

Université
de Liège



Faculté de Médecine
Département des Sciences Cliniques
Hématologie Biologique
GIGA-Research

Etude des propriétés héματο-supportives in vitro des cellules souches mésenchymateuses

Thèse présentée par
Alexandra Briquet

En vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Promoteur: Dr. A. Gothot
Co-promoteur: Dr. Y. Beguin

Année académique 2009-2010

Docteur André Gothot, je vous remercie tout spécialement pour l'excellent suivi de mon travail. Merci pour vos nombreux et précieux conseils. Je vous remercie d'avoir toujours trouvé du temps pour m'aider et relire mes écrits malgré vos nombreuses obligations. Merci également de m'avoir donné l'opportunité de présenter mes travaux lors de différents congrès.

Docteur Yves Beguin, je tiens à vous exprimer ma gratitude de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire d'Hématologie. J'ai beaucoup aimé y travailler dans l'ambiance agréable et simple qui y règne.

Docteur Nicole Schaaf-Lafontaine, je voulais vous remercier de m'avoir accueillie dans votre laboratoire clinique de cytométrie et pour vos judicieux conseils. Dominique, Jeanine, Jean-Claude, Michaël, Michel et Yvonne, merci de m'avoir réservé votre meilleur accueil.

Marie, ton amitié et ton soutien furent pour moi d'un grand réconfort. Je n'oublierai jamais les nombreuses conversations que nous avons partagées. Merci aux souris.

Jacques, tu es toujours présent pour donner tes précieux conseils. Merci pour ta disponibilité, même après avoir quitté le laboratoire de recherche, et pour les bons moments passés ensemble.

Sophie, merci pour ton aide précieuse et ton savoir-faire. Travailler avec toi est réellement agréable.

France, je me souviendrai particulièrement des différents congrès auxquels nous avons participé ensemble: Cannes, Athènes... Merci pour les agréables moments.

Catherine, Céline, Coline, Emilie, Muriel, Olivier, Pascale, Raafat, Stéphanie C., Stéphanie H., merci pour l'ambiance conviviale que vous avez fait régner au sein du laboratoire.

Marie Dolhet et Sandrine Bekaert, j'ai vraiment apprécié de vous initier aux différentes techniques du laboratoire. Vous aider dans la réalisation de votre mémoire a été un réel plaisir. Merci d'avoir été de si bonnes élèves.

Christophe, maman, papa, Corentin, Maryline et Gauthier, merci d'être là.

Ces travaux ont été réalisés grâce au soutien du Fonds National de la Recherche Scientifique et de la Fondation Léon Frédéricq. Je remercie ces organismes ainsi que les personnes qui m'ont aidée à récolter ces financements.

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION	1
1.1. Les cellules souches.....	1
1.1.1. Définition, classification	1
1.2. Les cellules souches hématopoïétiques (HSC).....	1
1.2.1. Hématopoïèse	1
1.2.2. Sources des HSC	5
1.2.3. Identification expérimentale des HSC	7
1.2.4. Expansion ex vivo des HSC, culture à long terme	9
1.2.5. Expansion des SRC	11
1.3. Les cellules souches mésenchymateuses (MSC).....	12
1.3.1. Différentes techniques de sélection des MSC.....	14
1.3.2. MSC et durée de culture.....	19
1.3.3. Homing des MSC.....	19
1.3.4. Sécrétion de cytokines par MSC	20
1.3.4.1. Interleukine 6 (IL-6).....	21
1.3.4.2. Interleukine 8 (IL-8).....	21
1.4. Les médiateurs d'adhésion et de signalisation intercellulaire potentiellement impliqués dans les interactions HSC/MSC	22
1.4.1. L'adhésion médiée par VCAM-1/VLA4.....	22
1.4.2. La voie de signalisation Hedgehog	22
1.4.2.1. La voie de signalisation Hedgehog et l'hématopoïèse.....	23
1.4.3. Les protéines de la morphogenèse osseuse (bone morphogenetic proteins, BMP)	24
1.4.3.1. BMP et l'hématopoïèse	25
1.4.4. La voie de signalisation Notch.....	25
1.4.4.1. La voie de signalisation Notch et l'hématopoïèse	26
1.4.5. La voie de signalisation Wnt.....	27
1.4.5.1. La voie de signalisation Wnt et l'hématopoïèse	28
1.5. But du travail.....	29
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	31
2.1. Les cellules	31
2.1.1. Les cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon ombilical (cellules CD34+)..	31
2.1.1.1. Séparation des cellules mononucléées sur gradient de densité	31
2.1.1.2. Marquage magnétique des cellules mononucléées	31
2.1.1.3. Séparation magnétique des cellules CD34+	32
2.1.1.4. Evaluation de la pureté des cellules CD34+.....	32
2.1.2. Les cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse ou MSC	33
2.1.3. Congélation des cellules.....	33
2.1.4. Décongélation des cellules.....	33
2.2. Etude de la capacité de différenciation des MSC.....	34

2.2.1.	Différenciation ostéocytaire	34
2.2.2.	Différenciation adipocytaire	34
2.2.3.	Différenciation chondrocytaire.....	34
2.3.	CFU-F (Colony forming unit-fibroblast)	35
2.4.	Analyse par cytométrie en flux des préparations de MSC.....	35
2.5.	Etude de la sécrétion de cytokines-chimiokines par les MSC.....	35
2.5.1.	Conditionnement du milieu de culture	35
2.5.2.	RayBio® human cytokine antibody arrays	36
2.5.3.	Cytometric Bead arrays	36
2.6.	Etude de l'expression de Jagged-1	36
2.6.1.	RT-PCR	36
2.6.2.	Western blot.....	37
2.6.2.1.	Migration sur gel d'acrylamide (PAGE)	37
2.6.2.2.	Transfert sur membrane de nitrocellulose.....	37
2.6.2.3.	Immunoblot.....	37
2.6.2.4.	Révélation.....	38
2.7.	Culture à long terme.....	38
2.7.1.	Principe.....	38
2.7.2.	Enumération des progéniteurs clonogènes en méthycellulose.....	39
2.7.3.	Analyse phénotypique des cellules amplifiées	39
2.7.3.1.	Phénotype général.....	39
2.7.3.2.	Phénotype spécifique des cellules B.....	40
2.7.4.	Expression de gènes spécifiques des cellules B.....	40
2.8.	Greffe de cellules souches hématopoïétiques aux souris NOD/SCID	41
2.9.	Distribution tissulaire des MSC après injection aux souris NOD/SCID	42
2.10.	Inhibiteurs et anticorps bloquants utilisés	43
2.11.	Statistiques	44
3.	RÉSULTATS: PREMIÈRE PARTIE: ETUDE DE L'INFLUENCE DU NOMBRE DE PASSAGES DES MSC SUR LEUR ACTIVITÉ PRO-HÉMATOPOÏÉTIQUE	45
3.1.	Expansion et caractérisation des préparations de MSC	45
3.2.	Profil sécrétoire	48
3.3.	Capacité pro-hématopoïétique des MSC dans les cultures à long terme	50
3.4.	Maintien des SRC en co-culture avec des MSC	54
3.5.	Distribution tissulaire des MSC après injection intraveineuse chez la souris NOD/SCID57	57
3.6.	Discussion de la première partie	58

4. RÉSULTATS: DEUXIÈME PARTIE: ETUDE DE LA RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ PRO-HÉMATOPOÏÉTIQUE DES MSC	61
4.1. Effet direct des anticorps bloquants ou des inhibiteurs sur les MSC	61
4.1.1. Phénotype.....	61
4.1.2. Différenciation.....	62
4.1.2.1. Différenciation adipocytaire	62
4.1.2.2. Différenciation chondrocytaire	62
4.1.2.3. Différenciation ostéocytaire	63
4.1.3. CFU-F	63
4.1.4. Sécrétion d'IL-6 et d'IL-8	63
4.2. Expression de Jagged 1 par les MSC.....	65
4.3. Effet des anticorps bloquants ou des inhibiteurs sur l'activité pro-hématopoïétique des MSC dans les cultures à long terme.....	66
4.4. Effet des anticorps bloquants ou des inhibiteurs sur le maintien des SRC en culture ex vivo	69
4.5. Discussion de la deuxième partie.....	71
5. DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	75
BIBLIOGRAPHIE	81

ABREVIATIONS

ANNEXES

Introduction

1. Introduction

1.1. Les cellules souches

1.1.1. Définition, classification

Une cellule souche est définie selon deux caractéristiques fonctionnelles principales:

- la capacité de pouvoir suivre un processus **d'autorenouvellement** au cours duquel les cellules souches donnent naissance à des cellules filles identiques à la cellule génitrice,
- la capacité de **se différencier** en de multiples types cellulaires.

Il existe une hiérarchie pour classer les différents types de cellules souches:

- Les cellules souches **totipotentes** sont uniquement présentes aux premiers stades de la blastula et sont capables de générer soit du trophoblaste, soit du tissu embryonnaire. Elles sont les seules à permettre le développement d'un individu complet.
- Les cellules souches **pluripotentes** sont capables de générer la plupart, voire tous les tissus du corps adulte, mais ne peuvent pas donner naissance aux tissus extra-embryonnaires tels que le placenta.
- Les cellules souches **multipotentes** sont capables de générer plusieurs types de cellules différenciées issues d'un même tissu.
- Les cellules souches **unipotentes** ne sont capables de générer qu'un seul type de cellules différenciées. On les appelle également progéniteurs. Elles sont déjà engagées dans une voie de différenciation.

1.2. Les cellules souches hématopoïétiques (HSC)

1.2.1. Hématopoïèse

L'hématopoïèse est la fonction par laquelle l'organisme produit et renouvelle les éléments figurés du sang, c'est-à-dire les hématies, les polynucléaires, les monocytes, les lymphocytes et les plaquettes. Toutes les cellules du sang dérivent d'un type cellulaire appelé cellule souche hématopoïétique (HSC - «hematopoietic stem cells»). Chez l'Homme, l'hématopoïèse commence dans le sac vitellin de l'embryon au cours des premières semaines du développement. Là, les cellules souches du sac vitellin se différencient en cellules érythroïdes primitives qui contiennent de l'hémoglobine embryonnaire. Au troisième mois de la grossesse, les HSC migrent du sac vitellin vers le foie fœtal, puis vers la rate; ces deux organes ont des rôles majeurs dans l'hématopoïèse du troisième au septième mois de la gestation. Par la suite, la différenciation des HSC a lieu dans la moelle osseuse qui

Introduction

devient le site majeur de l'hématopoïèse. Les HSC sont très peu nombreuses; elles ne représentent qu'un très faible pourcentage des cellules médullaires (de 0,01 à 0,05 %) (Dexter & Spooncer, 1987). L'étude des HSC est difficile, en raison de leur rareté, mais aussi parce qu'elles sont difficiles à cultiver *in vitro*. Il en résulte que l'on dispose de peu d'informations sur la façon dont leur prolifération et leur différenciation sont régulées. En raison de leur capacité à s'autorenouveler, les HSC sont maintenues à des niveaux stables tout au long de la vie adulte. Cependant, lorsqu'il y a une demande accrue de cellules sanguines, les HSC montrent une énorme capacité de prolifération.

Sous l'influence de facteurs stimulants, une **cellule souche** va s'engager dans la différenciation d'une lignée cellulaire. Elle devient alors un **progéniteur**. Après plusieurs divisions, les progéniteurs acquièrent les caractéristiques fonctionnelles d'une seule lignée. On aboutit alors aux **précurseurs**, cellules identifiables morphologiquement sur un prélèvement de moelle osseuse. Ces précurseurs perdent leur capacité de prolifération et arrivent à maturité. Cette maturation aboutit aux **cellules terminales** fonctionnelles qui passent dans le sang. L'hématopoïèse comporte donc 4 compartiments: les cellules souches multipotentes, les progéniteurs, les précurseurs et les cellules matures (Figure 1).

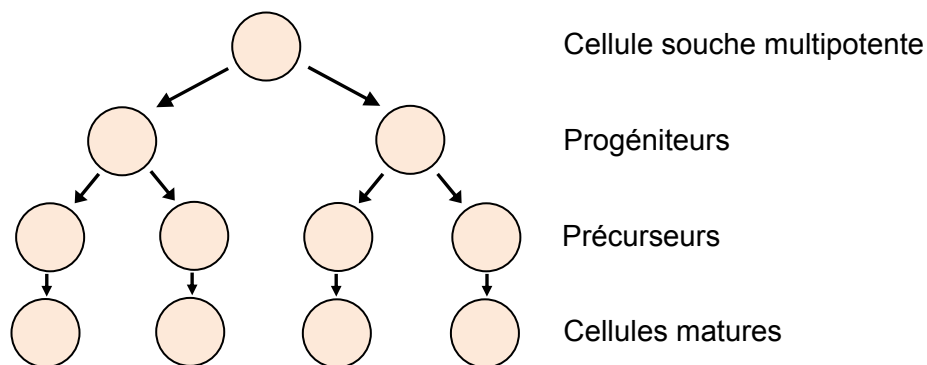


Figure 1: Représentation schématique de la moelle hématopoïétique. La génération des cellules sanguines est assurée par différenciation clonale de cellules souches. L'hématopoïèse comporte 4 compartiments: les cellules souches multipotentes, les progéniteurs, les précurseurs et les cellules matures.

L'hématopoïèse débute par la génération de deux types de progéniteurs multipotents, l'un à l'origine de la myélo-érythro-thrombopoïèse et le second à l'origine de la lymphopoïèse. Les cellules progénitrices lymphoïdes communes donnent les cellules B, les cellules T et les cellules NK. Les cellules progénitrices myéloïdes génèrent les érythrocytes, les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles, les monocytes, les mastocytes et les plaquettes (Figure 2).

