K, Zhao G, Liu T, Zhang L, Ma X, Liu J, et al. Effective expansion of umbilical cord blood hematopoietic stem/progenitor cells by regulation of microencapsulated osteoblasts under hypoxic condition. *Biotechnol Lett*. 2009; 31(7): 923-8.

Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 1988; 241(4861):58-62.

Spees JL, Olson SD, Whitney MJ, Prockop DJ. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(5):1283-8.

Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature* 2001; 414(6859):98-104.

Staud F, Pavsek P. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37(4):720-5.

Stiff P, Chen B, Franklin W, Oldenberg D, Hsi E, Bayer R, et al. Autologous transplantation of ex vivo expanded bone marrow cells grown from small aliquots after high-dose chemotherapy for breast cancer. *Blood*. 2000; 95(6):2169-74.

Subramanian K, Geraerts M, Pauwelyn KA, Park Y, Owens DJ, Muijtjens M, et al. Isolation procedure and characterization of multipotent adult progenitor cells from rat bone marrow. *Methods Mol Biol*. 2010; 636:55-78.

Sugamura K, Asao H, Kondo M, Tanaka N, Ishii N, Ohbo K, et al. The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu Rev Immunol*. 1996; 14:179-205.

Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006; 25(6):977-88.

Sugiura K, Taketani S, Yoshimura T, Nishino T, Nishino N, Fujisawa J, et al. Effect of hepatocyte growth factor on long term hematopoiesis of human progenitor cells in transgenic-severe combined immunodeficiency mice. *Cytokine*. 2007; 37(3):218-26.

Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH, Eaves AC, Eaves CJ. Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(9):3584-8

Sutherland DR, Keating A, Nayar R, Anania S and Stewart AK. Sensitive detection and enumeration of CD34+ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry. *Exp Hematol*. 1994; 22(10): 1003-10.

Suzuki T, Yokoyama Y, Kumano K, Takanashi M, Kozuma S, Takato T, et al. Highly efficient ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells using Delta1-Fc chimeric protein. *Stem Cells*. 2006; 24(11):2456-65.

Szilvassy SJ, Nicolini FE, Eaves CJ, Miller CL. Quantitation of murine and human hematopoietic stem cells by limiting-dilution analysis in competitively repopulated hosts. *Methods Mol Med*. 2002; 63:167-87.

Taichman RS, Emerson SG. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J Exp Med*. 1994; 179(5):1677-82.

Taichman RS, Reilly MJ, Emerson SG. Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures. *Blood*. 1996; 87(2):518-24.

Tajima F, Deguchi T, Laver JH, Zeng H, Ogawa M. Reciprocal expression of CD38 and CD34 by adult murine hematopoietic stem cells. *Blood*. 2001; 97(9):2618-24.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131(5):861-72.

Takahata S, Sogawa K, Kobayashi A, Ema M, Mimura J, Ozaki N, et al. Transcriptionally active heterodimer formation of an Arnt-like PAS protein, Arnt3, with HIF-1a, HLF, and clock. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 248(3):789-94.

Takubo K, Goda N, Yamada W, Iriuchishima H, Ikeda E, Kubota Y, et al. Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010; 7(3): 391-402.

Tamama K, Kawasaki H, Kerpedjieva SS, Guan J, Ganju RK, Sen CK. Differential roles of hypoxia inducible factor subunits in multipotential stromal cells under hypoxic condition. *J Cell Biochem*. 2011; 112(3):804-17.

Tarte K, Gaillard J, Lataillade JJ, Fouillard L, Becker M, Mossafa H, et al. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood*. 2010;115(8):1549-53

Thomas ED, Lochte HL Jr, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*. 1957; 257(11):491-6.

Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. 1961; 14:213-22.

Till Je, McCulloch Ea, Siminovitch L. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1964; 51:29-36.

Ting CN, Olson MC, Barton KP, Leiden JM. Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature*. 1996;384(6608):474-8.

Tisdale JF, Hanazono Y, Sellers SE, Agricola BA, Metzger ME, Donahue RE, et al. Ex vivo expansion of genetically marked rhesus peripheral blood progenitor cells results in diminished long-term repopulating ability. *Blood*. 1998; 92(4):1131-41.

Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi BI, Nagasawa T. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity*. 2004; 20(6):707-18.

Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002; 105(1):93-8

Tøndevold E, Eriksen J, Jansen E. Observations on long bone medullary pressures in relation to arterial PO₂, PCO₂ and pH in the anaesthetized dog. *Acta Orthop Scand*. 1979; 50(6 Pt 1):645-51

Tong W, Ibarra YM, Lodish HF. Signals emanating from the membrane proximal region of the thrombopoietin receptor (mpl) support hematopoietic stem cell self-renewal. *Exp Hematol*. 2007; 35(9):1447-55.

Trumpp A, Essers M, Wilson A. Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10(3):201-9.

Tsai CC, Chen YJ, Yew TL, Chen LL, Wang JY, Chiu CH, et al. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood*. 2011; 117(2):459-69.

Udomsakdi C, Lansdorp PM, Hogge DE, Reid DS, Eaves AC, Eaves CJ. Characterization of primitive hematopoietic cells in normal human peripheral blood. *Blood*. 1992; 80(10): 2513-21.

Ulich TR, del Castillo J, Yin SM, Egrie JC. The erythropoietic effects of interleukin 6 and erythropoietin in vivo. *Exp Hematol*. 1991; 19(1):29-34.

Van Den Berg DJ, Sharma AK, Bruno E, Hoffman R. Role of members of the Wnt gene family in human hematopoiesis. *Blood*. 1998; 92(9):3189-202.

Van Overstraeten-Schlögel N, Beguin Y, Gothot A. Role of stromal-derived factor-1 in the hematopoietic-supporting activity of human mesenchymal stem cells. *Eur J Haematol*. 2006; 76(6): 488-93.

Van Snick J. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol*. 1990; 8:253-78.

Varnum-Finney B, Xu L, Brashem-Stein C, Nourigat C, Flowers D, Bakkour S, et al. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med*. 2000; 6(11):1278-81.

Vercauteren SM, Sutherland HJ. CD133 (AC133) expression on AML cells and progenitors. *Cytotherapy*. 2001; 3(6):449-59.

Vlaski M, Lafarge X, Chevaleyre J, Duchez P, Boiron JM, Ivanovic Z. Low oxygen concentration as a general physiologic regulator of erythropoiesis beyond the EPO-related downstream tuning and a tool for the optimization of red blood cell production ex vivo. *Exp Hematol*. 2009; 37(5): 573-84.

Voermans C, Kooi ML, Rodenhuis S, van der Lelie H, van der Schoot CE, Gerritsen WR. In vitro migratory capacity of CD34+ cells is related to hematopoietic recovery after autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2001; 97(3):799-804.

Von Eitzen U, Meier-Tackmann D, Agarwal DP, Goedde HW. Detoxification of cyclophosphamide by human aldehyde dehydrogenase isozymes. *Cancer Lett*. 1994; 76(1):45-9.

Wagers AJ, Weissman IL. Differential expression of alpha2 integrin separates long-term and short-term reconstituting Lin-/loThy1.1(lo)c-kit+ Sca-1+ hematopoietic stem cells. *Stem Cells*. 2006; 24(4):1087-94.

Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*. 2005; 33(11):1402-16.

Wagner W, Wein F, Roderburg C, Saffrich R, Faber A, Krause U, et al. Adhesion of hematopoietic progenitor cells to human mesenchymal stem cells as a model for cell-cell interaction. *Exp Hematol*. 2007a; 35(2):314-25.

Wagner W, Roderburg C, Wein F, Diehlmann A, Frankhauser M, Schubert R, et al. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem Cells*. 2007b; 25(10):2638-47.

Wagner W, Wein F, Roderburg C, Saffrich R, Diehlmann A, Eckstein V, et al. Adhesion of human hematopoietic progenitor cells to mesenchymal stromal cells involves CD44. *Cells Tissues Organs*. 2008; 188(1-2):160-9.

Walenda T, Bork S, Horn P, Wein F, Saffrich R, Diehlmann A, et al. Co-culture with mesenchymal stromal cells increases proliferation and maintenance of haematopoietic progenitor cells. *J Cell Mol Med* 2010; 14(1-2): 337-50.

Walenda T, Bokermann G, Ventura Ferreira MS, Piroth DM, Hieronymus T, Neuss S, et al. Synergistic effects of growth factors and mesenchymal stromal cells for expansion of hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol*. 2011; 39(6):617-28.

Wang GL, Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem*. 1993; 268(29):21513-8.

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(12):5510-4.

Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA. Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(8):3444-9

Wang JF, Wang LJ, Wu YF, Xiang Y, Xie CG, Jia BB, et al. Mesenchymal stem/progenitor cells in human umbilical cord blood as support for ex vivo expansion of CD34(+) hematopoietic stem cells and for chondrogenic differentiation. *Haematologica*. 2004; 89(7): 837-44.

Wang DW, Fermor B, Gimble JM, Awad HA, Guilak F. Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells. *J Cell Physiol*. 2005; 204(1):184-91.

Wang M, Zhang W, Crisostomo P, Markel T, Meldrum KK, Fu XY, et al. STAT3 mediates bone marrow mesenchymal stem cell VEGF production. *J Mol Cell Cardiol*. 2007; 42(6):1009-15.

Wang JA, Chen TL, Jiang J, Shi H, Gui C, Luo RH, et al. Hypoxic preconditioning attenuates hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2008a; 29(1):74-82.

Wang Y, Deng Y, Zhou GQ. SDF-1alpha/CXCR4-mediated migration of systemically transplanted bone marrow stromal cells towards ischemic brain lesion in a rat model. *Brain Res*. 2008b; 1195:104-12.

Wang YH, Liu YJ. The IL-17 cytokine family and their role in allergic inflammation. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(6):697-702

Watanabe T, Kawano Y, Kanamaru S, Onishi T, Kaneko S, Wakata Y, et al. Endogenous interleukin-8 (IL-8) surge in granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral blood stem cell mobilization. *Blood*. 1999;93(4):1157-63.

Weimar IS, Miranda N, Muller EJ, Hekman A, Kerst JM, de Gast GC, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is produced by human bone marrow stromal cells and promotes proliferation, adhesion and survival of human hematopoietic progenitor cells (CD34+). *Exp Hematol*. 1998; 26(9):885-94.

Wein F, Pietsch L, Saffrich R, Wuchter P, Walenda T, Bork S, et al. N-cadherin is expressed on human hematopoietic progenitor cells and mediates interaction with human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res*. 2010; 4(2):129-39.

Wenger RH, Rolfs A, Marti HH, Guénet JL, Gassmann M. Nucleotide sequence, chromosomal assignment and mRNA expression of mouse hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 223(1):54-9.

Wild JM, Fichelle S, Woodhouse N, Paley MN, Kasuboski L, van Beek EJ. 3D volume-localized pO₂ measurement in the human lung with 3He MRI. *Magn Reson Med* 2005; 53(5):1055-64.

Wilkins BS, Jones DB. Immunohistochemical characterization of intact stromal layers in long-term cultures of human bone marrow. *Br J Haematol*. 1995; 90(4):757-66.

Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*. 2003;423(6938): 448-52.

Williams SF, Lee WJ, Bender JG, Zimmerman T, Swinney P, Blake M, et al. Selection and expansion of peripheral blood CD34+ cells in autologous stem cell transplantation for breast cancer. *Blood*. 1996; 87(5):1687-91.

Wilson EL, Rifkin DB, Kelly F, Hannocks MJ, Gabilove JL. Basic fibroblast growth factor stimulates myelopoiesis in long-term human bone marrow cultures. *Blood*. 1991; 77(5):954-60.

Wilson A, Murphy MJ, Oskarsson T, Kaloulis K, Bettess MD, Oser GM, et al. c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev*. 2004; 18(22):2747-63.

Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, et al. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*. 2008; 135(6):1118-29.

Winkler IG, Barbier V, Wadley R, Zannettino AC, Williams S, Lévesque JP. 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*. 2010; 116(3): 375-85.

Wu EH, Li HS, Zhao T, Fan JD, Ma X, Xiong L, Li WJ, Zhu LL, Fan M. [Effect of hypoxia on the gene profile of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells]. *Sheng Li Xue Bao*. 2007; 59(2):227-32.

Xie CG, Wang JF, Xiang Y, Jia BB, Qiu LY, Wang LJ, et al. Marrow mesenchymal stem cells transduced with TPO/FL genes as support for ex vivo expansion of hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Mol Life Sci*. 2005; 62(21):2495-507.

Xu R, Reems JA. Umbilical cord blood progeny cells that retain a CD34+ phenotype after ex vivo expansion have less engraftment potential than unexpanded CD34+ cells. *Transfusion*. 2001; 41(2):213-8.

Yahata T, Ando K, Sato T, Miyatake H, Nakamura Y, Muguruma Y, et al. A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. *Blood*. 2003; 101(8):2905-13.

Yahata T, Muguruma Y, Yumino S, Sheng Y, Uno T, Matsuzawa H, et al. Quiescent human hematopoietic stem cells in the bone marrow niches organize the hierarchical structure of hematopoiesis. *Stem Cells*. 2008; 26(12):3228-36.

Yahata T, Takanashi T, Muguruma Y, Ibrahim AA, Matsuzawa H, Uno T, et al. Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. *Blood*. 2011; 118(11): 2941-50.

Yamaguchi M, Hirayama F, Kanai M, Sato N, Fukazawa K, Yamashita K, et al. Serum-free coculture system for ex vivo expansion of human cord blood primitive progenitors and SCID mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells. *Exp Hematol*. 2001; 29(2):174-82.

Yamaguchi M, Hirayama F, Murahashi H, Azuma H, Sato N, Miyazaki H, et al. Ex vivo expansion of human UC blood primitive hematopoietic progenitors and transplantable stem cells using human primary BM stromal cells and human AB serum. *Cytotherapy*. 2002a; 4(2):109-18.

Yamaguchi M, Hirayama F, Wakamoto S, Fujihara M, Murahashi H, Sato N, et al. Bone marrow stromal cells prepared using AB serum and bFGF for hematopoietic stem cells expansion. *Transfusion*. 2002b; 42(7): 921-7.

Yamashita T, Ninomiya M, Hernández Acosta P, García-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi M, et al. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci*. 2006; 26(24):6627-36.

Yang M, Li K, Ng PC, Chuen CK, Lau TK, Cheng YS, et al. Promoting effects of serotonin on hematopoiesis: ex vivo expansion of cord blood CD34+ stem/progenitor cells, proliferation of bone marrow stromal cells, and antiapoptosis. *Stem Cells*. 2007; 25(7):1800-6.

Yagi M, Ritchie KA, Sitnicka E, Storey C, Roth GJ, Bartelmez S. Sustained ex vivo expansion of hematopoietic stem cells mediated by thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(14):8126-31.

Yao CL, Chu IM, Hsieh TB, Hwang SM. A systematic strategy to optimize ex vivo expansion medium for human hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood mononuclear cells. *Exp Hematol*. 2004; 32(8):720-7.

Yildirim S, Boehmler AM, Kanz L, Möhle R. Expansion of cord blood CD34⁺ hematopoietic progenitor cells in coculture with autologous umbilical vein endothelial cells (HUVEC) is superior to cytokine-supplemented liquid culture. *Bone Marrow Transplant*. 2005; 36(1):71-9.

Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997; 90(12): 5002-12.

Yokota T, Meka CS, Kouro T, Medina KL, Igarashi H, Takahashi M, et al. Adiponectin, a fat cell product, influences the earliest lymphocyte precursors in bone marrow cultures by activation of the cyclooxygenase-prostaglandin pathway in stromal cells. *J Immunol*. 2003; 171(10):5091-9.

Yonemura Y, Ku H, Lyman SD, Ogawa M. In vitro expansion of hematopoietic progenitors and maintenance of stem cells: comparison between FLT3/FLK-2 ligand and KIT ligand. *Blood*. 1997; 89(6):1915-21.

Yoo ES, Lee KE, Seo JW, Yoo EH, Lee MA, Im SA, et al. Adherent cells generated during long-term culture of human umbilical cord blood CD34⁺ cells have characteristics of endothelial cells and beneficial effect on cord blood ex vivo expansion. *Stem Cells*. 2003; 21(2):228-35.

Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2009; 5(3):237-41.

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):685-97.

Yoshino H, Ueda T, Kawahata M, Kobayashi K, Ebihara Y, Manabe A, et al. Natural killer cell depletion by anti-asialo GM1 antiserum treatment enhances human hematopoietic stem cell engraftment in NOD/Shi-scid mice. *Bone Marrow Transplant*. 2000; 26(11):1211-6.

Yu DY, Cringle SJ. Retinal degeneration and local oxygen metabolism. *Exp Eye Res*. 2005; 80(6):745-51.

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318 (5858):1917-20.

Zanjani ED, Almeida-Porada G, Flake AW. The human/sheep xenograft model: a large animal model of human hematopoiesis. *Int J Hematol*. 1996;63(3):179-92.

Zhambalova AP, Darevskaya AN, Kabaeva NV, Romanov YA, Buravkova LB. Specific interaction of cultured human mesenchymal and hemopoietic stem cells under conditions of reduced oxygen content. *Bull Exp Biol Med*. 2009; 147(4): 525-30.

Zhang P, Iwama A, Datta MW, Darlington GJ, Link DC, Tenen DG. Upregulation of interleukin 6 and granulocyte colony-stimulating factor receptors by transcription factor CCAAT enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha) is critical for granulopoiesis. *J Exp Med*. 1998; 188(6):1173-84.

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):836-41.

Zhang Y, Li C, Jiang X, Zhang S, Wu Y, Liu B, et al. Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture- initiating cells from cord blood CD34⁺ cells. *Exp Hematol*. 2004; 32(7):657-64.

Zhang Y, Chai C, Jiang XS, Teoh SH, Leong KW. Co-culture of umbilical cord blood CD34⁺ cells with human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*. 2006; 12(8):2161-70.

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):1028-34

Zhu W, Chen J, Cong X, Hu S, Chen X. Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006; 24(2):416-25.

Zhu J, Zhou Z, Liu Y, Zheng J. Fractalkine and CX3CR1 are involved in the migration of intravenously grafted human bone marrow stromal cells toward ischemic brain lesion in rats. Brain Res. 2009; 1287:173-83.

Zipori D. The nature of stem cells: state rather than entity. Nat Rev Genet. 2004; 5(11): 873-8.

Zwartouw HT, Westwood JC. Factors affecting growth and glycolysis in tissue culture. Br J Exp Pathol. 1958; 39(5):529-39.

ANNEXS

Article 1

Low O₂ concentrations enhance the positive effect of IL-17 on the maintenance of erythroid progenitors during co-culture of CD34⁺ and mesenchymal stem cells

Krstić A, Vlaski M, Hammoud M, Chevaleyre J, Ducheze P, Jovčić G, Bugarski D, Milenković P, Bourin P, Boiron JM, Praloran V, Ivanović Z.
Eur Cytokine Netw. 2009 Mar;20(1):10-6

Article 2

Slow-cycling/quiescence balance of hematopoietic stem cells is related to physiological gradient of oxygen

Amélie Guitart, Mohammad Hammoud, Persio Dello Sbarba, Zoran Ivanovic, and Vincent Praloran
Exp Hematol. 2010 Oct;38(10):847-51

Article 1

Low O₂ concentrations enhance the positive effect of IL-17 on the maintenance of erythroid progenitors during co-culture of CD34⁺ and mesenchymal stem cells

Krstić A, Vlaski M, Hammoud M, Chevaleyre J, Duchez P, Jovčić G, Bugarski D, Milenković P, Bourin P, Boiron JM, Praloran V, Ivanović Z.

Eur Cytokine Netw. 2009 Mar;20(1):10-6

Dans le cadre de cette étude, nous avons mis en place un protocole qui réunit les conditions physiologiques principales convenables pour le développement de CSH dans la culture à savoir, la co-culture avec les CSM et les BC-O₂ (3%).

Dans ce contexte, nous avons étudié l'effet de l'interleukine IL-17 sur l'expansion cellulaire, la production de CFC et sur le profil phénotypique des cellules CD34⁺ du sang périphérique co-cultivées pendant cinq jours avec des couches des CSM à des concentrations diverses O₂ (20%, 12,5% et 3% d'O₂).

Au terme de ce travail, nous avons démontré que l'IL-17 augmente la production de cellules CD34⁺ et du nombre total de CFC notamment dans la condition de co-culture. Cet effet a été majoré par les BC-O₂, atteignant ainsi son maximum à 3% d'O₂, et est plus prononcée sur les progéniteurs érythroïdes (BFU-E). Cet effet peut être lié à l'IL-6 produite par les CSM. En effet, le taux de celle-ci était le plus important dans les surnageants de culture de CSM et de co-culture développées à 3% d'O₂.

Nos résultats renforcent l'idée que les niveaux physiologiques en O₂ doit être considérée comme un important facteur environnemental qui influe de manière significative l'activité des cytokines notamment sur des cellules « nobles » comme les CSH.