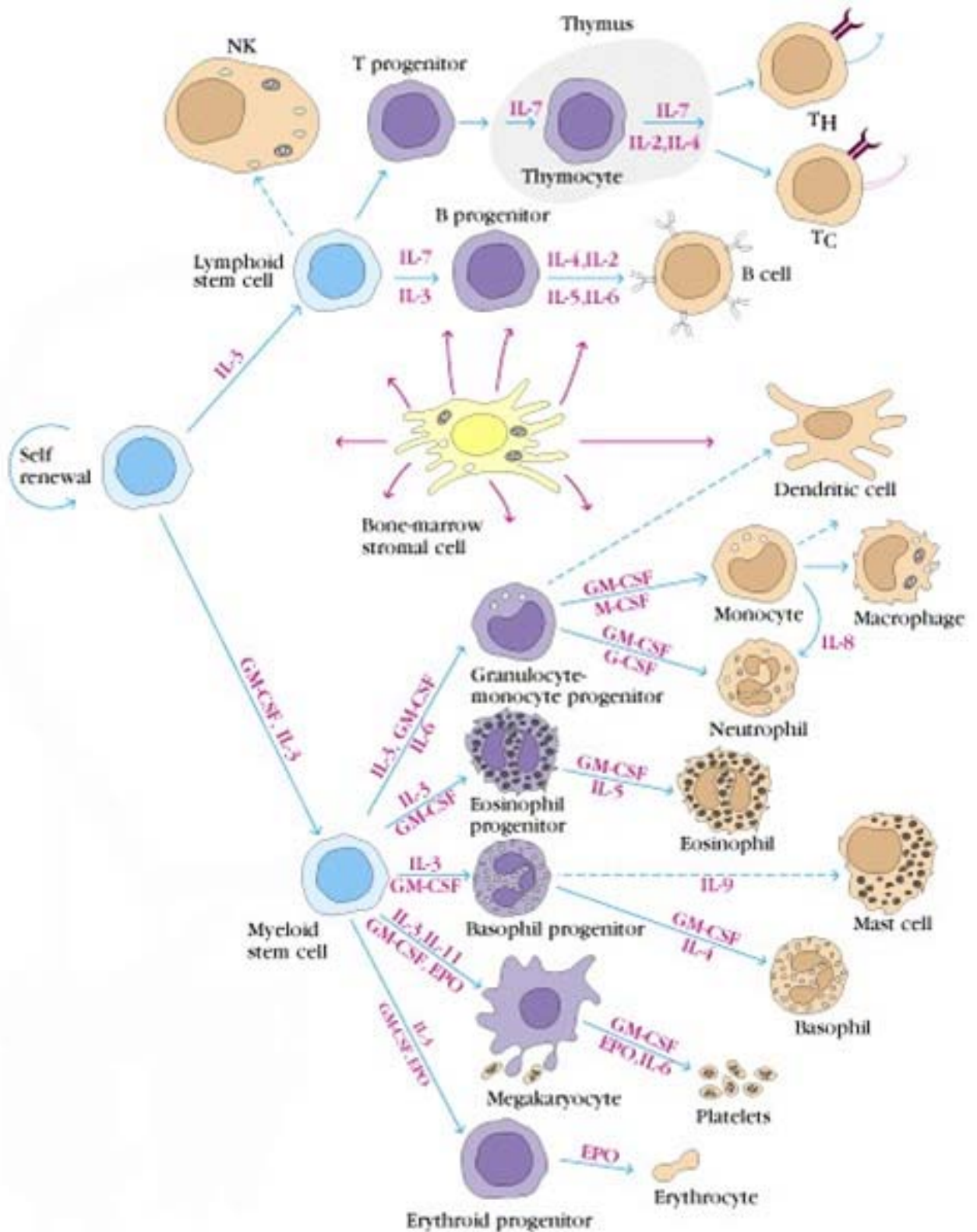


Figure 2: Schéma représentant l'hématopoïèse. L'hématopoïèse débute par la génération de deux types de progéniteurs multipotents, l'un à l'origine de la myélo-érythro-thrombopoïèse et le second à l'origine de la lymphopoïèse. Les cellules progénitrices lymphoïdes communes donnent les cellules B, les cellules T et les cellules NK (en beige). Les cellules progénitrices myéloïdes génèrent les érythrocytes, les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles, les monocytes, les mastocytes et les plaquettes (en beige) (Tiré du livre de Goldsby *et al*, Immunologie).

Introduction

Au cours de la maturation des cellules B dans la moelle osseuse, certains segments géniques sont brassés au hasard par un système génétique dynamique capable de créer plus de 10^{10} combinaisons. Ce processus est soigneusement régulé: la maturation d'une cellule B progénitrice progresse selon une séquence ordonnée de réarrangements (recombinaisons) des gènes des immunoglobulines (Ig). A la fin de ce processus, une cellule B mature immuno-compétente possédera une seule séquence fonctionnelle de la région variable de la chaîne lourde, ainsi qu'une seule séquence fonctionnelle de la région variable de la chaîne légère, de telle façon que chaque cellule B soit antigéniquement engagée contre un épitope spécifique. Les changements, bien définis dans le programme développemental des cellules B humaines, incluent (Figure 3) l'expression de CD19, la régulation de l'expression de RAG-1 et TdT, l'expression cytoplasmique de la chaîne lourde μ , l'expression à la surface des chaînes lourdes μ avec VpreB et $\lambda 5$ pour former le pré-récepteur des cellules B et, finalement, l'expression à la surface des chaînes lourdes μ avec les chaînes légères κ et λ pour former le récepteur des cellules B (Bertrand *et al*, 2000).

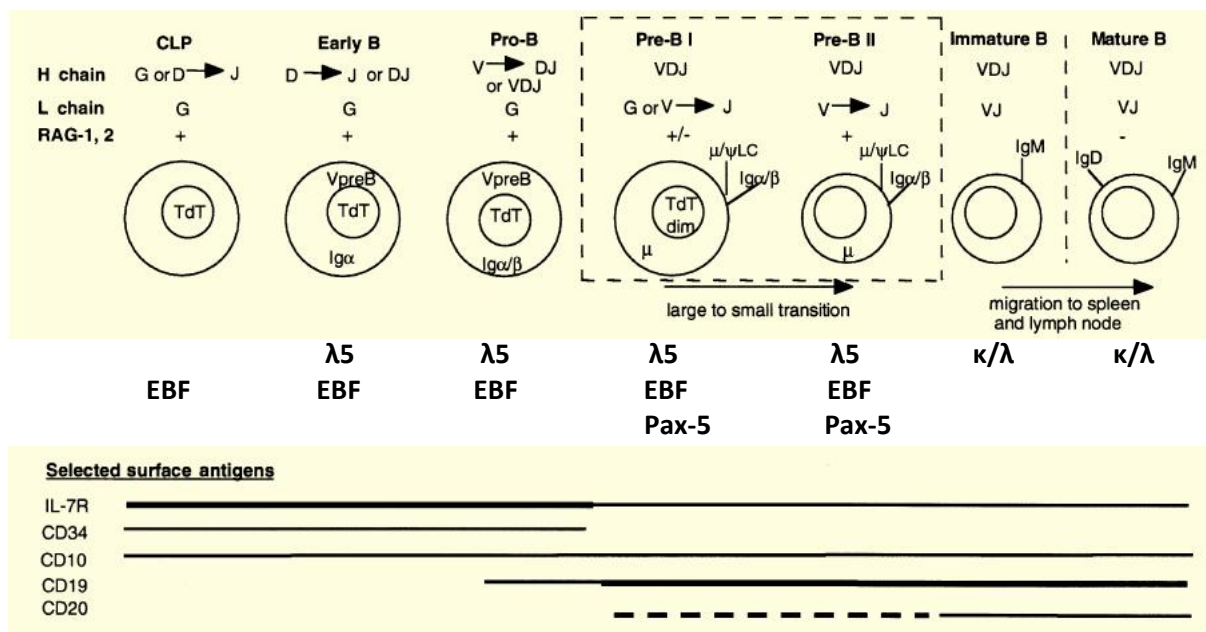


Figure 3: Modèle du développement des cellules B humaines. La maturation d'une cellule B progénitrice progresse selon une séquence ordonnée de réarrangements (recombinaisons) des gènes des Ig. Le stade de réarrangement des Ig et l'expression de RAG-1, RAG-2, $\lambda 5$, EBF, Pax-5, TdT, pre-BCR et BCR sont montrés. L'expression des antigènes de surface est illustrée en dessous. Les lignes pointillées indiquent une faible expression, les lignes en gras indiquent une forte expression (Bertrand *et al*, 2000).

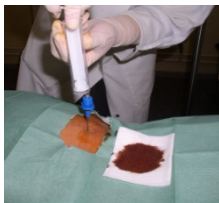
Plusieurs études ont tenté de différencier les HSC en cellules B. Tout d'abord, après co-culture de cellules CD34+ de sang de cordon ombilical sur une couche de cellules stromales murines MS-5 sans ajouter de cytokines, une équipe a montré une différenciation des cellules jusqu'au stade de cellules pro-B. Ces cellules exprimaient Pax-5, λ -like et la chaîne lourde μ (Berardi *et al*, 1997). Un an plus tard, un autre groupe montrait la différenciation de ces cellules en cellules B plus matures pouvant

sécréter des Ig en utilisant un système de co-culture en 2 étapes: co-culture avec une lignée de cellules stromales murines S17 puis transfert sur des fibroblastes exprimant le CD40 ligand en présence d'IL-10 et d'IL-4 (Fluckiger *et al*, 1998). Récemment, une troisième équipe a utilisé des cellules souches mésenchymateuses dans leur co-culture. Après 4 semaines et en présence de cytokines, les cellules CD34+ se différenciaient en cellules B immatures exprimant l'IgM à leur surface (Ichii *et al*, 2008).

1.2.2. Sources des HSC

Trois sources de HSC existent chez l'Homme: la moelle osseuse, le sang périphérique et le sang de cordon ombilical (Figure 4).

Moelle osseuse



Prélèvement:

- en salle d'opération
- sous anesthésie générale
- par ponctions multiples au niveau de la crête iliaque.

La moelle est aspirée dans des seringues, filtrée et greffée au patient.

Sang périphérique

Les cellules souches sont récoltées après stimulation par un facteur de croissance (passage des cellules souches de la moelle vers le sang)

- en ambulatoire
- sans anesthésie générale
- à l'aide d'un séparateur de cellules

- ponction du sang dans un bras
- sélection des cellules souches
- réinfusion dans l'autre bras du plasma, des globules rouges, neutrophiles et plaquettes.



Sang de cordon ombilical

Prélèvement:

- à la naissance du bébé
- clampage du bébé
- un cathéter est inséré dans la veine ombilicale
- le sang coule par gravité dans une poche stérile.

Aucun risque ni pour le bébé, ni pour sa maman.

Le sang est ensuite

- testé pour exclure tout risque de contamination (bactéries, virus...)
- congelé dans l'azote liquide jusqu'à son utilisation.



Figure 4: Sources des HSC. Trois sources de HSC existent chez l'Homme: la moelle osseuse, le sang périphérique et le sang de cordon ombilical.

La moelle osseuse

La moelle osseuse est prélevée sous anesthésie générale par ponctions multiples au niveau de la crête iliaque.

Le sang périphérique

Le donneur reçoit pendant 4 jours une injection sous-cutanée quotidienne de G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) qui stimule la granulopoïèse et incite également la moelle osseuse à libérer les HSC dans le sang. Le don proprement dit se fait par cytophérèse, en milieu hospitalier. Cette technique consiste à faire passer le sang du donneur dans le séparateur de cellules. Cette machine spécialisée va, par centrifugation, permettre de séparer le plasma (léger) et les globules rouges (lourds). Entre les deux, on trouve un mélange de leucocytes et de plaquettes où se trouvent

Introduction

les cellules souches. C'est cette partie du sang que la machine prélève. Les autres constituants sont renvoyés vers le donneur.

Ce type de prélèvement présente des avantages (Eaves, 1993) tant pour le patient (accélération de la reprise de la production de cellules hématopoïétiques, rétablissement plus rapide des mécanismes de défense immunitaire) que pour le donneur (pas d'anesthésie générale, moins de risques inhérents au prélèvement).

Le sang de cordon ombilical

Le sang placentaire qui reflue du cordon ombilical après l'accouchement contient un nombre significatif de cellules souches. Celles-ci peuvent être récoltées sans aucun dommage pour la mère ni pour l'enfant et congelées en vue d'une greffe ultérieure. En raison du faible nombre de cellules souches par greffon, ce type de transplantation est pratiquée principalement chez des enfants (Gluckman, 2000). Chez les adultes, la période d'aplasie médullaire qui suit une greffe de sang de cordon est beaucoup plus longue qu'après une greffe de cellules souches médullaires, ce qui expose davantage les patients à des complications infectieuses ou hémorragiques. (Gluckman *et al*, 1997; Rubinstein *et al*, 1993). Cette source de cellules souches comporte plusieurs avantages et inconvénients.

Avantages:

- Il a été observé qu'à degré de compatibilité égal, l'incidence de la maladie du greffon contre l'hôte (ou GvHD: Graft versus Host Disease) après greffe de sang de cordon est inférieure à celle observée après greffe de HSC médullaires. Cette moindre incidence de la GvHD lors de la greffe de HSC de sang de cordon est attribuée à leur immaturité immunologique et permet d'envisager la réalisation de greffes non strictement HLA identiques.
- Ressources illimitées.
- Disponibilités immédiates du greffon permettant de réduire le délai d'attente avant greffe.
- Possibilité de prélever les membres des minorités ethniques peu représentées dans les fichiers actuels de donneurs volontaires de moelle osseuse.
- Les agents infectieux sont beaucoup moins courants chez les nouveau-nés que chez les adultes.