RESEARCH ARTICLE

Low O₂ concentrations enhance the positive effect of IL-17 on the maintenance of erythroid progenitors during co-culture of CD34⁺ and mesenchymal stem cells

Aleksandra Krstić¹, Marija Vlaski^{2,3}, Mohammad Hammoud², Jean Chevalerey², Pascale Duchez², Gordana Jovčić¹, Diana Bugarski¹, Pavle Milenković¹, Philippe Bourin⁴, Jean-Michel Boiron^{2,3}, Vincent Praloran^{3,5}, Zoran Ivanović²

¹ Institute for Medical Research, Belgrade University, Belgrade, Serbia

² French Blood Institute, Aquitaine-Limousin Branch, 5, place Amélie Raba Léon, BP 24, 33035 Bordeaux Cedex, France

³ Victor-Séguen University (Bordeaux 2), Bordeaux, France

⁴ French Blood Institute, Pyrénées-Méditerranée Branch, Toulouse, France

⁵ CNRS UMR 5164

Correspondence: Z. Ivanovic, MD, PhD, Etablissement Français du Sang Aquitaine-Limousin, 5 place Amélie Raba Léon, BP 24, 33035 Bordeaux Cedex, France
<zoran.ivanovic@efs.sante.fr>

Accepted for publication January 16, 2009

ABSTRACT. Co-culture of haematopoietic cells with a stromal cell layer does not mimic the physiological micro-environmental niche, whose major feature is a low oxygen (O₂) concentration. Thus, in order to study the effects of IL-17 in a context which better approximates the physiological state, we investigated its effects on cell expansion, colony-forming ability, and the phenotypical profile of normal, human blood CD34⁺ cells co-cultured for five days with MSC layers at various O₂ concentrations (20%, 12.5% and 3% O₂). We demonstrated that IL-17 enhances CD34⁺ and total CFC production during the five days of MSC/CD34⁺ co-culture. This effect depends upon the O₂ concentration, reaching its maximum at 3% O₂, and is more pronounced on erythroid progenitors (BFU-E). In addition, the stimulation of IL-6 production by IL-17 in MSC cultures and co-cultures is enhanced by low O₂ concentration. The expression of some differentiation markers (CD34, CD13 and CD41) on haematopoietic cells in co-cultures also depends upon the oxygen concentration. Our results strengthen the concept that physiological levels of O₂ (mistakenly called hypoxia), should be considered as an important environmental factor that significantly influences cytokine activity.

Keywords: haematopoietic progenitors, CD34⁺, IL-17, oxygen, hypoxia

Haematopoiesis in adult bone marrow is governed by complex interactions between haematopoietic stem cells (HSCs) and progenitors with their environment. Mesenchymal stem cells (MSCs) [1] are part of the bone marrow haematopoietic niche. They participate in the maintenance of normal haematopoiesis as demonstrated in co-culture systems that mimic some features of the physiological niche. Bone marrow MSCs improve *ex vivo* expansion of human CD34⁺ progenitors [2-4] through cell-to-cell and cell-to-matrix interactions, as well as through secretion of haematopoietic cytokines. They also contribute to the regulation of HSC self-renewal, proliferation, differentiation and settlement [5]. Physiological O₂ concentrations in bone marrow range from <0.1% in subendosteal areas, where primitive HSCs reside, to 7% in perivascular areas, mostly populated with committed progenitors and precursors [6, 7]. Several publications support the fundamental role of these low O₂ concentrations in the regulation of stem cell homeostasis: *i)* whereas culture of HSC at 20% O₂

leads to the rapid exhaustion of their stem cell potential, almost anoxic conditions (0.1% O₂) promote the maintenance and return of HSCs to quiescence in G₀ [8]; *ii)* cultures at higher O₂ levels (1, 1.5 and 3%) maintain cell proliferation, allow better preservation and favor self-renewal of primitive murine and human HSCs [9-16]. Other articles have shown that the number and size of BFU-E-derived colonies [17, 18] and CFC expansion in liquid culture were enhanced at 5% O₂ [19, 20]. Furthermore, the effects of cytokines on haematopoietic progenitors at physiologically relevant, low O₂ concentrations are different from those at the non-physiological, 21% O₂ concentration commonly used for cultures [14, 16, 21, 22]. This should be taken into consideration when defining the physiological activities of cytokines. Interleukin (IL)-17 is the "founding member" of a new cytokine family. IL-17, which is produced exclusively by a newly defined Th cell subset termed Th17 [23], exhibits multiple biological activities on numerous cell types due to the ubiquitous expression of its receptor [24]. Particu-

larly important is its role in immune responses to infection and in the pathogenesis of inflammatory diseases [25]. As an important regulator of host defense, IL-17 stimulates granulopoiesis, neutrophil trafficking [26-28], and erythropoiesis [29, 30]. Most of the effects of IL-17 on haematopoietic cells are indirect via induction of secretion of various cytokines, (GM-CSF, G-CSF, IL-6, and chemokines) by stromal cells [31, 32].

The effects of IL-17 on haematopoietic cells in culture were assessed at 20% O₂, while its action at low, physiologically relevant concentrations, remained unexplored. In the present work, we investigated its effects on cell expansion, colony-forming ability, and the phenotypical profile of human normal blood CD34⁺ cells co-cultured for five days with MSC layers at various O₂ concentrations (20%, 12.5% and 3% O₂).

METHODS AND MATERIALS

Cells and cell culture

Isolation of CD34⁺ cells

Human CD34⁺ cells from peripheral blood leukodepletion filters (Leucoflex, Macopharma, Tourcoing, France) were purified as described elsewhere [33] using the immunomagnetic MACS CD34 isolation kit (Miltenyi Biotec, Paris, France). CD34⁺ cell enrichment, evaluated by flow cytometry analysis using a phycoerythrin-anti-human CD34 antibody (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France), was > 90% in all cases.

Preparation of mesenchymal stem cell (MSC) adherent layers

Human bone marrow MSCs were isolated by culture of bone marrow of healthy donors obtained from filters used during the preparation of allogeneic haematopoietic grafts. Bone marrow cells were cultivated at a concentration of 5×10^4 cells/cm² in minimum essential medium, alpha modification (MEM- α) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS) (Perbio Hyclone, France) and ciprofloxacin (10 μ g/mL; Bayer, Puteaux, France) (referred to as complete MEM- α medium). After 72 h at 37°C, 5% CO₂, non-adherent cells were removed and medium was changed. Cultures were fed every three-four days for 21 days or until confluence. Adherent cells, mainly MSCs, were then trypsinized, harvested and cultured at a concentration of 10^3 /cm² for one-three weeks. MSCs were cryopreserved or not before usage. For this study, thawed MSCs were plated in 24-well plates at 1×10^4 /cm² in MEM- α medium (BioWhittaker, Lonza, Verviers, Belgium), containing 10% FCS, and 2% L-glutamine-penicillin-streptomycin mixture (Cambrex BioWhittaker, Walkersville, MD, USA). Cells were cultured (37°C, humidified atmosphere, 95% air, 5% CO₂) until monolayer confluence, with twice-weekly changes of culture medium.

Co-culture of MSCs and CD34⁺ cells

CD34⁺ cells were then purified, seeded (1×10^5 /well) on MSCs monolayers in 24-well plates and co-cultured for

five days in Stem alpha A medium (Stem Alpha, St. Clement les Places, France) supplemented with 10% FCS and 2% L-glutamine-penicillin-streptomycin mixture in the presence or absence of increasing concentrations of rhIL-17 (5, 50, 100 ng/mL) (R&D Systems, Minneapolis, USA). The co-cultures were maintained at 37°C either at 5% CO₂ and 3 or 12.5% O₂ (Proox Culture Chamber with O₂ and CO₂ regulators BioSpherix, Ltd., Redfield, NY, USA) or at 5% CO₂ and 20% O₂ (Incubator Igo 150 Cell Life, Jouan, St. Herblain, France). At day five, non-adherent cells were carefully harvested and washed. Viable cells were enumerated (by trypan blue exclusion) and processed for further analyses as described below. The experiments were performed with five unrelated MSC-CD34⁺ donor combinations.

Colony-forming cell (CFC) assay

Freshly isolated CD34⁺ or cultured non-adherent cells harvested at day five were cultured in a cytokine-supplemented methylcellulose kit (Stem Alpha ID; Stem Alpha, Saint Clement les Places, France) to enumerate CFCs (colony-forming units-granulocyte macrophage (CFU-GM), burst-forming units-erythroid (BFU-E), and colony-forming units-mix [CFU-Mix]). Freshly isolated CD34⁺ and cultured cells were respectively plated at concentrations of 250 or 1 200 cells/mL and incubated for 14 days at 37°C in a humidified atmosphere with 20% O₂ and 5% CO₂ before the colonies were scored using an inverted microscope.

Detection of cell differentiation antigens by flow cytometry

After five days of co-culture with MSCs in the presence or absence of IL-17 at different O₂ concentrations, non-adherent cells were washed in phosphate-buffered saline with 1% human serum albumin, labeled (25 minutes in dark) with anti-CD34, -CD33, -CD13, and -CD41 monoclonal antibodies coupled to PE and with anti-CD14 and -CD61 coupled to FITC (Beckman Coulter, Immunotech, Marseille, France). They were then washed and resuspended. The phenotype of hematopoietic cells was analyzed by flow cytometry. Fluorochrome-conjugated isotype antibodies were used to determine the level of nonspecific binding.

ELISA dosage of IL-6 in culture supernatants

Cell-free supernatants from 48 h cultures (at 3%, 12.5% or 20% O₂; with and without 100 ng/mL IL-17) of MSC alone and of MSC with CD34⁺ cells (1×10^5) (both cultures and co-cultures were performed with the same medium) were collected and stored at -70°C until testing. IL-6 concentration was measured using an ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) according to the manufacturer's instructions. Detection limit for IL-6 reported by the manufacturer was 0.7 pg/mL.

Statistical analysis

Mean values (\pm SEM) were calculated with data from five independent experiments. The significance of differences was assessed using Student's t test.

RESULTS

Combined effects of hypoxia and IL-17 on the total and CD34⁺ cell number in MSC/CD34⁺ co-cultures

The number of non-adherent cells harvested after five days of incubation without IL-17 at 12.5% (arterial blood O₂ concentration) and 3% O₂ (mean O₂ concentration in bone marrow) was significantly lower than at 20% O₂ (figure 1A). Addition of IL-17 induced a dose-dependent increase in the total cell number at 3% O₂ that was significant only at 100 ng/mL (figure 1A). The differences observed between co-cultures at 3% and 12.5% O₂ supplemented with 100 ng/mL IL-17 were also significant in paired comparisons.

As shown in figure 1B, the maintenance of CD34⁺ cells after five days of co-culture was significantly improved only at the lowest 3% O₂ concentration and with 50 ng/mL IL-17, reaching 60% preservation instead of approximately 20% in all co-cultures without IL-17.

Physiologically low O₂ concentration improves the haematopoietic-supporting activity of IL-17 in MSC/CD34⁺ co-cultures

Addition of IL-17 (50 and 100 ng/mL) induced a significant improvement in the maintenance of BFU-E at all O₂ concentrations tested in comparison with corresponding controls cultured without IL-17 (figure 2A). It should be mentioned that addition of IL-17 to co-cultures at 3% O₂,

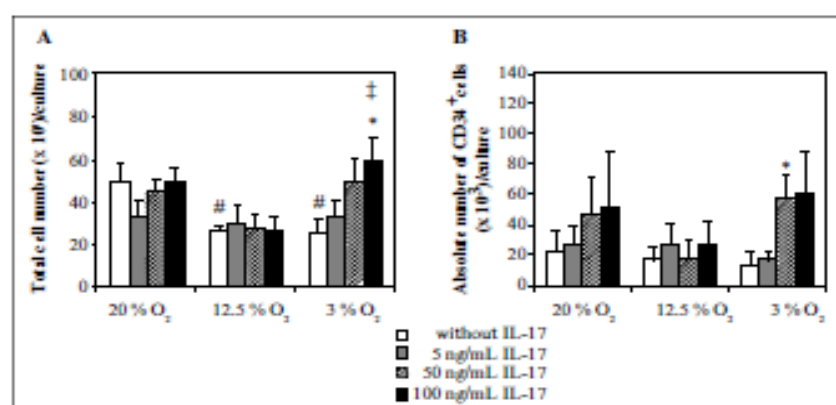


Figure 1

Expansion trends of: A) total nucleated cells, and B) CD34⁺ cells in IL-17-stimulated MSC/CD34⁺ co-cultures at different O₂ concentrations. CD34⁺ cells were co-cultured with MSCs in the presence or absence of IL-17 (5, 50, 100 ng/mL) at 20%, 12.5% and 3% O₂. After five days, the non-adherent cells harvested from co-cultures were enumerated for viable cells and analyzed by flow cytometry for CD34 expression. The data points represent means \pm SEM of five independent experiments. Significant differences were obtained using Student's t-test: *p < 0.05 for IL-17-stimulated versus non-stimulated co-cultures with corresponding O₂ levels; # p < 0.05 for co-cultures at 3% or 12.5% O₂ versus 20% O₂; † p < 0.05 for co-cultures at 3% O₂ versus 12.5% O₂.