Inconvénients:

- Le nouveau-né peut porter une maladie génétique non diagnostiquée.
- Le sang placentaire peut avoir été prélevé pendant une période durant laquelle un agent infectieux était peut-être présent chez la mère mais non encore détectable par des techniques sérologiques.

Introduction

- La reprise hématologique est plus lente que lors d'une greffe de moelle ou de sang périphérique, soit à cause du nombre réduit de cellules souches greffées, soit à cause de leur plus grande immaturité par rapport aux cellules souches adultes, ce qui déterminerait un délai de maturation plus long avant de pouvoir rétablir une hématopoïèse complète.

1.2.3. Identification expérimentale des HSC

Aucune de ces deux propriétés – multipotence et autorenouvellement – n'est facilement identifiable pour affirmer le caractère «souche» d'une cellule; celle-ci doit en revanche fonctionner à long terme et donc être capable d'un grand nombre de divisions cellulaires. C'est cette propriété qui distingue une cellule souche de ses descendants directs, les «progéniteurs», dont le nombre possible de divisions et le potentiel sont amputés en comparaison de ceux de la cellule parentale. Acquérir la preuve qu'une cellule est «souche» nécessite de caractériser sa descendance, in vitro et in vivo: il s'agit donc d'une identification indirecte et rétrospective.

En 1977, l'équipe du Dr Dexter a mis au point une méthodologie permettant de cultiver in vitro pendant plusieurs semaines les précurseurs hématopoïétiques de souris (Dexter *et al*, 1977). Cette méthodologie est appelée «culture à long terme» (Figure 5).

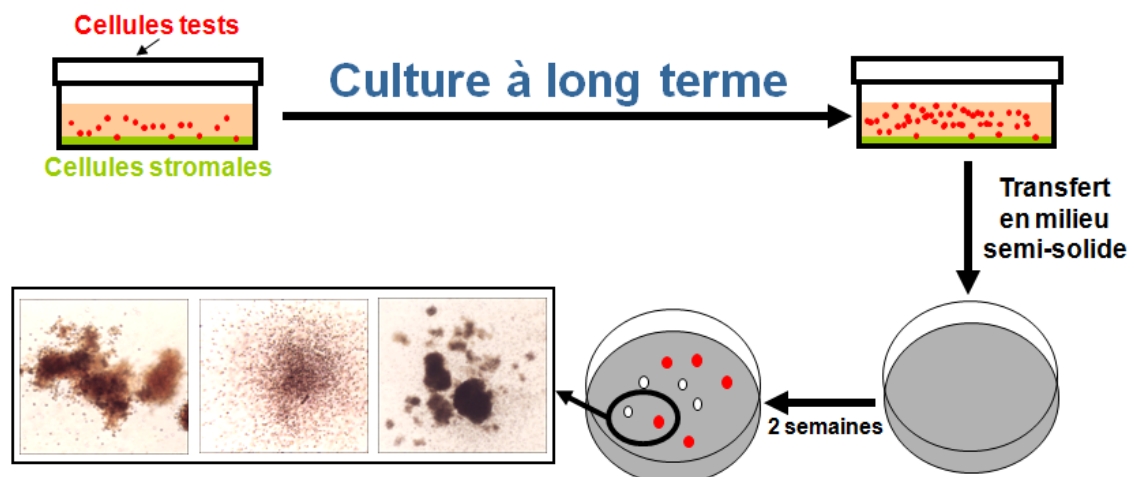


Figure 5: Identification des progéniteurs primitifs par culture à long terme selon Dexter. Les cellules hématopoïétiques sont incubées au contact de cellules stromales pendant 5 à 6 semaines. A ce terme, la suspension cellulaire est transférée en milieu semi-solide dans le but d'énumérer les progéniteurs clonogènes secondaires, reflet de la présence de cellules hématopoïétiques LTC-IC.

Elle consiste à incuber des cellules hématopoïétiques au contact de cellules stromales médullaires. Celles-ci se composent d'une variété de types cellulaires tels que fibroblastes, adipocytes, macrophages et cellules endothéliales, et sont supposées reproduire in vitro le microenvironnement médullaire, sans apporter de facteurs de croissance exogènes. Ce système de culture a permis de mettre au point chez l'Homme un test que l'on appelle LTC-IC, de l'anglais «long term culture-initiating cell», qui identifie un progéniteur très précoce capable de générer des

Introduction

cellules hématopoïétiques après mise en culture sur des cellules stromales (Sutherland *et al*, 1989). De nombreux arguments indiquent que les LTC-IC sont biologiquement distinctes des progéniteurs clonogènes directs (CFU). D'une part, il est possible de séparer ces deux types cellulaires suivant leur expression antigénique (Terstappen *et al*, 1991; Srour *et al*, 1993). D'autre part, CFU et LTC-IC montrent une sensibilité différente à certains facteurs de croissance (Petzer *et al*, 1996; Zandstra *et al*, 1997). Enfin, l'activité mitotique des CFU est nettement plus élevée que celle des LTC-IC (Hao *et al*, 1995; Jordan *et al*, 1996).

Récemment, une nouvelle approche a été développée pour établir un modèle *in vivo* de la cellule souche hématopoïétique humaine par transplantation à des souris présentant un syndrome d'immunodéficience combinée sévère (severe combined immune deficiency, SCID) responsable de l'absence de cellules B et T fonctionnelles et un diabète congénital (non obese diabetic, NOD) conférant un déficit en cellules NK (natural killer). Les cellules hématopoïétiques primitives humaines, injectées en intraveineuse à la souris NOD/SCID préalablement irradiée, ont la capacité de coloniser le microenvironnement médullaire murin, d'y proliférer et de produire une descendance lympho-myéloïde. Celles-ci ont été qualifiées de SCID-repopulating cells (SRC) (Figure 6).

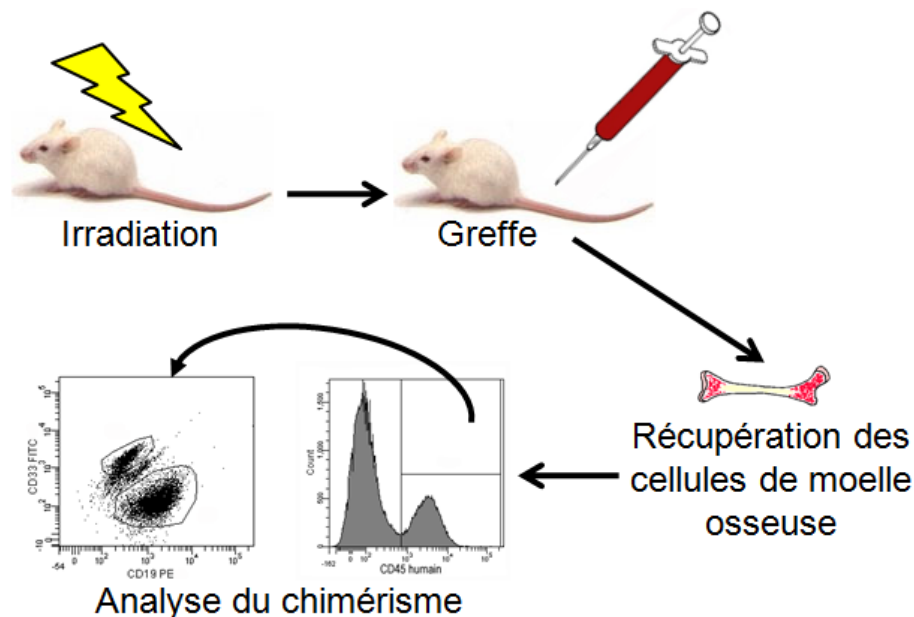


Figure 6: Identification des SRC. Après irradiation, la souris NOD/SCID reçoit par intraveineuse des cellules souches hématopoïétiques humaines. Ces cellules ont la capacité de coloniser le microenvironnement médullaire murin, d'y proliférer et de produire une descendance lympho-myéloïde. Celles-ci sont qualifiées de SCID-repopulating cells (SRC). Une analyse du chimérisme est effectuée sur les cellules de moelle osseuse récupérées. La présence de cellules CD19+ et CD33+ dans la population de cellules humaines CD45+ indique un repeuplement médullaire lympho-myéloïde.

Les cellules humaines présentes dans la moelle osseuse de la souris NOD/SCID dérivent d'une fraction infime (< 0,1 %) de cellules médullaires transplantées qui, par prolifération et différenciation, produisent des quantités massives de progéniteurs

humains (Cashman *et al*, 1997). Les propriétés fonctionnelles des SRC sont donc semblables à celles de cellules souches vraies. Bien que les SRC représentent des cellules hématopoïétiques très primitives, leur place exacte dans la hiérarchie cellulaire des cellules souches et leur relation avec les progéniteurs hématopoïétiques in vitro (LTC-IC) ne sont pas encore bien établies (Piacibello *et al*, 1999). Si les LTC-IC et les SRC présentent le même phénotype antigénique (Conneally *et al*, 1997), elles sont néanmoins distinctes par leur fréquence ainsi que par leur degré de prolifération in vitro: la proportion de SRC parmi les cellules médullaires nucléées est environ 100 fois inférieure à celle des LTC-IC (Bhatia *et al*, 1997). De plus, dans des conditions de culture qui permettent d'obtenir une expansion significative des LTC-IC, une amplification parallèle des SRC n'a pu être obtenue (Larochelle *et al*, 1996; Gan *et al*, 1997). Il faut néanmoins souligner que le modèle de transplantation xénogénique à la souris NOD/SCID est hautement artificiel. Premièrement, l'immunodéficiences des souris hôtes reste incomplète et la survie des HSC humaines greffées est limitée par l'activité NK résiduelle (Kollet *et al*, 2000; Kerre *et al*, 2002). C'est pourquoi l'injection d'un anti-NK à la souris NOD/SCID favorise la prise de greffe. L'équipe de McKenzie a montré que l'injection à la souris NOD/SCID d'un anticorps anti-CD122 (récepteur β de l'IL-2) permettait un meilleur repeuplement que chez des souris NOD/SCID non traitées. De plus, ils ont remarqué que ces souris NOD/SCID traitées montraient un meilleur chimérisme que des souris NOD/SCID- $\beta 2m^{-/-}$ (chez qui les cellules NK sont génétiquement déplétées) (McKenzie *et al*, 2005). Deuxièmement, la réactivité croisée entre les facteurs de croissance hématopoïétiques humains et murins est partielle, ce qui limite la prolifération et la différenciation des cellules souches implantées (Lapidot *et al*, 1992). Troisièmement, la détection des HSC humaines chez la souris NOD/SCID est conditionnée par leur capacité à migrer à partir du sang périphérique et à s'implanter dans le microenvironnement médullaire de la souris hôte (Peled *et al*, 1999). Or, cette propriété n'est présentée que par une minorité de HSC, de l'ordre de 2 à 10 % (van Hennik *et al*, 1999). L'injection intraosseuse directe permet d'ailleurs d'augmenter de 15 fois la détection des SRC, par rapport à la voie d'administration intraveineuse (Yahata *et al*, 2003). On notera enfin que la tolérance immunologique de l'hôte et les capacités d'implantation des HSC n'interviennent pas dans la détection des LTC-IC; les cellules hématopoïétiques étantensemencées au contact direct de cellules stromales.

1.2.4. Expansion ex vivo des HSC, culture à long terme

De nombreuses études ont tenté d'amplifier les HSC ex vivo dans des cultures cellulaires supplémentées de différentes combinaisons de cytokines hématopoïétiques. Approximativement 1 % des cellules lin-CD34-CD38- sont capables de proliférer rapidement en **culture liquide** sans sérum et contenant du Flt-3 ligand (FL), du «stem cell factor» (SCF), de la thrombopoïétine (TPO), de l'IL-3 et de l'IL-6 pour produire une augmentation nette de 28 ± 8 fois des cellules totales endéans les 10 jours. 5 ± 2 % de ces cellules sont CD34+ et $2,5 \pm 0,9$ % sont des

Introduction

cellules formant des colonies érythroïdes, granulopoïétiques, mégacaryocytiques ou mixtes (Fujisaki *et al*, 1999). Une meilleure amplification est obtenue après traitement avec du SCF + TPO + FL + IL-6 augmentant la population de progéniteurs de 45 fois durant une période relativement courte de 7 jours (Ueda *et al*, 2000). La plus forte expansion de cellules CD34+ est obtenue avec un cocktail contenant du FL + TPO + IL-6 + IL-11. La moyenne d'expansion de ces cellules est de 235 fois à 5200 fois respectivement après 5 et 10 semaines de culture (Lazzari *et al*, 2001).

Cependant, différents investigateurs ont rapporté que la présence d'une **couche de cellules nourricières** améliore l'expansion des progéniteurs primitifs. L'addition de MSC comme couche de cellules nourricières fournit des conditions améliorant l'expansion des progéniteurs hématopoïétiques précoces CD34+CD38-HLA-DR- comparé aux cytokines seules et peut limiter leur différenciation et le niveau d'apoptose durant des expansions de courte durée in vitro (Kadereit *et al*, 2002). D'autres observent que cette augmentation d'expansion ne nécessite pas la sélection des cellules CD34+ avant leur amplification (McNiece *et al*, 2004; Robinson *et al*, 2006). Après co-culture de cellules CD34+ avec des MSC humaines dans un milieu supplémenté de cytokines, l'équipe d'Almeida-Porada observe une expansion des cellules indifférenciées CD34+CD38- et une différenciation dans la lignée granulo-monocytaire. Le développement d'une population cellulaire CD7+ est aussi observé (da Silva *et al*, 2005; Goncalves *et al*, 2006). Les MSC de sang de cordon ombilical peuvent également soutenir la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques ex vivo (Jang *et al*, 2006).