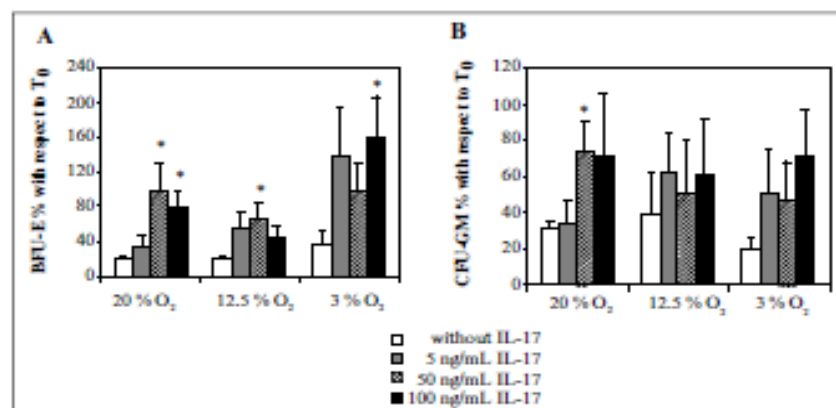


Figure 2

Expansion trends of: A) BFU-E and B) CFU-GM in IL-17-stimulated MSC/CD34⁺ co-cultures at different O₂ concentrations. CD34⁺ cells co-cultured with MSCs in the presence or absence of IL-17 (5, 50, 100 ng/mL) at 20%, 12.5% and 3% O₂ were harvested after five days. The results of CFCs analyses are presented as the percentages of clonogenic progenitors with respect to their numbers obtained at day 0 (T₀). The starting CD34⁺ cell fraction seeded (1 x 10⁵ cells) at T₀ contained 11 800 \pm 580 and 5 933 \pm 1641 of BFU-E and CFU-GM, respectively. The data points represent means \pm SEM of five independent experiments. Significant differences were obtained using Student's t-test: * p < 0.05 for IL-17-stimulated versus non-stimulated co-cultures with corresponding O₂ levels.

at a dose of 100 ng/mL, even induced an expansion of BFU-Es to 160% of their number at day 0. These results show that low O₂ concentrations (below 12.5%) and IL-17 (> 5 ng/mL) have a synergistic effect on the maintenance/expansion of BFU-Es in short-term, liquid culture. Although the CFU-GM number in all cultures supplemented with IL-17 was 1.5 to 3 times higher compared to that without the IL-17, its beneficial effect on their survival was significant only in co-cultures at 20% O₂ with 50 ng/mL IL-17. However, it barely enabled maintenance of their day 0 numbers (figure 2B). At low O₂ concentrations however, the positive effect of IL-17 on CFU-GM was not statistically significant, and their maintenance varied from 45 to 75% with respect to day 0 values.

No significant alterations were induced by IL-17 at any O₂ concentration within the CFU-Mix compartment (data not shown). IL-17 improves the maintenance of total committed progenitors at all O₂ concentrations, but this was most pronounced at 3% O₂ (table 1).

Influence of IL-17 on the phenotype of haematopoietic cells with respect to O₂ concentration

Non-adherent cells harvested at day five of co-culture were analyzed for the expression of haematopoietic differentiation antigens CD34, CD33, CD13, CD14, CD41 and CD61.

The percentage of CD34⁺ cells decreased from about 90% (day 0 cell fraction) to 30–35% (day five of co-culture) without IL-17 whatever the O₂ concentration (figure 3A). Addition of IL-17 enhanced the percentage of cells maintaining their CD34 expression at all O₂ con-

Table 1
Absolute numbers of total CFC in IL-17-stimulated MSC/CD34⁺ co-cultures at different O₂ concentrations

Total CFC	20% O ₂	12.5% O ₂	3% O ₂
Without IL-17	4 293 ± 526	4 022 ± 1 108	5 355 ± 1 925
IL-17 5 ng/mL	6 072 ± 2 480	8 978 ± 3 070	18 473 ± 9 519
IL-17 50 ng/mL	15 217 ± 4 086*	10 048 ± 2 438*	13 187 ± 3 346*
IL-17 100 ng/mL	12 764 ± 4 596	8 194 ± 3 217	22 822 ± 7 220 [†]

CD34⁺ cells were co-cultured with MSCs in the presence or absence of IL-17 (5, 50, 100 ng/mL) at 20%, 12.5% and 3% O₂. At day 5 of co-culture, the non-adherent cells were harvested and assayed for CFCs. Progenitor cell numbers presented were calculated per total number of cells in cultures. CD34⁺ cell fraction seeded (1 × 10⁵ cells) starting at day 0 (T₀) contained 18 400 ± 16 68 of total CFC. The data points represent means ± SEM of five independent experiments. Significant differences (t-test): * p < 0.05 for IL-17-stimulated versus non-stimulated co-cultures for corresponding O₂ level; [†] p < 0.05 for co-cultures at 3% O₂ versus 12.5% O₂.

centrations tested. However, this effect was significant only for co-cultures performed at 3% O₂ and 50 ng/mL IL-17. Concerning CD13 expression, this was also evident only at 3% O₂, but was significant for all IL-17 doses (figure 3B). IL-17 also increased (from 50 to 80%) the percentage of cells expressing CD41⁺, but only in co-cultures at 12.5% O₂ (figure 3C).

No significant variation in the percentage of CD14, CD33 and CD61-expressing cells was observed, whatever the culture conditions (data not shown).

Hypoxia potentiates the stimulating effect of IL-17 on IL-6 secretion by MSCs

Since IL-17 induces the production of IL-6 by the S17 murine bone marrow stromal cell line [34], we examined whether the effect of IL-17 on haematopoietic progenitors in MSC/CD34⁺ co-cultures at different O₂ concentra-

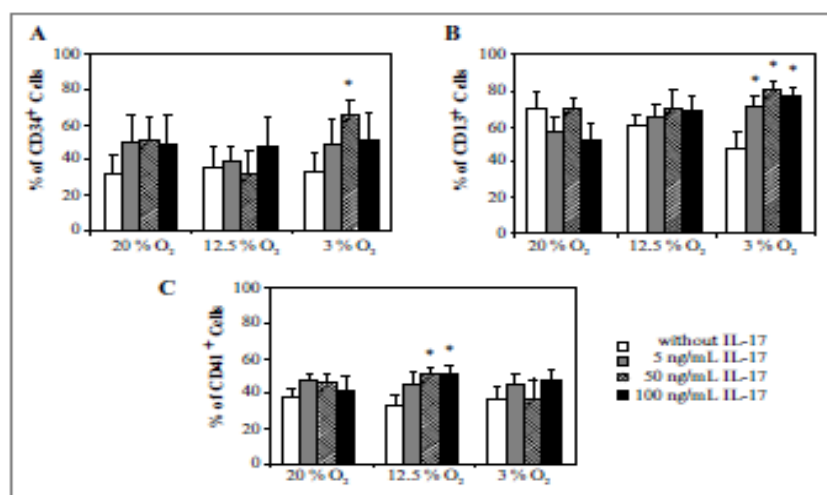


Figure 3

Percentages of cells expressing specific phenotypes in IL-17-stimulated MSC/CD34⁺ co-cultures at different O₂ concentrations. CD34⁺ cells were co-cultured with MSCs in the presence or absence of IL-17 (5, 50, 100 ng/mL) at 20%, 12.5% and 3% O₂. After five days of co-culture, the non-adherent cells were recovered, stained and analyzed by flow cytometry for CD34 (A), CD13 (B), and CD41 (C) expression. Fluorescence-conjugated isotype antibodies were used as control to determine the level of nonspecific binding. The results are presented as the percentages of cells expressing specific phenotype per culture. The data points represent means ± SEM of five independent experiments. Significant differences were obtained using Student's t-test: * p < 0.05 for IL-17-stimulated versus non-stimulated co-cultures with corresponding O₂ levels.

tions could be mediated by IL-6. For this purpose, we measured IL-6 concentrations in supernatants from MSCs and MSC/CD34⁺ after 48 h of culture at 20, 12.5 and 3% O₂, without and with 100 ng/mL IL-17.

Figure 4 shows that IL-17 significantly increased IL-6 secretion both by MSCs and MSC/CD34⁺ co-cultures whatever the O₂ concentration. In addition, comparison of IL-6 release by MSC and MSC/CD34⁺ showed that it was higher in co-cultures whatever the O₂ concentration. A slight increase was detected at 3% O₂ when compared to 12.5 and 20%.

DISCUSSION

We have demonstrated that IL-17 enhances CD34⁺ and total CFC production over five days of MSC/CD34⁺ co-culture at 20% O₂. These results extend those obtained by Fossiez *et al.* [31] with human cord blood CD34⁺ cells/fibroblast co-cultures at 20% O₂. IL-17 increased the number of BFU-E in MSC/CD34⁺ co-cultures. This effect depends on the O₂ concentration reaching its maximum at 3% O₂ (figure 2A). These results extend to human cells, and the low O₂ concentration in our previous *in vivo* and *in vitro* findings with murine bone marrow showing that IL-17 stimulates BFU-E production [29, 30].

Our present results at 20% O₂ seem to confirm both *in vitro* and *in vivo* results showing IL-17-stimulation of granulopoiesis, accompanied by an expansion of CFU-GM [29, 31, 32]. However, by using a system that better mimics the physiological bone marrow environment (MSC, adult CD34⁺ cells and 3% O₂, a concentration present in bone marrow areas where progenitors reside [6]), we could not provide firm evidence that IL-17-enhanced CFU-GM expansion is increased at 3% O₂ since the apparently positive effects of IL-17 on CFU-GM were not statistically significant and their number did not reach the day 0 values (figure 2B). Alternatively,

the enhanced percentage of CD13⁺ cells (when the low O₂ concentration (3%) was associated with IL-17), suggests an increased differentiation into the precursors of a myelo-monocytic lineage. In that respect, the absence of numerical expansion of the CFU-GM compartment could result, rather from their decrease due to differentiation (stimulated by the IL-17) than from the absence of supporting activity of IL-17.