La culture de HSC avec des MSC **en contact** ou sans contact ou avec du milieu conditionné par les MSC augmente le nombre de cellules totales en culture, de CFC et de cellules CD34+ par rapport à la culture avec uniquement des cytokines. Aucune différence n'a été observée entre le milieu conditionné par les MSC et la culture sans contact tandis que la culture en contact donnait les meilleurs résultats. Ceci suggère que des facteurs solubles jouent un rôle dans ce support mais qu'ils ne sont pas suffisants, un contact direct reste nécessaire pour favoriser l'expansion. IL-6, sécrétée abondamment par les MSC, jouerait un rôle partiel (Li *et al*, 2007). Plus de LTC-IC sont observées dans la fraction adhérente comparée à la fraction non adhérente. Les progéniteurs primitifs sont plus adhérents aux MSC (Wagner *et al*, 2007b). Après co-culture de cellules CD133+ du sang périphérique sur un tapis de MSC, l'équipe d'Alakel a étudié le phénotype de cellules amplifiées adhérentes comparé aux non adhérentes. Les cellules amplifiées adhérentes aux MSC montrent un phénotype moins différencié avec plus de cellules CD34+CD133+, CD34+CD38- et CD133+CD38- comparé aux cellules non adhérentes. De plus, les cellules adhérentes expriment le CXCR4 contrairement aux non adhérentes et migrent mieux vers un gradient de SDF-1. Dans des études de CFC et de LTC-IC, les cellules adhérentes montrent une meilleure capacité proliférative. Ceci démontre l'importance d'utiliser une couche de cellules nourricières dans les systèmes de culture de HSC. L'adhésion et le contact direct cellule-cellule avec des MSC supportent l'expansion

ex vivo, le potentiel migratoire et le potentiel souche de progéniteurs hématopoïétiques (Alakel *et al*, 2009).

1.2.5. Expansion des SRC

Pour tenter d'améliorer la prise de greffe des HSC, deux techniques principales ont été développées. Tout d'abord, les HSC sont **cultivées ex vivo** avant l'injection. Utilisant une combinaison de SCF + FL + TPO + IL-6/sIL-6R (complexe d'IL-6 et du récepteur soluble d'IL-6), l'équipe d'Ueda a cultivé des cellules CD34+ de sang de cordon ombilical pendant 7 jours et a transplanté ces cellules à des souris NOD/SCID. 13 des 16 souris hôtes ont été greffées avec succès et les cellules CD45+ humaines représentaient 11,5 % des cellules de la moelle des souris hôtes greffées. L'addition d'IL-3 à la combinaison de cytokines annulait la capacité de repeuplement des cellules amplifiées (Ueda *et al*, 2000). Une autre étude montre que la culture de cellules CD34+ en présence de SCF, TPO et FGF-1 maintient les SRC, mais l'ajout d'«angiopoïétin-like protéines» et d'«IGF-binding protein 2» permet l'amplification des SRC (Zhang *et al*, 2008). Les cellules peuvent également être amplifiées sur un stroma. Par exemple, les MS-5 (lignée de cellules stromales murines) fournissent un milieu qui stimule la prolifération des progéniteurs primitifs incluant des cellules souches transplantables (Kanai *et al*, 2000). L'utilisation de cellules stromales immortalisées augmente également le degré de prise de greffe, en particulier si ces cellules sont transfectées avec TPO et FL (Kawano *et al*, 2003; Xie *et al*, 2005). La transplantation dans le fœtus de mouton démontre également que les HSC cultivées sur des MSC gardent leur potentiel de prise de greffe (Goncalves *et al*, 2006). L'utilisation de cytokines, en plus du stroma, favorise encore plus la prise de greffe. L'amplification de cellules CD34+ pendant 5 jours sur un tapis de cellules HESS-5 en présence de TPO, FL et IL-3 dans du milieu sans sérum augmente significativement la prise de greffe comparé aux cellules non cultivées (Kawada *et al*, 1999). Les souris greffées avec le produit d'expansion de 2 semaines de co-culture de cellules CD34+ sur un tapis de MSC en présence de TPO, SCF et FL montrent un meilleur chimérisme humain et un plus grand nombre de souris greffées avec succès qu'après greffe de cellules CD34+ non cultivées. Cet effet est augmenté après 4 semaines de culture et est plus important avec des faibles doses de cellules de départ (Yamaguchi *et al*, 2001). Lorsque les cellules CD34+ sont cultivées de la même façon en remplaçant le sérum de veau fœtal par du sérum humain AB, la même augmentation du chimérisme est obtenue (Yamaguchi *et al*, 2002). La co-culture de cellules stromales et de HSC favorise l'expression de CXCR4 par les progéniteurs hématopoïétiques précoces. Cette expression est également induite lors de cultures sans contact, suggérant un rôle des facteurs solubles tels que Wnt puisque l'induction de CXCR4 est inhibée par Dkk (inhibiteur de la voie Wnt; cfr point 1.4.5). Ces cellules acquièrent une capacité de «homing» pour se greffer dans la moelle de souris NOD/SCID (Kobune *et al*, 2008b).

La seconde technique permettant de favoriser la prise de greffe des HSC est **l'injection simultanée de MSC**. En effet, la transplantation de cellules CD34+ de

sang de cordon ombilical en présence de MSC résulte en une prise de greffe significativement plus importante qu'après transplantation de cellules CD34+ seules. L'effet le plus prononcé est observé après transplantation de doses relativement faibles de CD34+. L'analyse des sous-populations de cellules humaines dans la moelle osseuse des souris NOD/SCID révèle que l'effet d'augmentation de la prise de greffe par les MSC n'est pas restreint à une lignée particulière mais inclut bien les cellules myéloïdes et lymphoïdes (Noort *et al*, 2002; Angelopoulou *et al*, 2003; Bensidhoum *et al*, 2004; Park *et al*, 2007; Lee *et al*, 2008). Cette co-transplantation de HSC et de MSC favorise la prise de greffe de façon dose dépendante, le meilleur rapport HSC/MSC est 1/8 à 1/16. Cependant, des doses trop importantes de MSC peuvent diminuer la prise de greffe (Kim *et al*, 2006).

1.3. Les cellules souches mésenchymateuses (MSC)

Dans les années 1960, Alexander Friedenstein a mis en évidence l'existence de progéniteurs de la moelle osseuse pour le tissu conjonctif (Friedenstein *et al*, 1968). En cultivant à faible densité, dans un milieu liquide contenant du sérum, des cellules médullaires de lapins ou de rongeurs, il a observé l'apparition de colonies de cellules adhérentes au plastique, allongées et d'apparence fibroblastique. Il a été démontré que ces colonies étaient des clones provenant d'une cellule, la «colony-forming unit-fibroblasts» (CFU-F), quiescente en début de culture. Les colonies ensemencées sous la capsule rénale d'animaux syngéniques ont généré du tissu fibreux, de l'os ou des trabécules osseuses contenant de la moelle hématopoïétique. L'utilisation d'animaux chimériques a permis de montrer que le tissu fibreux et l'os provenaient bien du donneur, tandis que le tissu hématopoïétique provenait du receveur. Ces expériences fondamentales ont suggéré l'existence de progéniteurs multipotents pour le tissu conjonctif et l'existence d'une niche pour les HSC circulantes qui trouvent des sites d'ancrage et de développement favorable dans certaines colonies issues des CFU-F. Le concept de niche a été approfondi par Robert Schofield (Schofield, 1978). Les HSC ne pouvaient maintenir leur état de cellules souches qu'en gardant un contact physique avec un stroma approprié consistant en cellules stromales associées à leur matrice extracellulaire. La notion de niche est aujourd'hui largement confirmée et peut être appliquée à la plupart, sinon à la totalité, des cellules souches. Dans les années 1990, Arnold Caplan a défini les cellules souches mésenchymateuses comme les cellules à l'origine non seulement de l'os et du stroma médullaire, mais aussi du cartilage, des tendons et du muscle (Caplan, 1991). On trouve dans la littérature différents termes pour dénommer ce type cellulaire. L'abréviation MSC peut signifier «mesenchymal stem cell» ou «marrow stromal cell» ce qui indique la capacité pour cette catégorie de cellules souches (ou pour leur descendance immédiate) à servir de niche pour d'autres types de cellules souches. Le terme «stromal stem cell» insiste sur le fait que ces cellules sont présentes dans le stroma développé au cours des cultures à long terme de moelle. Le terme «skeletal stem cell» insiste sur la capacité des cellules à donner naissance aux différents composants cellulaires des tissus squelettiques. Le terme «mesenchymal

Introduction

progenitor cell» souligne les limites de l'application, à ce type de cellules souches, des différents critères de cellules souches. Dans notre travail, nous utiliserons l'abréviation MSC pour «mesenchymal stem cell».

Le potentiel thérapeutique considérable des MSC a généré un intérêt croissant dans une large variété de disciplines biomédicales. Cependant, les investigateurs rapportent des études sur MSC utilisant des méthodes d'isolement et d'expansion différentes et des approches de caractérisation cellulaire différentes. Il est donc de plus en plus difficile de comparer les résultats des différentes études. C'est pourquoi, le comité «Mesenchymal and Tissue Stem Cell» de l'ISCT (International Society for Cellular Therapy) propose des critères minimums pour définir les MSC. Premièrement, les MSC doivent adhérer au plastique lorsqu'elles sont maintenues dans du milieu standard. Deuxièmement, les MSC doivent exprimer le CD105, le CD73 et le CD90 et ne pas exprimer les antigènes CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 et HLA-DR. Troisièmement, les MSC doivent se différencier en ostéoblastes, adipocytes et chondroblastes in vitro (Tableau 1) (Dominici *et al*, 2006).

Tableau 1: Résumé des critères minimums pour définir les MSC (Dominici *et al*, 2006).

1 Adhérence au plastique		
2 Phénotype	Positive ($\geq 95\%$ +)	Négative ($\leq 2\%$ +)
	CD105	CD45
	CD73	CD34
	CD90	CD14 ou CD11b
		CD79a ou CD19
		HLA-DR
3 Différenciation in vitro: ostéoblastes, adipocytes, chondroblastes		

Les MSC ne représentent qu'une petite fraction de la population totale des cellules nucléées de la moelle osseuse: 0,001 à 0,01 % (Pittenger *et al*, 1999). Cependant, leur isolement et leur prolifération en culture sont aisés. Les MSC sont caractérisées par leur forme allongée d'apparence fibroblastique, leur adhérence au plastique, leur capacité de différenciation en différents types cellulaires suivant le milieu de culture et la présence de nombreux marqueurs à la surface cellulaire.

Les applications cliniques des greffes de MSC sont potentiellement nombreuses (Tableau 2). Des études indiquent que la co-transplantation de HSC et de MSC facilite la récupération hématologique (Koc *et al*, 2000). Les MSC possèdent également une action immunosuppressive et permettent de traiter la maladie du greffon contre l'hôte après greffe allogénique de HSC (Le Blanc *et al*, 2008). Enfin, les MSC ont la faculté de s'implanter dans de nombreux tissus extra-hématopoïétiques et pourraient contribuer aux processus de régénération ou de réparation tissulaires (Devine *et al*, 2003).

Tableau 2: Enumération des études cliniques qui utilisent des MSC (NIH, clinicaltrials.org).

Etudes cliniques utilisant des MSC	Nombre
Maladie du greffon contre l'hôte et rejet de greffe	16
Maladie cardiaque	11
Maladie de Crohn	4
Régénération hépatique	3
Fracture du tibia	3
Sclérose multiple	2
Lésion méniscale	2
Ostéogénèse imparfaite	2

Les MSC peuvent être isolées à partir de moelle osseuse mais également de nombreux autres tissus. Différentes études ont montré la présence de MSC dans le sang de cordon ombilical ayant les mêmes capacités prolifératives et de différenciation (Kogler *et al*, 2004; Lee *et al*, 2004). Cependant, l'isolement de ces cellules à partir du sang de cordon n'aboutit que dans 29 à 40 % des cas (Kogler *et al*, 2004; Kern *et al*, 2006). Les MSC sont également présentes dans le tissu adipeux mais leur capacité à soutenir l'hématopoïèse serait moindre que les cellules d'origine médullaire ou ombilicale (Wagner *et al*, 2007a). Enfin, les MSC peuvent être isolées à partir du cartilage (Alsalameh *et al*, 2004), du périoste (Cuevas *et al*, 2004), de la membrane synoviale (De Bari *et al*, 2001), du liquide synovial (Jones *et al*, 2004), des muscles (Young *et al*, 2001), des tendons (Salingcarnboriboon *et al*, 2003), du tissu fœtal (Hu *et al*, 2003), du placenta (Zhang *et al*, 2004) et de la veine ombilicale (Romanov *et al*, 2003).