We also explored the effects of IL-17 on the differentiation of CD34⁺ cells after five days in culture by studying several differentiation markers. Interestingly, the percentage of CD13⁺ cells increased only at 3% O₂ and that of CD41⁺ cells only at 12.5% O₂. Our group has already described O₂ concentration-dependent effects on differentiation i.e. on the expression of differentiation markers (CD117, CD34 and CD133; [22], as well as the expression of the gene *cd34* [35]. Also, Mostafa *et al.* [36] demonstrated the regulatory role of O₂ concentrations in megakaryocyte gene expression, differentiation and maturation. Altogether, these results suggest that: *i*) the *in vivo* effects of IL-17 on the differentiation of haematopoietic progenitors is partly driven by the O₂ levels surrounding them in their bone marrow niches; *ii*) the haematopoiesis both in the steady state and under stress conditions depends upon adequate combinations of cytokines and O₂ concentrations in the various bone marrow niches.

MSCs regulate haematopoiesis through their production of growth factors and cytokines such as SCF, IL-6, GM-CSF [5]. It was recently demonstrated that IL-17 is a growth factor for human and murine MSCs [37]. IL-17 triggers IL-6 production in different cell types [38] including the murine stromal cell line S17 [34]. Our study provides the first evidence that IL-17 enhances the secretion of IL-6 by MSCs, and suggests that this constitutive and IL-17-stimulated IL-6 secretion is increased at 3% O₂. Since the bone marrow environment O₂ concentration is regularly low, the increase in chemokine receptor and angiogenic factor expression in MSCs [39, 40] and increased IL-6 production (this paper) at low O₂ concentration is rather a steady state hallmark of the microenvironmental niche (0.1 to 5% O₂). Hence, the effects of IL-17 on BFU-E described here could be considered in the context of a physiological, regulatory network, involving at least the stromal cells as a part of the bone marrow microenvironment.

We found higher concentrations of IL-6 in MSC/CD34⁺ co-cultures than in cultures of MSC alone, whatever the IL-17 and O₂ concentrations. Since it was shown that CD34⁺ cells provide signals that induce IL-6 up-regulation by bone marrow stroma [41, 42], a similar mechanism could explain a higher IL-6 production by MSC/CD34⁺ co-cultures than by MSCs alone. It is also possible that IL-17 induced CD34⁺ cells to produce IL-6, as demonstrated for IL-3 [43]. Although it is possible that the CD13⁺ cells (enhanced at day five of culture) produce the IL-6 upon IL-17 stimulation, it is not likely that they were generated in significant numbers during the 48 h of culture (IL-6 dosage was performed after 48 h).

IL-6 stimulates proliferation and differentiation of numerous haematopoietic cell types including CFU-GM and

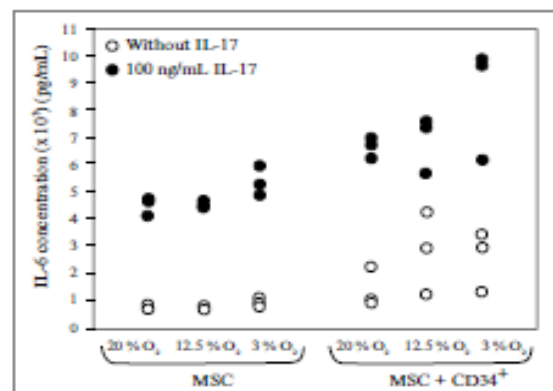


Figure 4

IL-6 release in IL-17-stimulated MSC and MSC/CD34⁺ cultures at different O₂ concentrations. MSCs were cultured, either alone or with CD34⁺ cells, in the absence (○) or presence of 100 ng/mL IL-17 (●) at 20%, 12.5% and 3% O₂. After 48 h, the cell-free supernatants were collected and assayed for IL-6 by ELISA. The values represent means ± SEM of three independent experiments.

BFU-E [44, 45] and participates in supporting haematopoiesis by bone marrow stromal cells [46]. Thus, one can suggest that in our co-cultures, the effect of IL-17 on BFU-E was indirect, due to the induction of IL-6 synthesis by MSCs. Although this mechanism was already supported in our previous reports demonstrating IL-17 stimulation of BFU-E in mice [29, 30], it could not be confirmed by the present, indirect data. Few publications demonstrate that O₂ concentrations similar to physiological ones in bone marrow modify the responses of haematopoietic cells to cytokines when compared to those at 20% O₂ [8, 16, 21, 47]. Our results provide one more demonstration of this fact and strengthen the concept that physiological levels of O₂ (misleadingly called hypoxia) should now be considered as an important environmental factor that significantly influences cytokine activity. Accordingly, *ex vivo* studies exploring the action of cytokines on haematopoietic cells at physiological O₂ concentrations, may improve our knowledge of the *in vivo* regulation of haematopoiesis.

Acknowledgments. This work was supported by grants #CS-2005.05, from the Scientific Council of the French Blood Institute (EFS) and the National Institute for Blood Transfusion (INTS), and #145048 from the Ministry of Science and Technological Development, Republic of Serbia and a grant from la Ligue Nationale Française Contre le Cancer (Comité Aquitaine). AK was supported by a short-term fellowship (bilateral French/Serbian exchange program "Pavle Savic"), MV by a postdoctoral fellowship of the Scientific Council of the French Blood Institute (EFS) and MH by a PhD-training fellowship of the Ministry of Education of the Syrian Government. The authors are thankful to Mrs Elisabeth Volkmann for the help during the manuscript processing and the language editing.

REFERENCES

- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276: 71.
- Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 1998; 176: 57.
- Kaderof S, Deeds LS, Haynesworth SE, et al. Expansion of LTC-ICs and maintenance of p21 and BCL-2 expression in cord blood CD34(+)CD38(-) early progenitors cultured over human MSCs as a feeder layer. *Stem Cells* 2002; 20: 573.
- Li N, Feugier P, Serrurier B, et al. Human mesenchymal stem cells improve *ex vivo* expansion of adult human CD34+ peripheral blood progenitor cells and decrease their allostimulatory capacity. *Exp Hematol* 2007; 35: 507.
- Dazzi F, Ramasamy R, Glemie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev* 2006; 20: 161.
- Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutakis ET. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model. *Biophys J* 2001; 81: 675.
- Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 5431.
- Hermite F, Brunet de la Grange P, Belloc F, Praloran V, Ivanovic Z. Very low O₂ concentration (0.1%) favors G0 return of dividing CD34+ cells. *Stem Cells* 2006; 24: 65.
- Cipolleschi MG, Dello Sbarba P, Olivetto M. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993; 82: 2031.
- Cipolleschi MG, Rovida E, Ivanovic Z, Praloran V, Olivetto M, Dello Sbarba P. The maintenance of hematopoietic progenitors in severe hypoxic cultures, an *in vitro* indicator of marrow-repopulating ability. *Leukemia* 2000; 14: 735.
- Dunet G, Pan Y, Luongo JL, et al. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *J Clin Invest* 2003; 112: 126.
- Ivanovic Z, Bartolozzi B, Bernabei PA, et al. Incubation of murine bone marrow cells in hypoxia ensures the maintenance of marrow-repopulating activity together with the expansion of committed progenitors. *Br J Haematol* 2000; 108: 424.
- Ivanovic Z, Dello Sbarba P, Trimoreau F, Faucher JL, Praloran V. Primitive human HPCs are better maintained and expanded *in vitro* at 1 percent oxygen than at 20 percent. *Transfusion* 2000; 40: 1482.
- Ivanovic Z, Belloc F, Faucher JL, Cipolleschi MG, Praloran V, Dello Sbarba P. Hypoxia maintains and IL3 reduces the pre-CFC potential of dividing CD34+ murine bone marrow cells. *Exp Hematol* 2002; 30: 67.
- Ivanovic Z. Interleukin-3 and *ex vivo* maintenance of hematopoietic stem cells: facts and controversies. *Eur Cytokine Netw* 2004; 15: 6.
- Kovačević-Filipović M, Petaković M, Hermite F, et al. Interleukin-6 (IL-6) and low O₂ concentration (1%) synergize to improve the maintenance of hematopoietic stem cells (pre-CFC). *J Cell Physiol* 2007; 212: 68.
- Bradley TR, Hodgson GS, Rosendaal M. The effect of oxygen tension on hematopoietic and fibroblast cell proliferation *in vitro*. *J Cell Physiol* 1978; 97: 517.
- Pennathur-Das R, Levitt L. Augmentation of *in vitro* human marrow erythropoiesis under physiological oxygen tensions is mediated by monocytes and T lymphocytes. *Blood* 1987; 69: 899.
- Koller MR, Bender JG, Miller WM, Papoutakis ET. Reduced oxygen tension increases hematopoiesis in long-term culture of human stem and progenitor cells from cord blood and bone marrow. *Exp Hematol* 1992; 20: 264.
- Koller MR, Bender JG, Papoutakis ET, Miller WM. Effects of synergistic cytokine combinations, low oxygen, and irradiated stroma on the expansion of human cord blood progenitors. *Blood* 1992; 80: 403.
- Laluppa JA, Papoutakis ET, Miller WM. Oxygen tension alters the effects of cytokines on the megakaryocyte, erythrocyte, and granulocyte lineages. *Exp Hematol* 1998; 26: 835.
- Ivanovic Z, Hermite F, Brunet de la Grange P, et al. Simultaneous maintenance of human cord blood SCID-repopulating cells and expansion of committed progenitors at low O₂ concentration (3%). *Stem Cells* 2004; 22: 716.
- Bettelli E, Kom T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 652.
- Yao Z, Spriggs MK, Derry JM, et al. Molecular characterization of the human interleukin (IL)-17 receptor. *Cytokine* 1997; 9: 794.
- Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang SK. IL-17 cytokine family. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 1265.
- Schwanzberger P, La Russa V, Miller A, et al. IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for *in vivo* evaluation of cytokines. *J Immunol* 1998; 161: 6383.
- Schwanzberger P, Huang W, Ye P, et al. Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis. *J Immunol* 2000; 164: 4783.