Le phénotype des MSC ne permet pas d'établir une hiérarchie cellulaire, c'est-à-dire de distinguer différentes sous-populations selon leur degré de maturité. Il est communément admis que les MSC n'expriment pas les antigènes CD11b, CD14, CD34, CD36, CD45 à la différence des cellules hématopoïétiques. Cette propriété permet de distinguer aisément les deux populations à partir d'un échantillon de moelle osseuse. Les MSC expriment les antigènes CD90, CD105 (SH2), CD73 (SH3), CD106 (VCAM) et CD13 (Pittenger *et al*, 1999). D'autres marqueurs présents à la surface cellulaire des MSC ont été identifiés: STRO-1 (Simmons & Torok-Storb, 1991; Gronthos *et al*, 2003), SSEA4 (Gang *et al*, 2007), CD146 (Sorrentino *et al*, 2008), CD271 (Jones *et al*, 2006), CD49a (Boiret *et al*, 2005) et GD2 (Martinez *et al*, 2007).

1.3.1. Différentes techniques de sélection des MSC

Comme les MSC ne représentent que 0,001 à 0,01 % de la population totale des cellules nucléées de la moelle osseuse, il est nécessaire de les purifier avant leur utilisation. De nombreuses techniques de sélection ont été développées.

Introduction

L'adhérence au plastique, la technique de «RosetteSep®» et la sélection phénotypique sont les trois grands axes de purification des MSC. La technique de sélection par adhérence au plastique consiste à mettre les cellules mononucléées en culture pendant une période allant de 24 h à 1 semaine. A ce terme, les cellules non adhérentes sont éliminées en remplaçant le milieu de culture. Les cellules adhérentes sont ensuite amplifiées.

L'enrichissement en MSC par «RosetteSep® Human Mesenchymal Stem Cell Enrichment Cocktail» (Stem Cell Technologies, Myelan, France) implique une incubation brève de l'échantillon avec le cocktail d'enrichissement à base d'anticorps anti-Glycophorin A, anti-CD3, anti-CD14, anti-CD19, anti-CD66b, anti-CD38 suivi d'une centrifugation sur gradient de densité. Ces anticorps permettent la liaison des cellules non mésenchymateuses aux globules rouges, ce qui augmente la densité des cellules non mésenchymateuses qui formeront un culot avec les globules rouges après centrifugation sur gradient de densité. Les cellules désirées ne sont pas marquées et sont facilement collectées à l'interface plasma-milieu de gradient de densité. Elles sont ensuite amplifiées (Figure 7).

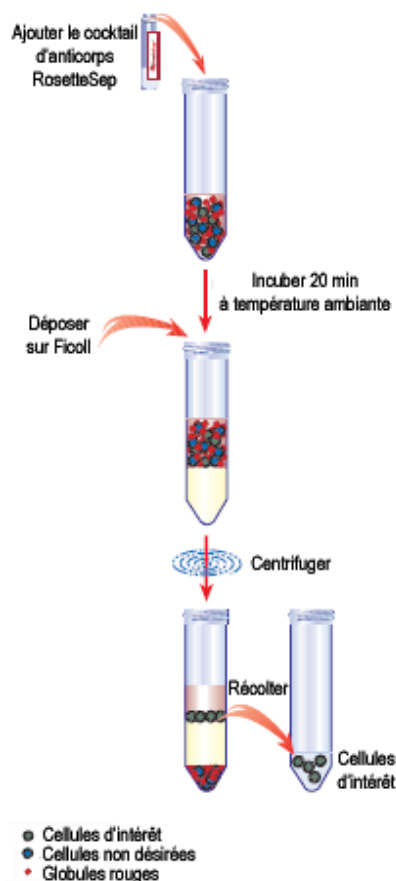


Figure 7: Procédure de purification par «RosetteSep®». Les cellules sont incubées pendant 20 min à température ambiante avec le cocktail d'anticorps «RosetteSep®» avant d'être centrifugées sur gradient de densité. Ces anticorps permettent la liaison des cellules non désirées aux globules rouges qui formeront un culot après centrifugation. Les cellules d'intérêt ne sont pas marquées et sont facilement collectées à l'interface plasma-milieu de gradient de densité. D'après le manuel technique de Stem Cell Technologies (http://www.stemcell.com/technical/15128_15168-PIS.pdf).

Introduction

Les MSC peuvent être sélectionnées grâce à leurs marqueurs de surface. Après marquage par un ou plusieurs anticorps spécifiques des MSC, les cellules sont triées à l'aide d'un cytomètre en flux ou par colonne chromatographique. Les MSC peuvent être purifiées par sélection positive à l'aide des marqueurs de surface cellulaire suivants:

- **VCAM-1+/STRO-1+** (Gronthos *et al*, 2003): Environ 6,5 % des cellules mononucléées de la moelle osseuse sont STRO-1+ et 0,02 % sont STRO-1+/VCAM-1+. L'isolement des cellules STRO-1+/VCAM-1+ donne un enrichissement en CFU-F de 5000 fois comparé à de la moelle osseuse non sélectionnée (Figure 8). Il n'y a pas de CFU-F dans la fraction STRO-1-. L'expression de STRO-1 diminue en culture.

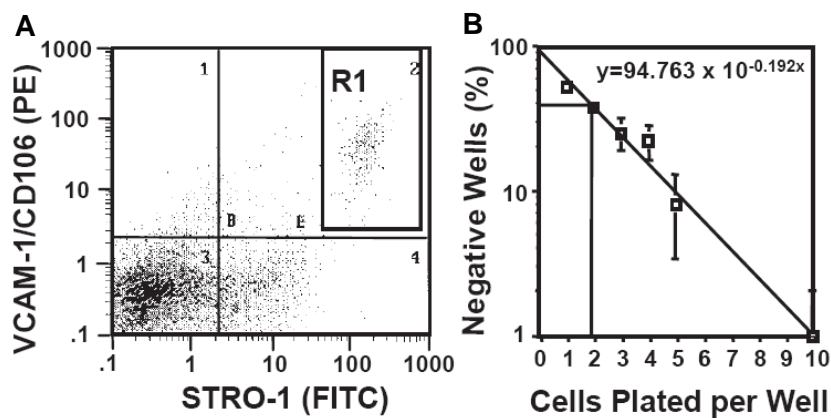


Figure 8: (A) Analyse par cytométrie en flux de l'expression de VCAM-1 et de STRO-1 par les cellules mononucléées de moelle osseuse. Une petite population de cellules STRO-1+/VCAM-1+ est montrée en R1, approximativement 0,02 % des cellules mononucléées de moelle osseuse. (B) L'activité CFU-F de la population STRO-1+/VCAM-1+ est déterminée par analyse en dilution limite et statistique de Poisson montrant qu'une cellule sur deux est capable de former une colonie (Gronthos *et al*, 2003).

- **CD73+ ou CD49a+** (Boiret *et al*, 2005): Après déplétion des cellules CD45+ et CD14+ de la moelle osseuse, les cellules ont été sélectionnées suivant leur expression des antigènes CD73, CD105, CD90 et CD49a par tri cellulaire en cytométrie en flux. CD73 et CD49a étaient les meilleurs marqueurs pour sélectionner les CFU-F (Tableau 3), tandis que CD105 et CD90 ne sont pas spécifiquement exprimés par les MSC. Il est très surprenant de constater que les cellules CD105+ et CD90+ n'enrichissent pas en MSC alors que ces marqueurs sont exprimés à un haut niveau par les MSC cultivées. En fait, l'intensité de fluorescence de ces marqueurs augmente dans les cultures. Ainsi, des MSC CD105- et CD90- deviennent positives en culture.

Introduction

Tableau 3: Analyse phénotypique et CFU-F de la population CD45⁻/CD14⁻ (Boiret *et al*, 2005).

	Antigen expression on unmanipulated CD45 ⁻ CD14 ⁻ subset							
	CD73 ⁺ (n = 5)	CD73 ⁻	CD105 ⁺ (n = 5)	CD105 ⁻	CDw90 ⁺ (n = 5)	CDw90 ⁻	CD49a ⁺ (n = 5)	CD49a ⁻
% ^a	5.2 ± 3.1	94.8 ± 3.1	17.4 ± 5.5	82.6 ± 5.5	4.5 ± 2.1	95.5 ± 2.1	4.4 ± 1.9	95.6 ± 1.9
Total No/10 ⁶ input cells (×10 ³) ^b	2.4 ± 0.9	63.4 ± 17.2	11.8 ± 0.8	93.2 ± 32.5	0.3 ± 0.2	57.3 ± 12.5	0.5 ± 0.3	66.1 ± 15.9
CFU-F/10 ³ plated cells ^c	15.8 ± 9.1	0	1.7 ± 0.8	0.5 ± 0.2	8.7 ± 2.7	0.2 ± 0.1	17.6 ± 5.4	<0.01
CFU-F No/10 ⁶ input cells ^d	25.6 ± 9.9	0	19.0 ± 8.4	19.4 ± 7.4	8.8 ± 4.6	11.8 ± 9.3	35.7 ± 8.1	0.1 ± 0.1

Characteristics of fresh MC were defined on unmanipulated BM cell suspensions. The proportion of each subset was expressed as a percentage of fresh CD45⁻CD14⁻ cells (a) and calculated for 10⁶ initial bone marrow cells (b). The clonogenic potential was normalized as the number of CFU-F obtained from 10³ sorted cells (c), the number of CFU-F obtained from each subset was related to the total number of fresh bone marrow cells (d). Results are expressed as mean ± SEM from indicated number of independent experiments.

- SSEA4+** (Gang *et al*, 2007): SSEA4 est connu comme étant exprimé par les cellules souches embryonnaires humaines. Dans la moelle fraîche, SSEA4 est exprimé par 2 % des cellules. Dans la population SSEA4+, la moitié des cellules sont CD45- et seule cette sous-population peut initier une culture primaire de MSC. Ainsi, SSEA4 n'est pas exprimé uniquement par les MSC mais également par une sous-population exprimant CD45. L'expression de SSEA4 est augmentée en culture au cours des passages (Figure 9). Les cellules SSEA4+ peuvent, dès le second passage, se différencier en graisse, cartilage et os.

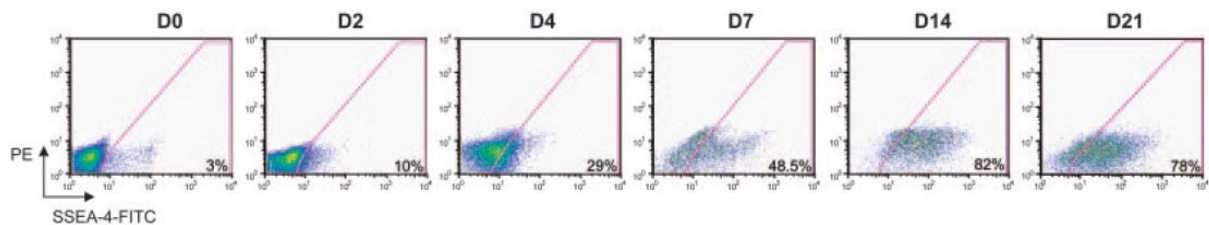


Figure 9: Analyse représentative de l'expression de SSEA4 (axe x) par les cellules fraîches de moelle osseuse (D0) et les cellules adhérentes après 2, 4, 7, 14 et 21 jours (D) de culture. L'axe y représente la mesure de l'autofluorescence des cellules (Gang *et al*, 2007).

- GD2+** (Martinez *et al*, 2007): Les cellules mononucléées de la moelle osseuse exprimant CD73 et CD105 co-expriment GD2. Celui-ci est également exprimé par les MSC en culture et maintenu au cours des passages successifs (Figure 10). Les cellules GD2+ peuvent se différencier en adipocytes, chondrocytes et ostéoblastes.

Introduction

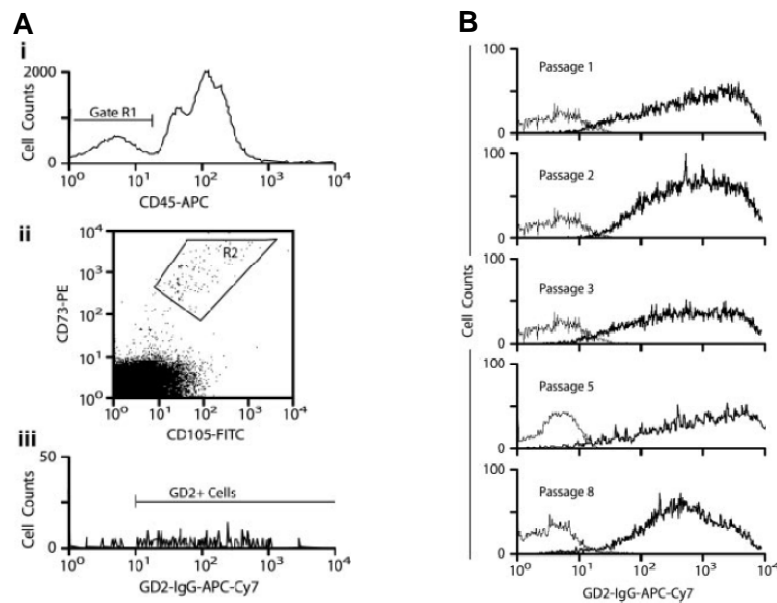


Figure 10: (Ai) Histogramme des cellules de moelle osseuse exprimant le CD45. La population R1 indique les cellules CD45-. (Aii) Analyse des cellules CD45- de la population R1 exprimant le CD73 et le CD105. La population R2 indique les cellules double positives. (Aiii) Analyse des cellules CD45-/CD73+/CD105+ de la population R2 exprimant GD2. (B) Histogramme de l'expression de GD2 par les MSC après passages successifs (Martinez *et al*, 2007).

- **CD271+ ou CD105+** (Jarocha *et al*, 2008): Comparé à de la moelle non traitée, le nombre de CFU-F formé après mise en culture d'une population CD105+ ou CD271+ est respectivement 4 et 6 fois plus important (Tableau 4). Ces cellules peuvent se différencier en ostéoblastes et adipocytes.

Tableau 4: Influence de la méthode d'isolement des MSC sur le nombre de CFU-F (Jarocha *et al*, 2008).

	Isolation strategy			
	MNCs	RosetteSep	CD105	CD271
Number of cells seeded	17 × 10 ⁶ (10.3-28)	2.4 × 10 ⁶ (1.1-4.2)	0.29 × 10 ⁶ (0.08-0.75)	0.22 × 10 ⁶ (0.11-0.38)
Number of CFU-F colonies / 10 ⁷	25.7 (14.5-41.2)	49.3 (21.2-97.1)	104.8 (36.5-221)	148.1 (55.3-211)

- **MSCA1+/CD56+** (Battula *et al*, 2009): Des essais de CFU-F montrent que les MSC sont enrichies de 90 fois dans la fraction MSCA-1+CD56- et de 180 fois dans la population MSCA-1+CD56+ comparé à de la moelle non sélectionnée (Figure 11). Ces deux populations cellulaires peuvent se différencier en ostéoblastes, chondroblastes, cellules musculaires, neurales et pancréatiques. Seule la population MSCA-1+CD56- peut se différencier en adipocytes.

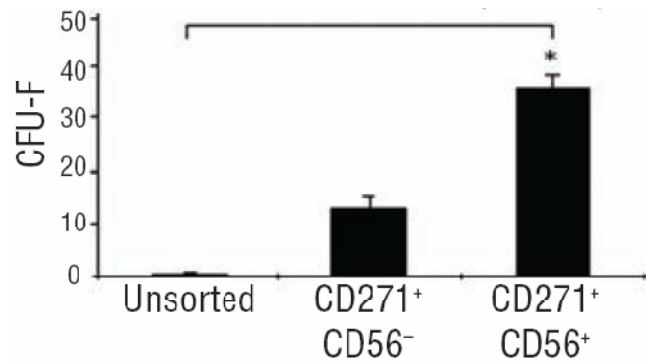


Figure 11: Nombre de CFU-F après mise en culture de cellules non sélectionnées, de cellules CD271+/CD56- ou de cellules CD271+/CD56+; *p<0,01 (Battula *et al*, 2009).

Selon le mode de préparation, les MSC donnent des protéomes et des transcriptomes différents (Wagner *et al*, 2006). Dans cette étude, nous avons utilisé la technique de sélection par adhérence au plastique, qui est la plus couramment utilisée en recherche et en clinique.

1.3.2. MSC et durée de culture

L'influence de la durée de culture des MSC sur leurs capacités de différenciation et de support de l'hématopoïèse est encore mal définie. Une première étude a montré qu'après 80 à 100 jours de culture, les MSC ne présentaient pas de changement dans leurs capacités prolifératives, de différenciation et de support de l'hématopoïèse. Cependant, une diminution de la longueur des télomères a été observée (Nakahara *et al*, 2005). Plus récemment, une équipe a montré une diminution de la croissance et une variation de la morphologie sans différence de phénotype dès 40 jours de culture. La capacité de différenciation adipocytaire et chondrocytaire diminue également avec la durée de culture. Comme dans l'étude précédente, une diminution de la longueur des télomères est observée sans variation de l'activité de la télomérase (Kim *et al*, 2009). Il a également été décrit que la capacité des MSC à se greffer dans la moelle hôte décline avec la durée de culture (Kyriakou *et al*, 2008).

1.3.3. Homing des MSC

Les MSC ont la faculté de s'implanter dans de nombreux tissus extra-hématopoïétiques et pourraient contribuer aux processus de régénération ou de réparation tissulaires. De nombreuses études ont montré que les MSC injectées par intraveineuse sont d'abord captées au niveau des poumons, à cause de leur taille et de leur potentiel d'adhésion, avant de migrer dans les autres tissus (Gao *et al*, 2001; Bentzon *et al*, 2005). Les MSC s'implantent préférentiellement dans les tissus lésés (Devine *et al*, 2003), que ce soit après irradiation corporelle totale ou ciblée (Chapel *et al*, 2003; Francois *et al*, 2006) ou, par exemple, après ligature d'une artère coronaire (Jiang *et al*, 2005). Le recrutement des MSC dans les tissus lésés impliquerait les axes SDF-1/CXCR4 et HGF/c-met (Wynn *et al*, 2004; Son *et al*,

2006). Elles retournent également dans les tissus hématopoïétiques tels que la moelle et la rate et peuvent y survivre très longtemps (Devine *et al*, 2001; Allers *et al*, 2004).

1.3.4. Sécrétion de cytokines par les MSC

L'étude du transcriptome des MSC de moelle osseuse a montré que ces cellules maintenues dans des conditions de culture normales expriment les ARNm de plusieurs cytokines telles que les interleukines (IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15), le monocyte-colony stimulating factor (M-CSF), le leukemia inhibitory factor (LIF), le Fms-like tyrosine kinase 3 (Flt-3 ligand), le stem cell factor (SCF), le granulocyte monocyte-colony stimulating factor (GM-CSF) et le granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). Ces cytokines et ces facteurs de croissance sécrétés par les MSC régulent la prolifération, la différenciation et la maintenance des HSC et de leurs précurseurs. En réponse à un traitement avec la cytokine inflammatoire IL-1 α , les MSC augmentent le taux d'expression des cytokines IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-11, G-CSF, GM-CSF, LIF. A l'inverse, l'expression de IL-7, IL-12, IL-14, IL-15, M-CSF, Flt-3 ligand et SCF ne semble pas être modifiée (Majumdar *et al*, 1998) (Tableau 5). Les MSC dérivées du sang de cordon ombilical ont le même profil cytokinique que les MSC de moelle osseuse (Jang *et al*, 2006). Dans notre étude, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'IL-6 et l'IL-8.

Tableau 5: Sécrétion de cytokines par les MSC.

Condition basale	Condition stimulée
IL-6	↑
IL-7	=
IL-8	↑
IL-11	↑
IL-12	=
IL-14	=
IL-15	=
M-CSF	=
LIF	↑
Flt-3 ligand	=
SCF	=
GM-CSF	↑
G-CSF	↑
	IL-1 α
	IL-1 β

↑ indique une augmentation de l'expression, = indique un maintien de l'expression en condition stimulée par l'IL-1 α par rapport à la condition basale. M-CSF: monocyte-colony stimulating factor, LIF: leukemia inhibitory factor, Flt-3: Fms-like tyrosine kinase 3, SCF: stem cell factor, GM-CSF: granulocyte monocyte-colony stimulating factor, G-CSF: granulocyte colony stimulating factor.

1.3.4.1. Interleukine 6 (IL-6)

IL-6 est une cytokine multifonctionnelle qui a un rôle majeur dans la réponse inflammatoire. Elle régule la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques de plusieurs lignées à différents stades de maturation (Kishimoto, 1989). En synergie avec l'IL-3, l'IL-6 stimule la prolifération de progéniteurs myéloïdes multipotents (Ikebuchi *et al*, 1987; Okada *et al*, 1992; Patchen *et al*, 1991; Ishibashi *et al*, 1989). La contribution spécifique de l'IL-6 dans l'homéostasie du système lympho-hématopoïétique a été évaluée dans le modèle murin IL-6 *-/-*, montrant une diminution nette dans le nombre de précurseurs clonogéniques et dans la fonction de repeuplement à long terme des cellules souches (Bernad *et al*, 1994). En plus de ces effets sur le début de l'hématopoïèse, ces souris KO montrent une déficience dans la fonction des cellules B et T (Kopf *et al*, 1995) ainsi que dans la phase aiguë de l'inflammation (Kopf *et al*, 1994). Tous ces résultats montrent le rôle important *in vivo* de l'IL-6 dans la survie et l'autorenouvellement des cellules souches/progéniteurs hématopoïétiques. L'IL-6 est produite par une variété de cellules comme les cellules B et T, les macrophages, les fibroblastes, les cellules stromales de la moelle osseuse et les cellules souches mésenchymateuses (Van Snick *et al*, 1990; Erices *et al*, 2002; Chiu *et al*, 1988). La neutralisation d'IL-6 entraîne également une diminution de la production des cellules myéloïdes matures et des cellules progénitrices capables de former des colonies dans les cultures à long terme (Hudak *et al*, 1992; Hauser *et al*, 1997). L'addition de hautes concentrations d'IL-6 à des cultures à long terme conduit à une augmentation du nombre de cellules totales et de progéniteurs (Hudak *et al*, 1992). IL-6 permet aussi la mise en cycle rapide des cellules souches tout en conservant leurs capacités de prolifération et de différenciation. Malheureusement, les capacités de migration et d'implantation de ces cellules au niveau médullaire sont compromises (Szilvassy *et al*, 2000). IL-6 est impliquée dans le mécanisme immunorégulateur médié par les MSC en inhibant partiellement la différenciation des cellules dendritiques mais ce n'est probablement pas le mécanisme principal (Djouad *et al*, 2007).

1.3.4.2. Interleukine 8 (IL-8)

L'IL-8 appartient à la famille des cytokines chémoattractives qui sont impliquées dans la chimiotaxie et l'activation des neutrophiles. *In vivo*, l'administration d'IL-8 induit une granulocytose et le relargage de leucocytes immatures de la moelle osseuse dans la circulation sanguine. IL-8 induit également la mobilisation rapide des progéniteurs et des cellules souches pluripotentes hématopoïétiques qui sont capables de repeupler la moelle de façon complète et permanente (Laterveer *et al*, 1995). Le prétraitement avec SCF pendant 2 jours favorise l'effet mobilisateur induit par IL-8 (Laterveer *et al*, 1996). IL-8 induit le relargage rapide systémique de MMP-9 en même temps que la mobilisation des HSC qui est prévenue par le prétraitement avec un anti-MMP-9 (Pruijt *et al*, 1999). Cependant, la mobilisation médiée par IL-8 n'est pas affectée chez la souris MMP-9 *-/-*, indiquant que MMP-9 n'est pas indispensable pour la mobilisation (Pruijt *et al*, 2002). MMP-9 n'a pas non plus de rôle dans la prise de

greffe car il n'y a pas de différence si des souris WT sont injectées avec de la moelle osseuse de souris WT ou de souris MMP-9 KO (Robinson *et al*, 2003). In vitro, IL-8 n'a pas d'effet sur le nombre de CFU-M et CFU-Mix formés en culture semi-solide. Une diminution du nombre de BFU-E (-29 %) et de CFU-GM (-36 %) est observée occasionnellement. En culture liquide, IL-8 stimule la prolifération des cellules CD34+ et un anticorps bloquant le récepteur de l'IL-8 inhibe leur prolifération (Corre *et al*, 1999).

1.4. Les médiateurs d'adhésion et de signalisation intercellulaire potentiellement impliqués dans les interactions HSC/MSC

1.4.1. L'adhésion médiée par VCAM-1/VLA4

VCAM-1 est exprimé de façon constitutive par les cellules stromales médullaires (Simmons *et al*, 1992), aussi bien par les cellules endothéliales que par les cellules fibroblastiques réticulaires (Jacobsen *et al*, 1996). En culture de Dexter, la neutralisation de VCAM-1 ou de VLA4 inhibe le développement tant des progéniteurs myéloïdes que lymphoïdes (Miyake *et al*, 1991b; Miyake *et al*, 1991a). La rétention des HSC in vivo dans le microenvironnement médullaire fait intervenir le couple VCAM-1/VLA4. Lors d'expériences de transplantation, l'injection aux souris hôtes d'un anticorps neutralisant VCAM-1 diminue l'implantation médullaire des HSC et augmente le recrutement dans la rate (Papayannopoulou *et al*, 1995). De plus, la neutralisation de VCAM-1 in vivo entraîne la mobilisation des HSC depuis la moelle vers le sang périphérique. Ces phénomènes ont également été observés dans différents modèles de xénogreffes à partir de HSC humaines (Zanjani *et al*, 1999; Peled *et al*, 2000). L'activation de la voie de signalisation Wnt, avec un ligand Wnt recombinant, par transduction rétroviral de Wnt ou en co-culture avec des cellules sécrétant Wnt, supprime l'expression de VCAM-1 par les cellules stromales de la moelle osseuse et les cellules hématopoïétiques (Malhotra & Kincade, 2009). Ceci démontre la complexité de l'étude de ces voies de signalisation qui interagissent les unes sur les autres.

1.4.2. La voie de signalisation Hedgehog

Avec la voie Wnt, la voie de signalisation Hedgehog est une des voies les plus importantes du développement. Elle est remarquablement conservée à travers l'évolution phylogénétique des espèces. Elle joue un rôle fondamental dans le développement embryonnaire de toute une série de tissus et d'organes tels que le système nerveux central, le squelette, les membres, les poumons, le pancréas ou le tractus gastro-intestinal (Hammerschmidt *et al*, 1997). Elle est également impliquée dans la régulation de la prolifération et de la survie cellulaires chez l'adulte. De manière simplifiée, les facteurs Hedgehog (HH) sont sécrétés et agissent de manière paracrine. Trois facteurs HH ont été décrits: Sonic Hedgehog (SHH), Indian

Introduction

Hedgehog (IHH) et Desert Hedgehog (DHH). La transduction du signal Hedgehog est contrôlée par les protéines transmembranaires Smoothened (SMO) et Patched (PTCH) et conduit à l'activation des facteurs de transcription GLI. En l'absence de facteur HH, le récepteur PTCH inhibe la protéine membranaire SMO, ce qui empêche l'activation des facteurs GLI (Figure 12A). La liaison du facteur HH au récepteur PTCH lève l'inhibition de SMO, permettant l'activation des facteurs de transcription GLI qui vont pouvoir aller activer l'expression des gènes cibles (Figure 12B). La cyclopamine inhibe spécifiquement la voie Hedgehog en se liant à SMO, empêchant la levée d'inhibition (Chen *et al*, 2002).