28. Forlow SB, Schurr JR, Kolls JK, Paghy GJ, Schwarzenberger PO, Ley K. Increased granulopoiesis through interleukin-17 and granulocyte-colony-stimulating factor in leukocyte adhesion molecule-deficient mice. *Blood* 2000; 98: 3309.
29. Jovčić G, Bugarski D, Petakov M, Stanković J, Stojanović N, Milenković P. Effect of IL-17 on in vitro hematopoietic progenitor cells growth and cytokine release in normal and post-irradiated murine bone marrow. *Growth Factors* 2001; 19: 61.
30. Jovčić G, Bugarski D, Petakov M, et al. *In vivo* effects of interleukin-17 on hematopoietic cells and cytokine release in normal mice. *Cell Prolif* 2004; 37: 401.
31. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 1996; 183: 2593.
32. Schwarzenberger P, Kolls JK. Interleukin 17: an example for gene therapy as a tool to study cytokine mediated regulation of hematopoiesis. *J Cell Biochem Suppl* 2002; 388: 88.
33. Ivanovic Z, Duchez P, Morgan DA, et al. Whole-blood leukodepletion filters as a source of CD 34+ progenitors potentially usable in cell therapy. *Transfusion* 2006; 46: 118.
34. Tan W, Huang W, Gu X, Zhong Q, Liu B, Schwarzenberger P. IL-17/IL17R interaction stimulates granulopoiesis in mice. *Exp Hematol* 2008; 36: 1417.
35. Brunet De La Grange P, Barthe C, Lippert E, et al. Oxygen concentration influences mRNA processing and expression of the *cd34* gene. *J Cell Biochem* 2006; 97: 135.
36. Mostafa SS, Papoutsakis ET, Miller WM. Oxygen tension modulates the expression of cytokine receptors, transcription factors, and lineage-specific markers in cultured human megakaryocytes. *Exp Hematol* 2001; 29: 873.
37. Huang W, La Russa V, Alzoubi A, Schwarzenberger P. Interleukin-17A: a T-cell-derived growth factor for murine and human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2000; 4: 1512.
38. Witowski J, Ksiazek K, Jones A. Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 567.
39. Hung SC, Pochampally RR, Hsu SC, et al. Short-term exposure of multipotent stromal cells to low oxygen increases their expression of CX3CR1 and CXCR4 and their engraftment *in vivo*. *PLOS ONE* 2007; 2 (2:e416).
40. Potier E, Ferrein E, Andriamanalijaona R, et al. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone* 2007; 40: 1078.
41. Gupta P, Blazar BR, Gupta K, Verfaillie CM. Human CD34(+) bone marrow cells regulate stromal production of interleukin-6 and granulocyte colony-stimulating factor and increase the colony-stimulating activity of stroma. *Blood* 1998; 91: 3724.
42. Koller MR, Oxender M, Jensen TC, Goltry KL, Smith AK. Direct contact between CD34+lin- cells and stroma induces a soluble activity that specifically increases primitive hematopoietic cell production. *Exp Hematol* 1999; 27: 734.
43. Schneider E, Ploemacher RE, Navarro S, van Beurden C, Dy M. Characterization of murine hematopoietic progenitor subsets involved in interleukin-3-induced interleukin-6 production. *Blood* 1991; 78: 329.
44. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood* 1989; 74: 1.
45. Ulich TR, del Castillo J, Yin SM, Egrie JC. The erythropoietic effects of interleukin 6 and erythropoietin *in vivo*. *Exp Hematol* 1991; 19: 29.
46. Rodríguez Mdel C, Bernad A, Amcíl M. Interleukin-6 deficiency affects bone marrow stromal precursors, resulting in defective hematopoietic support. *Blood* 2004; 103: 3349.
47. Hevehan DL, Papoutsakis ET, Miller WM. Physiologically significant effects of pH and oxygen tension on granulopoiesis. *Exp Hematol* 2000; 28: 267.

Article 2

Slow-cycling/quiescence balance of hematopoietic stem cells is related to physiological gradient of oxygen

Amélie Guitart, Mohammad Hammoud, Persio Dello Sbarba, Zoran Ivanovic, and Vincent Praloran

Exp Hematol. 2010 Oct;38(10):847-51

Dans cet article « review », nous avons voulu insister sur le rôle primordial, souvent négligé pourtant, de l'oxygène dans la régulation de l'hématopoïèse *in vivo* et *ex vivo*.

Récemment, un nombre croissant de publications met en évidence l'intérêt des BC-O₂, inférieur à 5%, pour la culture de CSH. En réalité, le terme « hypoxie » utilisé pour désigner ces concentrations n'est pas approprié particulièrement puisqu'elles sont proches des concentrations physiologiques du micro-environnement médullaire où se situent les CSH. Nous suggérons ainsi le terme « normoxie *in situ* » pour le remplacer. Au même sens, les concentrations atmosphériques d'O₂ (20 - 21%) représentent « l'hyperoxie ».

Nous estimons par ailleurs que les très faibles niveaux d'O₂ sont capables de contrôler la quiescence de cellules souches hématopoïétiques mais ceci exige des conditions de culture convenables comme certains facteurs de croissance et la présence ou l'absence de sérum. Ces BC-O₂ sont également en mesure de modifier l'effet de cytokines sur les cellules souches hématopoïétiques.

Slow-cycling/quiescence balance of hematopoietic stem cells is related to physiological gradient of oxygen

Amélie V. Guitart^{a,b,c}, Mohammad Hammoud^{d,e}, Persio Dello Sbarba^f, Zoran Ivanovic^d,
and Vincent Praloran^{a,b,c}

^aBordeaux University, Bordeaux, France; ^bCNRS UMR 5164-CIRID, Bordeaux, France; ^cIFR66, Bordeaux, France; ^dAquitaine-Limousin Branch of French Blood Institute, Bordeaux, France; ^eFranche-Comté University, Besançon, France; ^fDepartment of Experimental Pathology and Oncology, University of Firenze, Firenze, Italy

(Received 12 March 2010; revised 12 March 2010; accepted 7 June 2010)

Objective. Regulation of hematopoiesis depends on cytokines, cellular interactions, transcription, and metabolic factors. Among the latter, O₂ has been neglected for a long time. Recently, an increasing number of publications evidenced the regulatory role of physiological low O₂ concentrations (0.1–5%; similar to those in bone marrow) on the *in vitro* behavior of hematopoietic stem cells. This brief review utilizes the article of Eliasson and colleagues in this Journal to summarize the major results and questions about the relationships between O₂ and hematopoiesis.

Materials and Methods. In order to be concise and interesting for readers unfamiliar with this field, we selected only the most significant data that either reinforce or contradict the conclusions of Eliasson et al., but we also provide references of reviews with a more detailed bibliography.

Results. A critical analysis of some key publications provides partial answers to three important questions: is the term *hypoxia* appropriate to describe physiological low O₂ concentrations? Is a very low O₂ level sufficient to control the quiescence/slow cycling balance of hematopoietic stem cells? Is the O₂ concentration able to modify the effect of cytokines on hematopoietic stem cells?

Conclusions. We propose to use *in situ normoxia* instead of the confusing term *hypoxia* when working with normal cells at physiological low O₂ concentrations. We suggest that a very low O₂ concentration is necessary but not sufficient to induce hematopoietic stem cell quiescence. We review some articles showing that O₂ variations modify the effect of cytokines. © 2010 ISEH - Society for Hematology and Stem Cells. Published by Elsevier Inc.

The number of publications related to the effects and mechanisms of action of low (with respect to the 21% of atmosphere) O₂ concentrations on the biology of normal and tumoral stem cells is increasing dramatically year after year. A recent article by Eliasson et al. [1] in this Journal testifies to the increasing interest of hematologists in this subject. Taking advantage of these data, our mini-review proposes to the reader unfamiliar with the issue, a schematic overview of the available knowledge. It also presents questions related to the relationships between cycle/quiescence balance of hematopoietic stem cells (HSC) and variations of O₂ concentrations (0.1–5%) in their environment *in vitro* or *in vivo*.

Offprint requests to: Vincent Praloran, M.D., Ph.D., Bat 1b rdc, Université Bordeaux 2, 146 rue Leo Saignat, Bordeaux 33076, France; E-mail: vincent.praloran@u-bordeaux2.fr

Hypoxia or *in situ* normoxia?

First, we would like to focus the reader's attention on the ambiguity of the word *hypoxia*, which is inappropriately used by biologists to describe any situation, *in vitro* or *in vivo*, in which the O₂ concentration is below the atmosphere level [2–5]. This “mental shortcut” is very confusing because it does not take into account the difference between physiological low O₂ concentrations experienced by normal cells in normal tissues and pathological (acute or chronic) low O₂ concentrations experienced by tumoral (and residual normal) cells in poorly vascularized tumors and by normal cells in ischemic syndromes (vascular pathologies, infarcts, etc.). The articles cited above [2–5] provides strong arguments to convince the reader to use either the term *low O₂ concentration* or *in situ normoxia*, instead of *hypoxia*, when dealing with normal cells cultured/observed at physiological O₂ tissue

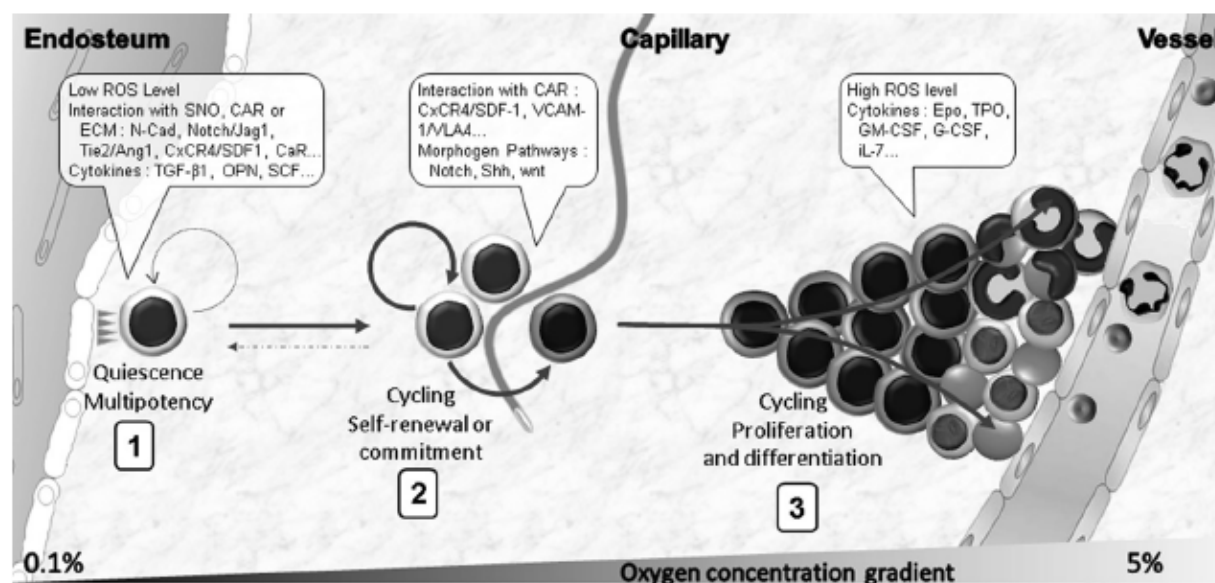


Figure 1. Schematic bone marrow localization of the major hematopoietic compartments. (1) Quiescent stem cell in its endosteal bone marrow niche. (2) Cycling stem cell either self-renew or commit in its putative vascular niche. (3) Progenitors and precursors in active proliferation, differentiation, and maturation. The balances that regulate the hematopoietic stem cells (HSC) maintenance, quiescence, and commitment [shown in (1) and (2)] depend on O_2 concentration and others intrinsic/extrinsic factors (some being mentioned in flags). The arrows thickness represents self-renewal (\odot), quiescence/cycling reversibility (\longleftrightarrow), commitment and proliferation (\rightarrow). Ang-1 = angiopoietin 1; CAR = CXCL12 abundant reticular; CXCL12 = CXC-type chemokine ligand 12; CaR = calcium-sensing receptor; CXCR4 = CXC-type chemokine receptor 4; ECM = extracellular matrix; Epo = erythropoietin; G-CSF = granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF = granulomonocytic colony-stimulating factor; IL-7 = interleukin-7; N-Cad = N-cadherin; OPN = osteopontin; ROS = reactive oxygen species; SCF = stem cell factor; SDF-1 = stromal cell-derived factor 1; Shh = Sonic Hedgehog; SNO = spindle-shaped N-cadherin⁺ CD45⁺ osteoblastic; TGF- β 1 = transforming growth factor- β 1; Tie-2 = tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domain-2; TPO = thrombopoietin; VCAM = vascular cell adhesion molecule; VLA = very late antigen.

levels (5–0.1% for bone marrow (BM) (Fig. 1). On the other hand, neoplastic tissue hypoxia (i.e., an O_2 level lower than the in situ O_2 concentration of the corresponding normal tissue) induces pathological consequences relevant to cancer progression [6,7].

Maintenance of HSC depends on O_2 concentration

Going back to our major objective, the relationships between HSC and oxygenation, we refer again to the article by Eliasson et al. [1], which includes interesting results: the transcript modifications (proteins not studied) of the cyclin-dependent kinase inhibitors p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, and p57^{KIP2} in murine HSC cultured at 1% O_2 ; a physiological concentration in BM; the role of the O_2 sensor hypoxia-inducible factor-1 α in these modifications and in the proliferation and graft capacity of murine LSK cells, which are highly enriched in HSC. They extend previous results with murine and human total Lin[−] and CD34⁺ cells (from BM or cord blood (Fig. 2). Schematically, these studies showed better maintenance or even an expansion of HSC at 1% and 1.5% O_2 cultures (4–14 days), as well as a slowing down of their proliferation when compared to cultures at 20% O_2 [8–14]. Indeed, Danet et al. [13], showed that culturing human BM CD34⁺ cells for 4 days at 1.5% O_2 maintained HSC better than at 20% O_2 , as evidenced by their better capacity to

engraft nonobese diabetic severe combined immune-deficient (NOD-SCID) mice with long-term SCID repopulating cells (SRC). This confirmed, on human cells, the phenomenon already shown for murine BM cells [8–10], which, if cultured for 5–14 days at 1% O_2 , exhibited a better marrow-repopulating ability than those cultured at 20% O_2 . Using human CD34⁺ cord blood cells [15], we evidenced that SRCs were better maintained at 3% than at 20% O_2 after 7 days of liquid culture, together with an equivalent expansion of committed progenitors (colony-forming cells [CFCs]). Koller et al. [16] showed a longer and more intensive production of hematopoietic cells in long-term cultures at 5% O_2 with a stromal layer that better mimics in vivo BM microenvironment. This better maintenance of HSC in coculture at low O_2 concentrations (1.5–5%) was confirmed in cocultures with stromal cells by using SRC and pre-CFC assay [17].

In contrast with our data and those of Danet et al. [13], Eliasson et al. [1] did not find significant engraftment differences between cells cultured at 1% and 20% O_2 . This discrepancy could be due to the fact that they injected only one group of mice with a high number of cells, whereas Danet et al. and our group used limiting dilution to reveal differences in HSC frequency between groups. This equal/better in vitro maintenance of HSC at 3% and lower O_2 concentrations led us, Danet et al., and later Eliasson et al., to explore the relationships

	<i>In vitro</i>				<i>In vivo</i>		<i>Ref</i>
	LT-SRC	MRA, LTC-IC	CFC	Precursors	Localization	Functional properties	
20% O ₂						Supra physiological Absent in vivo	[2,4, reviewed in 5]
3 to 1.5 % O ₂					Juxta-vascular area (see 3 of figure 1)	Quiescence : - Slow cycling : ? Self-Renewal : + Proliferation : +++ Differentiation : +++ Maturation : +++	[13,15,16]
1% O ₂					Parasinusoidal Vascular niche (see 2 of figure 1)	Quiescence : - Slow cycling : + Self-Renewal : + Proliferation : +/- Differentiation : + Maturation : ?	[11,12,14, 27]
0.1% O ₂					Bone Marrow Endosteal niche (see 1 of figure 1)	Quiescence : ++ Slow cycling : ? Self-Renewal : - Proliferation : - Differentiation : ? Maturation : ?	[18]

Figure 2. An O₂-dependent representation of hematopoiesis: results and hypothesis. The O₂ concentrations mentioned in the left column were used for in vitro experiments performed by us and others. They are probably close to those present in the different functional bone marrow areas where stem cells, progenitors, and precursors reside. The arrows thickness represents the intensity of self-renewal (○), commitment, and proliferation (↗) and terminal differentiation/maturation (→). CFC = colony-forming cell; LT-SRC = long-term severe combined immune-deficient–repopulating cell; MRA = marrow-repopulating ability; LTC-IC = long-term culture-initiating cell.

between decreasing O₂ concentrations, proliferation/cell-cycle arrest and maintenance of HSC activity in CD34⁺ and LSK cell populations.

Balance between slow-cycling and quiescence of HSC: a role for O₂ concentration

As for CD34⁺ cells cultured at 1.5% or lower O₂ concentrations [11,13], the proliferation of LSK cells decreased after 4 days of culture at 1% O₂. Furthermore, their percentage in G₀ increased, a result different from that of Danet et al. [13], who found an increase of G₁ but not G₀. Some years ago, we showed that murine pre-CFC endowed with culture-repopulating ability (an in vitro equivalent of marrow-repopulating ability) still proliferated in 1% O₂ primary cultures, as the addition of 5-fluorouracil (5-FU) during the last 24 hours abolished their capacity to produce CFC in secondary cultures at 20% O₂ [9]. The second evidence that HSC cycle slowly at 1% O₂ was provided by sorting and replating murine CD34⁺ cells, according to their number

of divisions after 8 days of primary culture at 1% and 20% O₂. CD34⁺ cells that divided once or more at 1% O₂ generated many more progenitors in the secondary culture than undivided cells, and all cells issued from 20% O₂ primary culture [12]. We suggest that HSC cycle slowly at 1% O₂, a concentration probably physiological in BM areas where HSC and primitive progenitors proliferate to either self-renew or differentiate, depending on their microenvironment. We showed later that a 3-day culture of human CB CD34⁺ cells at 0.1% O₂ increased the absolute number of cells in G₀ by both blocking cell-cycle entry of cells already in G₀ and inducing cycling cells to enter quiescence after completing division [18]. In this work, CD34⁺ cells incubated for 3 days at 0.1% or 20% O₂ maintained similar numbers of SRCs. However, it remains unknown if these SRCs (a minor subset among CD34⁺ cells) are quiescent or cycling because we did not test their sensitivity to 5-FU. Very recently, we used the murine nonleukemic FDCP-mix cell line to investigate these questions and to explore some of the cell-cycle

molecules involved in the quiescence of cells with self-renewal capacity [19]. After 3 days of culture at 0.1% O₂, most FDCP-mix cells were differentiated and in G₀. However, the minority of self-renewing cells that form colonies and repopulate secondary cultures after replating at 20% O₂ were still cycling slowly (as evidenced by their sensitivity to 5-FU).

Altogether, results summarized here challenge, in part, the hypothesis of Eliasson et al. [1] and others that hypoxia sustains quiescence of HSC. Indeed, they demonstrated that hypoxia increases LSK cell quiescence, as we did for CD34⁺ cells. In addition, they showed an upregulation of cyclin-dependent kinase inhibitors in the whole population of LSK cells (still heterogeneous for their HSC potential), but they did not bring direct evidence that HSC are quiescent. Only a short-term 5-FU incubation followed by a functional stem cell assay (such as marrow-repopulating ability, culture-repopulating ability, or long-term culture-initiating assay) would answer this question. Furthermore, in vivo results suggesting that HSC are quiescent in their endosteal niches, where O₂ tension is the lowest in vivo [2,4,20–23], should also be reconsidered with respect to the term *HSC*. The use of this term should be restricted to cells shown functionally to exhibit stem cell properties and should not be applied instead to immunophenotypically defined cell populations that are functionally still heterogeneous. If these elementary notions are respected, the ability of slow proliferation at very low O₂ concentrations (<1%) appears as a hallmark of stem cells, including cancer stem cells [24]. The recent review of Li and Clevers [25] brings an interesting contribution to this debate about the quiescence or slow-cycling state of adult stem cells because they provide arguments evidencing a role of environment in this reversible transition. We suggest that O₂ can be the other partner of a synergistic control of HSC cycling in the endosteal niche. We hypothesized this “anaerobic,” low-energy proliferation to be, in fact, a key of self-renewal, as low availability of energy may prevent cells from commitment and subsequent differentiation, which require much more energy than simple cell division uncoupled with differentiation [5].

O₂ concentration variations modulate the effects of cytokines

We suggest that various other environmental factors, such as concentrations and combinations of activating and/or inhibitory cytokines, chemokines, cellular, and stromal interactions, are required in combination with O₂ to modulate the quiescence/proliferation and self-renewal/commitment balances that characterize hematopoietic, as well as most adult, stem cells (Fig. 1). Concerning the role of interleukin (IL)-3 in these processes, Eliasson et al. claim that this cytokine negatively affects HSC expansion. We have provided the reader with references and summary of two articles and one review related to this issue [12,26,27]. We showed that a low

concentration of IL-3 (0.5 ng/mL vs 5 and 50 ng/mL in serum-free medium) maintained much higher stem cell activity in primary culture at 3% O₂ as revealed by production of CFCs during a 28-day secondary culture, as well as by an in vivo transplantation to nonobese diabetic severe combined immune-deficient mice (3.5-fold more SRC) [15] and that the addition of IL-3 (10 ng/mL, serum-supplemented medium) to 8-day primary cultures of unselected murine BM cells at either 1% or 20% O₂ had a negative effect on the maintenance of pre-CFC because their CFC production during the secondary cultures was lower than in primary cultures (20% and 1% O₂) without IL-3 [12]. A number of other published results appear contradictory, probably because the effects of IL-3 (as well as of many other cytokines) depend on its concentration, combination with other factors, presence or absence of serum, and hierarchical level of the target cell population analyzed [26]. The beneficial role of IL-6 in the maintenance of pre-CFC during culture of murine steady-state BM Lin[−] cells at low O₂ concentration was evidenced by Kovacevic-Filipovic et al. [27], also showing that the HSC-enriched Lin[−] cells cycled more slowly and maintained a better capacity to repopulate secondary cultures at 1% with respect to 20% O₂. Despite the presence of IL-6 in their cytokine cocktail, Eliasson et al. [1] did not confirm (with a transplantation assay) better maintenance of HSC in cultures at 1% O₂. The difference could be due to a shorter duration of primary culture (4 days in Eliasson et al. vs 10 days in Kovacevic-Filipovic et al.) or to the use of BM cells obtained out of steady-state conditions, at day 4 of the regeneration phase that follows 5-FU treatment.

In conclusion, we hope that this brief summary of results related to the role of low O₂ concentrations in the regulation of hematopoiesis (Fig. 2) will attract the reader's attention to this field. We also would hope that one keeps in mind that the term *hypoxia*, quite constantly used in the literature to define O₂ concentrations lower than that of normal atmosphere, should be avoided in the context of experiments dealing with the role of physiological weak oxygenation [28].