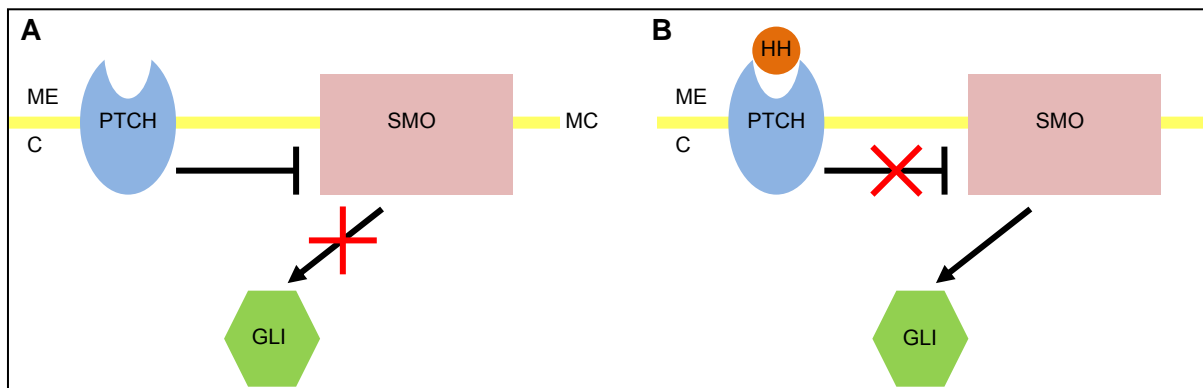


Figure 12: Représentation simplifiée de la voie de signalisation Hedgehog. **(A)** En l'absence de facteur HH, le récepteur PTCH inhibe la protéine membranaire SMO, ce qui empêche la transduction du signal et les facteurs de transcription GLI d'activer l'expression des gènes cibles. **(B)** La liaison du facteur HH au récepteur PTCH lève l'inhibition de SMO, permettant l'activation de la voie et des facteurs GLI. MC: membrane cellulaire, ME: milieu extracellulaire, C: cytoplasme.

1.4.2.1. La voie de signalisation Hedgehog et l'hématopoïèse

Les cellules hématopoïétiques et les cellules du stroma médullaire expriment les gènes IHH, SHH, PTCH, SMO et GLI suggérant que ces cellules sont capables de transduire le signal HH (Bhardwaj *et al*, 2001; Kobune *et al*, 2004). 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 HSC adultes mais pas dans l'hématopoïèse primitive (Gering & 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 amplifie *ex vivo* le nombre de SRC; DHH n'a pas d'effet (Bhardwaj *et al*, 2001; Kobune *et al*, 2004). En l'absence de PTCH, le développement dans la lignée lymphoïde T et B est bloqué au stade de progéniteurs lymphoïdes communs, empêchant la formation de cellules B et T périphériques. Par contre, les cellules myéloïdes se développent normalement chez la souris PTCH^{-/-} (Uhmann *et al*, 2007). Enfin, l'augmentation de la signalisation par IHH peut augmenter la prolifération et la différenciation des lymphocytes B spléniques et des lymphocytes T thymiques pendant l'hématopoïèse *in vivo* (Kobune *et al*, 2008a).

1.4.3. Les protéines de la morphogénèse osseuse (bone morphogenetic proteins, BMP)

Les protéines de la morphogénèse osseuse (bone morphogenetic proteins, BMP) appartiennent à la superfamille des facteurs de croissance dont le chef de file est le TGF- β (transforming growth factor β). Les BMP sont connues pour leur capacité à induire la formation des os et du cartilage. Elles interagissent avec des récepteurs spécifiques à la surface cellulaire appelés «bone morphogenetic protein receptors» (BMPR). La transduction du signal via BMPR résulte en la mobilisation des membres de la famille des protéines Smad, qui sont elles-mêmes divisées en trois classes: les R-Smad (R pour récepteur, comprenant les Smad-1, 2, 3, 5 & 8), les Co-Smad (Co pour commun dont le seul représentant pour l'instant est Smad-4) et les I-Smad (I pour inhibiteur, représentés par Smad-6 & 7). Les BMPR sont des hétérodimères composés de l'assemblage de deux protéines transmembranaires distinctes, les récepteurs de type I (BMPR-I) et les récepteurs de type II (BMPR-II). La fixation du ligand active d'abord le récepteur de type II qui induit ensuite la phosphorylation du récepteur de type I. Ce dernier déclenche enfin, par la phosphorylation de deux résidus sérines des protéines R-Smad, les cascades de réactions aboutissant à l'activation des gènes dans le noyau. La transcription des gènes est activée par des complexes protéiques composés de R-Smad phosphorylés et de Co-Smad; elle est au contraire inhibée par les protéines I-Smad (Figure 13).

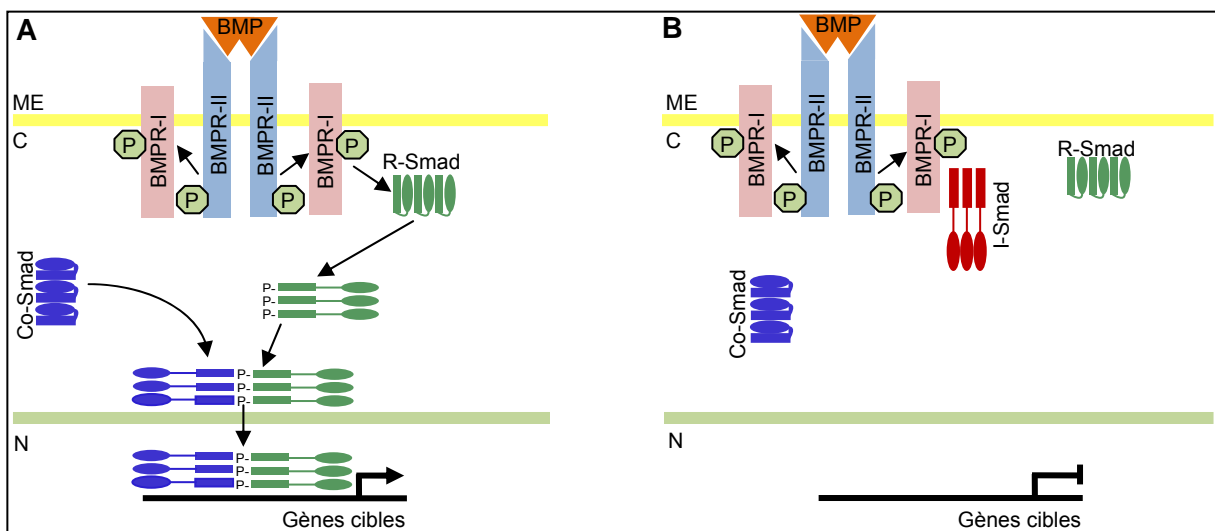


Figure 13: Représentation simplifiée de la voie de signalisation BMP. **(A)** La liaison du ligand dimérique BMP au récepteur BMPR-II stimule la phosphorylation du récepteur BMPR-I. R-Smad est phosphorylé par BMPR-I activé et peut alors interagir avec Co-Smad et être transloqué au niveau du noyau pour activer la transcription des gènes cibles. **(B)** I-Smad se lie au récepteur et empêche l'interaction de R-Smad avec ce dernier. ME: milieu extracellulaire, C: cytoplasme, N: noyau.

1.4.3.1. BMP et l'hématopoïèse

Les cellules souches hématopoïétiques humaines primitives expriment BMPR-I, Smad 1, 4 et 5 (Bhatia *et al*, 1999). Ceci suggère que ces cellules sont capables de répondre aux BMP. Des effets variables de BMP-4 sur la différenciation des cellules CD34+ dans les différentes lignées sanguines ont été rapportés. Dans une étude, par exemple, BMP-4 augmenterait significativement le nombre de BFU-E mais pas de CFU-GM à partir des cellules CD34+ de sang de cordon ombilical cultivées sans sérum (Fuchs *et al*, 2002). Cependant, une seconde étude démontre que BMP-4 fonctionnerait de façon synergique avec Epo et GM-CSF pour augmenter le nombre de CFU-E et CFU-GM dans des cultures à partir de cellules CD34+ de moelle osseuse (Detmer & Walker, 2002). Une troisième étude ne trouve aucun effet de BMP-4 sur le nombre de BFU-E ou de CFU-E formées *in vitro* à partir de cellules CD34+ de moelle osseuse (Maguer-Satta *et al*, 2003). Ces différences de résultats ont peut-être été provoquées par des variations au niveau des quantités de sérum utilisé, des cytokines hématopoïétiques, du temps de culture ou du traitement avec BMP-4 mais cela reste peu évident. Les rôles de BMP-2 et BMP-7 dans l'hématopoïèse sont également controversés. Une étude a montré que le traitement des cellules hématopoïétiques primitives avec BMP-2 ou BMP-7 inhiberait la prolifération et permettrait le maintien des progéniteurs hématopoïétiques primitifs en culture (Bhatia *et al*, 1999). Une étude plus récente a confirmé cet effet pour BMP-7 mais a, cependant, infirmé celui de BMP-2 (Grassinger *et al*, 2007).

1.4.4. La voie de signalisation Notch

La voie de signalisation Notch est une des voies les plus conservées; elle contrôle le destin cellulaire lors du développement et est impliquée dans la capacité du thymus à supporter la lymphopoïèse T (Artavanis-Tsakonas *et al*, 1999). Chez les mammifères, quatre récepteurs Notch peuvent être engagés par cinq ligands classés en deux groupes: Delta-like (1, 3 et 4) et Jagged (1 et 2). De manière simplifiée, à la suite de la liaison du ligand, deux clivages protéolytiques se réalisent, par une métalloprotéase ADAM et une activité γ -sécrétase, permettant le relâchement du domaine intracellulaire de Notch qui se dirige alors vers le noyau. Celui-ci, en se liant au facteur de transcription CBF-1, permet l'induction des gènes cibles (Brenner, 2000) (Figure 14). La γ -sécrétase est une molécule pouvant cliver le domaine intracellulaire du récepteur Notch et induire la cascade de signalisation. Des études s'intéressant aux inhibiteurs de la γ -sécrétase ont démontré que ces derniers pouvaient bloquer la transmission du signal Notch (Lindsell *et al*, 1995).

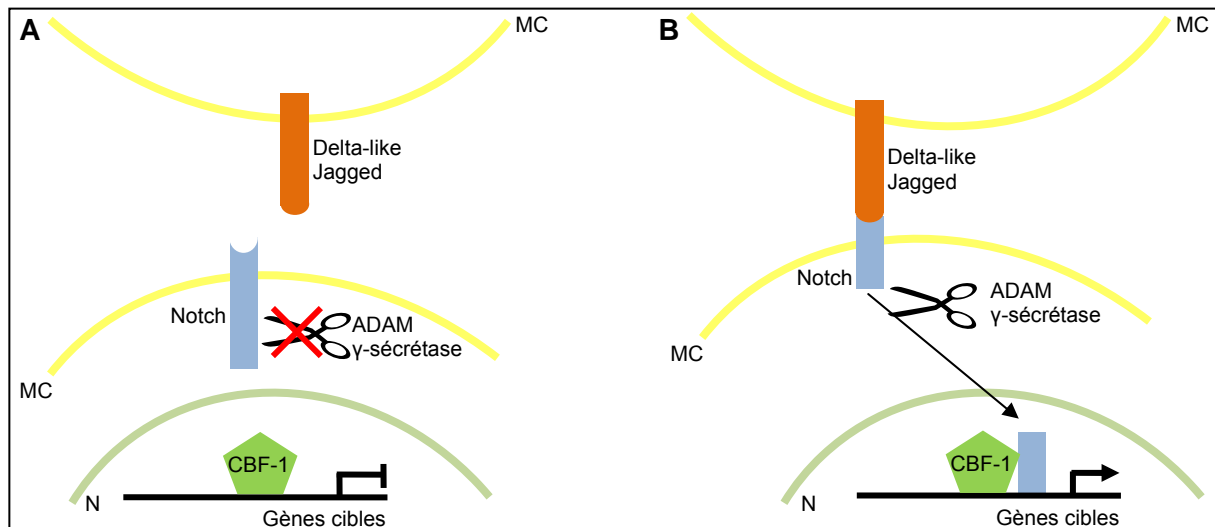


Figure 14: Représentation simplifiée de la voie de signalisation Notch. **(A)** Sans liaison du ligand Jagged ou Delta-like, le récepteur Notch n'est pas clivé, ce qui empêche la transduction du signal. **(B)** Suite à la liaison du ligand, deux clivages protéolytiques se réalisent, par une métalloprotéase ADAM et une activité γ -sécrétase, permettant la libération du domaine intracellulaire de Notch qui se dirige alors vers le noyau. Celui-ci, en se liant au facteur de transcription CBF-1, permet l'induction des gènes cibles. MC: membrane cellulaire, N: noyau.