Acknowledgments

The original works (cited in references) of the authors of this review were funded by Research and Development funds of Aquitaine-Limousin Branch of French Blood Institute (Bordeaux, France), the French Ligue contre le cancer (Paris, France), Laurette Fugain association (Paris, France), the French ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie (Paris, France), Istituto Toscano Tumori (ITT; Firenze, Italy), Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC; Milano, Italy; contract no. IG5220), Associazione Italiana per la lotta contro le Leucemie e i Linfomi (AIL, sezione di Prato; Rome, Italy), Fondazione Cassa di Risparmio di Volterra (Volterra, Italy). V.P. and P.D.S. are MC members of the HypoxiaNet project (Action TD0901) of the European Cost Agency (Brussels, Belgium).

Conflict of Interest Disclosure

No financial interest/relationships with financial interest relating to the topic of this article have been declared.

References

- Eliasson P, Rehn M, Hammar P, et al. Hypoxia mediates low cell-cycle activity and increases the proportion of long-term-reconstituting hematopoietic stem cells during in vitro culture. *Exp Hematol*. 2010;38:301–310.
- Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J*. 2001;81:685–696.
- Hemphill JC 3rd, Smith WS, Sonne DC, Morabito D, Manley GT. Relationship between brain tissue oxygen tension and CT perfusion: feasibility and initial results. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2005;26:1095–1100.
- Tondevo E, Eriksen J, Jansen E. Observations on long bone medullary pressures in relation to arterial PO₂, PCO₂ and pH in the anaesthetized dog. *Acta Orthop Scand*. 1979;50:645–651.
- Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: the stem cell paradigm. *J Cell Physiol*. 2009;219:271–275.
- Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*. 2010;29:625–634.
- Chiche J, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Tumor hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J Cell Mol Med*. 2010;14:771–794.
- Cipolleschi MG, Dello Sbarba P, Olivetto M. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood*. 1993;82:2031–2037.
- Cipolleschi MG, Rovida E, Ivanovic Z, Praloran V, Olivetto M, Dello Sbarba P. The expansion of murine bone marrow cells preincubated in hypoxia as an in vitro indicator of their marrow-repopulating ability. *Leukemia*. 2000;14:735–739.
- Ivanovic Z, Bartolozzi B, Bernabei PA, et al. Incubation of murine bone marrow cells in hypoxia ensures the maintenance of marrow-repopulating ability together with the expansion of committed progenitors. *Br J Haematol*. 2000;108:424–429.
- Ivanovic Z, Dello Sbarba P, Trimoreau F, Faucher JL, Praloran V. Primitive human HPCs are better maintained and expanded in vitro at 1 percent oxygen than at 20 percent. *Transfusion*. 2000;40:1482–1488.
- Ivanovic Z, Belloc F, Faucher JL, Cipolleschi MG, Praloran V, Dello Sbarba P. Hypoxia maintains and interleukin-3 reduces the pre-colony-forming cell potential of dividing CD34(+) murine bone marrow cells. *Exp Hematol*. 2002;30:67–73.
- Danet GH, Pan Y, Luongo JL, Bonnet DA, Simon MC. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *J Clin Invest*. 2003;112:126–135.
- Shima H, Takubo K, Iwasaki H, et al. Reconstitution activity of hypoxic cultured human cord blood CD34-positive cells in NOG mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;378:467–472.
- Ivanovic Z, Hermitte F, Brunet de la Grange P, et al. Simultaneous maintenance of human cord blood SCID-repopulating cells and expansion of committed progenitors at low O₂ concentration (3%). *Stem Cells*. 2004;22:716–724.
- Koller MR, Bender JG, Papoutsakis ET, Miller WM. Beneficial effects of reduced oxygen tension and perfusion in long-term hematopoietic cultures. *Ann N Y Acad Sci*. 1992;665:105–116.
- Hammoud M, Vlaski M, Chavaleyre J, et al. The impact of low O₂ concentrations on the expansion of haematopoietic stem and progenitor cells in co-culture with the mesenchymal cells. International Conference on Biology and Clinical Applications of Cord Blood Cells. Mandelieu, France; October 16–19, 2008.
- Hermitte F, Brunet de la Grange P, Belloc F, Praloran V, Ivanovic Z. Very low O₂ concentration (0.1%) favors G0 return of dividing CD34+ cells. *Stem Cells*. 2006;24:65–73.
- Guitart A, Debeissat C, Hermitte F, et al. Effects of hypoxia (0.1% O₂) on the balance between quiescence/proliferation and self-renewal/differentiation on the murine multipotent hematopoietic FDCEP-mix cell line. International Society for Stem Cell Research, 7th Annual Meeting Abstract no. 117. Barcelona, Spain; July 8–11, 2009.
- Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:93–106.
- Arai F, Suda T. Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1106:41–53.
- Pamar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:5431–5436.
- Wilson A, Laurenti E, Oser G, et al. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*. 2008;135:1118–1129.
- Giuntoli S, Rovida E, Gozzini A, et al. Severe hypoxia defines heterogeneity and selects highly immature progenitors within clonal erythroleukemia cells. *Stem Cells*. 2007;25:1119–1125.
- Li L, Clevers H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science*. 2007;327:542–545.
- Ivanovic Z. Interleukin-3 and ex vivo maintenance of hematopoietic stem cells: facts and controversies. *Eur Cytokine Netw*. 2004;15:6–13.
- Kovacevic-Filipovic M, Petakov M, Hermitte F, et al. Interleukin-6 (IL-6) and low O₂ concentration (1%) synergize to improve the maintenance of hematopoietic stem cells (pre-CFC). *J Cell Physiol*. 2007;212:68–75.
- Ivanovic Z. Physiological, ex vivo cell oxygenation is necessary for a true insight into cytokine biology. *Eur Cytokine Netw*. 2009;20:7–9.

Communications aux colloques

Communications orales :

Congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine (SFTS) - Lyon 2011

Forum des Jeunes Chercheurs organisé par l'école doctorale – Dijon 2011

Communications affichées :

Congrès de la société européenne d'Hématologie ESH – Cannes 2008

Congrès de la Société Française d'Hématologie SFH – Paris 2009

Congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine (SFTS) - Strasbourg 2009

Congrès Autour de la Cellule Souche – Bordeaux 2010

Forum des Jeunes Chercheurs organisé par l'école doctorale – Dijon 2009

Communication affichée au congrès de la Société Américaine d'Hématologie SAH- Nouvelles-Orléans 2009

Publications

1• Hammoud M, Vlaski M, Duchez P, Chevaleyre J, Lafarge X, Boiron JM, Praloran V, de la Grange PB, Ivanovic Z. Combination of low O(2) concentration and mesenchymal stromal cells during culture of cord blood CD34(+) cells improves the maintenance and proliferative capacity of hematopoietic stem cells. J Cell Physiol. 2012 Jun;227(6):2750-8.

2• Guitart AV, Hammoud M, Dello Sbarba P, Ivanovic Z, Praloran V. Slow-cycling/quiescence balance of hematopoietic stem cells is related to physiological gradient of oxygen. Exp Hematol. 2010 Oct;38(10):847-51. Epub 2010 Jun 12. Review.

3• Krstić A, Vlaski M, Hammoud M, Chevaleyre J, Duchez P, Jovčić G, Bugarski D, Milenković P, Bourin P, Boiron JM, Praloran V, Ivanović Z. Low O2 concentrations enhance the positive effect of IL-17 on the maintenance of erythroid progenitors during co-culture of CD34+ and mesenchymal stem cells. Eur Cytokine Netw. 2009 Mar;20(1):10-6.

RESUME

Effet de l'association des Basses Concentrations d'O₂ (BC-O₂) et des Cellules Stromales Mésenchymateuses (CSM) sur l'Expansion *ex vivo* des Cellules Souches et Progénitrices Hématopoïétiques (CSH/PH)

Afin d'améliorer au mieux le greffon placentaire, nous suggérons de réaliser sa culture d'expansion *ex vivo* dans des conditions proches de l'environnement des cellules souches hématopoïétiques *in vivo*. Ainsi, nous proposons que la co-culture de cellules CD34⁺ placentaires avec des cellules stromales mésenchymateuses (CSM) à basses concentrations d'O₂ (BC-O₂) pourrait contribuer à équilibrer les processus d'autorenouvellement et de différenciation afin d'obtenir un greffon optimisé. Sur le plan fonctionnel, nos résultats confirment un effet bénéfique de notre modèle expérimental par rapport aux conditions où figure la culture simple et/ou l'oxygénation atmosphérique (20%) en termes du maintien de progéniteurs (PH) primitifs (pré-CFC) et de cellules souches *Scid-Repopulating Cells* (SRC). Sur le plan quantitatif, l'amplification des cellules CD34⁺ et des PH engagés, bien qu'elle soit en retrait dans nos conditions de référence par rapport à la condition de 20% d'O₂, elle demeure néanmoins importante. Par ailleurs, le rôle de l'IL-3 exogène se montre crucial à BC-O₂ notamment en co-culture à 1,5% d'O₂ où elle permet non seulement de préserver mais aussi d'amplifier le taux de SRC par rapport au témoin de cellules CD34⁺ de J0.

Enfin, l'étude de la sécrétion des facteurs solubles et l'expression des marqueurs phénotypiques sur les CSM montre que l'IL-6, le VEGF et l'IL-8 sont plus sécrétés et les CD146, CD49a, CD54, CD200 et CD105 sont plus exprimés après incubation à 5% d'O₂. Cependant, l'implication réelle de ces facteurs et antigènes dans l'effet paracrine et/ou de contact cellulaire direct menés par les CSM dans notre protocole requiert de nouvelles investigations.

ABSTRACT

Effect of the combination of low O₂ concentration (LO₂-C) and mesenchymal stromal cells (MSC) on ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells (HSC/PH)

To optimize at best the hematopoietic engraftment, we suggest in this work to improve the ex vivo expansion conditions by moving them closer to physiology. Indeed, we propose to culture placental CD34⁺ (HSC/PH) on MSC layer in combination with LO₂-C to ensure the amplification of HP together with the maintenance/expansion of HSC.

Compared to the single culture and/or atmospheric oxygenation, our experimental model allows a better maintenance of primitive HP (Pre-CFC) and HSC together with a quite good amplification of total cells, CD34⁺ cells and committed HP despite of lower than control condition. Moreover, exogenous IL-3 shows crucial effect in co-culture at LO₂-C (1.5% O₂) since its addition better preserves and even increases the number of HSC compared to the CD34⁺ cells control from D0.

We then studied the secretion of soluble factors in culture supernatants and found that IL-6, VEGF and IL-8 were present in larger quantities at LO₂-C in both co-culture and MSC culture. Finally, the CD146, CD49a, CD54, CD200 and CD105 membrane antigens appear to be up-regulated in MSCs when incubated at 5% O₂. However, the involvement of these factors and antigens in paracrine effect and/or direct cell to cell contact mechanisms at LO₂-C requires further investigations.

In conclusion, the combination of LO₂-C and MSC would be promising in the field of HSC/PH grafts expansion to achieve its main objective of reducing the post-transplant cytopenia period together with maintaining the long-term graft potential.