1.4.4.1. La voie de signalisation Notch et l'hématopoïèse

Notch est exprimé par les précurseurs hématopoïétiques CD34+ (Milner *et al*, 1994) et par les MSC (Houwei *et al*, 2006). Jagged 1 est exprimé par les cellules stromales de la moelle osseuse (Li *et al*, 1998). La source du signal Notch qui régule les HSC est la niche endostéale. Les ostéoblastes produisent de grandes quantités de Jagged 1 et sont le support de la prolifération des HSC via la voie active Notch (Calvi *et al*, 2003). Le rôle de cette voie dans la myélopoïèse est très controversé. Plusieurs études montrent des résultats contradictoires. Une première équipe a montré que l'exposition à Jagged inhibait la myélopoïèse (Walker *et al*, 1999) tandis qu'une autre ne montre pas de défaut de la myélopoïèse à partir d'une moelle osseuse transduite par un rétrovirus avec une forme constitutivement active de Notch (Pui *et al*, 1999). D'autres études montrent que Jagged n'empêche pas la myélopoïèse (Karanu *et al*, 2003), mais Delta-like 1 bien (Ohishi *et al*, 2001; Ohishi *et al*, 2002). Pour étudier le rôle de la voie de signalisation Notch dans la lymphopoïèse, l'équipe de Jaleco a utilisé un système de co-culture. Ils ont observé que Delta-like 1 inhibe complètement la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques humains dans la lignée B alors qu'il favorise l'émergence des précurseurs des cellules T et NK. Par contre, Jagged 1 ne perturbe pas le développement des cellules B ou T/NK. (Jaleco *et al*, 2001). Notch jouerait un plus grand rôle sur l'autorenouvellement des HSC que sur leur différenciation (Milner & Bigas, 1999). Le groupe de Duncan a illustré que la voie Notch est fortement active dans les HSC, mais diminue après leur différenciation. Ils ont établi qu'une voie de signalisation Notch intacte est nécessaire pour le maintien des HSC indifférenciées médié par Wnt mais pas pour la survie ou l'entrée en cycle *in vitro* (Duncan *et al*, 2005). L'injection de cellules hématopoïétiques primitives

cultivées en présence de Jagged 1 révèle que celui-ci induit la survie et l'expansion de cellules souches capables de repeuplement pluripotent (Karanu *et al*, 2000). L'équipe de Delaney montre un effet dose dépendant du ligand Delta-like 1 sur la différenciation *ex vivo* et sur la capacité de repeuplement *in vivo* des cellules de sang de cordon ombilical. En effet, ils observent un meilleur repeuplement médullaire après culture des cellules CD34+ en présence de faibles concentrations de Delta-like 1 comparé au contrôle ou à des concentrations plus élevées (Delaney *et al*, 2005).

1.4.5. La voie de signalisation Wnt

La voie de signalisation Wnt joue un rôle important au cours du développement embryonnaire en modulant l'expression des signaux intercellulaires qui contrôlent la croissance, la migration, le déterminisme et la polarisation cellulaires. Elle a été particulièrement étudiée au cours du développement chez le nématode, la drosophile et les amphibiens, mais ses constituants sont très conservés chez les vertébrés. Dans les tissus adultes, elle participe au contrôle de la prolifération cellulaire. Lorsque la voie est inactive, la β -caténine est dégradée; lorsque la voie est active, elle est libérée dans le cytoplasme où elle exerce ses fonctions. Dans la position «OFF» (Figure 15A), la β -caténine fait partie intégrante d'un complexe multiprotéique composé de l'Axine, de la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β) et d'APC. Au sein de ce complexe, l'interaction entre l'Axine et la GSK3 β semble favoriser la phosphorylation de la β -caténine, processus qui permettra l'ubiquitinylation de la β -caténine et sa dégradation ultérieure par la voie du protéasome. En position «ON» (Figure 15B), l'activation des récepteurs LRP et Frizzled par la fixation de Wnt conduit à la phosphorylation de la protéine Dishevelled qui, par son association à l'Axine, empêche la GSK3 β de phosphoryler ses substrats, parmi lesquels se trouve la β -caténine, rendant ainsi la liberté à cette dernière. Lorsqu'elle n'est pas dégradée, la β -caténine s'accumule dans le cytoplasme. Elle joue un rôle dans l'adhérence cellulaire par son association avec la cadhérine E et l'actine du cytosquelette pour former les jonctions d'adhérence. Une autre fraction de la β -caténine libre est véhiculée dans le noyau où elle s'associe aux facteurs de transcription TCF, modulant ainsi leur activité et activant (ou inactivant) l'expression d'un grand nombre de gènes cibles (Behrens *et al*, 1996; Korinek *et al*, 1997). c-MYC est l'un d'entre eux et constitue le premier gène répondant à une telle régulation (He *et al*, 1998). Dkk-1 (Dickkopf) peut inhiber la voie en liant LRP, ce qui entraîne l'internalisation de celui-ci et donc l'impossibilité pour LRP de lier Wnt.

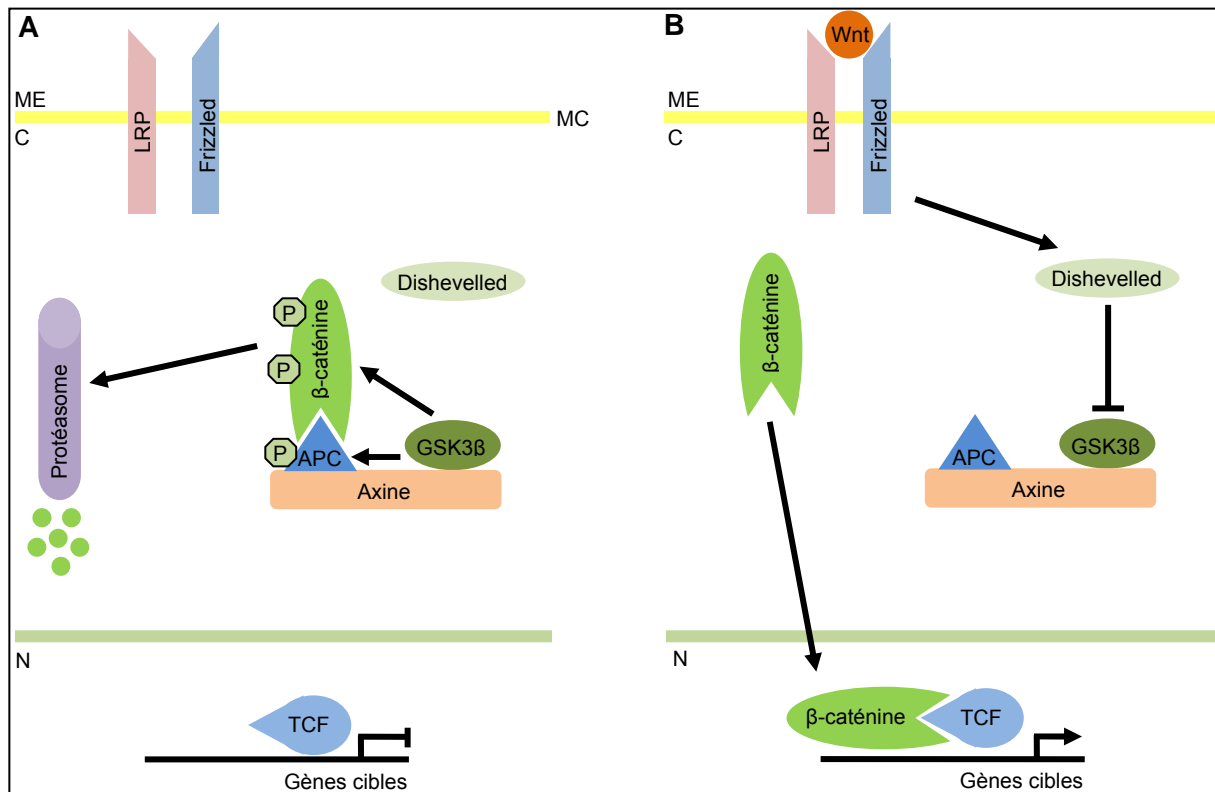


Figure 15: Représentation simplifiée de la voie de signalisation Wnt. **(A)** La β -caténine fait partie intégrante d'un complexe multiprotéique composé de l'Axine, de la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β) et d'APC. Au sein de ce complexe, l'interaction entre l'Axine et la GSK3 β semble favoriser la phosphorylation de la β -caténine, processus qui permettra l'ubiquitinylation de la β -caténine et sa dégradation ultérieure par la voie du protéasome. **(B)** L'activation des récepteurs LRP et Frizzled par la fixation de Wnt conduit à la phosphorylation de la protéine Dishevelled qui, par son association à l'Axine, empêche la GSK3 β de phosphoryler ses substrats parmi lesquels se trouve la β -caténine, rendant ainsi la liberté à cette dernière. Lorsqu'elle n'est pas dégradée, la β -caténine s'accumule dans le cytoplasme. La β -caténine libre est véhiculée dans le noyau où elle s'associe aux facteurs de transcription TCF, modulant ainsi leur activité et activant (ou inactivant) l'expression d'un grand nombre de gènes cibles. MC: membrane cellulaire, ME: milieu extracellulaire, C: cytoplasme, N: noyau.

1.4.5.1. La voie de signalisation Wnt et l'hématopoïèse

Les MSC expriment Wnt, Frizzled, LRP, Dkk-1, Dishevelled, GSK3 β , APC, β -caténine, TCF. La β -caténine est présente dans le noyau de 30 à 40 % des MSC (Etheridge *et al*, 2004). Les MSC sécrètent beaucoup Dkk-1 lorsqu'elles sont en phase proliférative. L'addition de Dkk-1 en culture favorise la prolifération de ces cellules tandis que l'addition d'un anticorps anti-Dkk-1 diminue la prolifération des MSC. L'inhibition de la voie de signalisation Wnt prédispose les MSC à entrer en cycle et inhibe l'ostéogénèse (Gregory *et al*, 2003; Gregory *et al*, 2005a; Gregory *et al*, 2005b). Les progéniteurs hématopoïétiques du foie fœtal murin ont montré 3 à 4 fois plus de colonies cellulaires hématopoïétiques *in vitro* lorsqu'elles étaient cultivées dans du milieu conditionné contenant Wnt5a (Austin *et al*, 1997). Une expérience similaire exécutée avec des progéniteurs hématopoïétiques humains Lin-CD34⁺ co-cultivés avec des cellules stromales transfectées avec Wnt2b, Wnt5a

ou Wnt10b montre 1,4 à 1,8 fois plus de cellules primitives CD34+ in vitro (Van Den Berg *et al*, 1998). Le groupe de Murdoch a montré que le fait d'injecter des souris avec du milieu conditionné contenant Wnt5a avant la transplantation de cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon ombilical humain augmentait la prise de greffe de plus de 3 fois (Murdoch *et al*, 2003). L'équipe de Reya a isolé des cellules Lin- c-kit^h Sca-1^h et Thy1.1^{lo} (KTSL) à partir de souris surexprimant le gène anti-apoptotique BCL-2 et les a transfectées avec une forme constitutivement active de β -caténine. Ceci a résulté en une expansion des cellules KTSL de 20 à 40 fois pendant plus de 2 mois (comparé aux cellules KTSL contrôles qui ne survivent pas 48 h). Les cellules KTSL transduites avec une forme constitutivement active de β -caténine et cultivées pendant 1 semaine se greffent aux hôtes irradiés tandis que les cellules non transduites ne se greffent pas (Reya *et al*, 2003). Cependant, récemment, une équipe a montré que la perte simultanée de β -caténine et de γ -caténine (homologue proche de la β -caténine) ne perturbe pas l'hématopoïèse ni la lymphopoïèse; excluant un rôle essentiel de la voie de signalisation Wnt durant celles-ci (Koch *et al*, 2008). Un groupe a décrit un mécanisme par lequel BMP inhibe la voie de signalisation Wnt. En présence de Wnt et de BMP simultanément, Dishevelled et Smad forment un complexe qui empêche Dishevelled d'inhiber GSK3 β , bloquant ainsi la voie de signalisation Wnt (Liu *et al*, 2006). Le rôle de la voie de signalisation Wnt dans l'hématopoïèse est encore mal défini et nécessite de nombreuses investigations.

1.5. But du travail

La capacité d'amplifier les HSC ex vivo aurait un impact important sur leur transplantation en clinique. On éliminerait ainsi en grande partie les difficultés liées au nombre insuffisant de HSC recueillies pour la transplantation, en particulier dans le cas du sang de cordon ombilical, qui contient un nombre fini de cellules, insuffisant pour permettre une reconstitution hématologique rapide et durable après greffe. Bien que des progrès significatifs aient été réalisés pour identifier les cytokines permettant le maintien, voire l'expansion modeste, des HSC in vitro, un protocole permettant leur amplification extensive reste à définir. Les résultats les plus prometteurs ont été obtenus en cultivant les HSC sur des couches de cellules nourricières, provenant de lignées de fibroblastes murins immortalisés. En raison du risque pathogène de telles lignées, l'application clinique d'un tel procédé reste difficile. Les MSC humaines pourraient remplacer les lignées stromales murines dans cette application. Elles soutiennent l'hématopoïèse ex vivo et facilitent la prise de greffe de HSC en co-transplantation. Elles sont également douées de propriétés immunomodulatrices et pourraient limiter l'incidence de la maladie du greffon contre l'hôte. Les MSC peuvent être obtenues chez le patient lui-même ou chez un donneur allogénique. Elles possèdent la capacité d'autorenouvellement et peuvent ainsi être propagées aisément en culture. Actuellement, ni la purification, ni l'expansion des MSC ne sont standardisées. Suivant les techniques de préparation des MSC, on obtient des populations cellulaires différentes qui ont des propriétés variables. Dans la première

Introduction

partie de cette étude, nous analysons l'influence du nombre de passages sur la capacité des MSC à soutenir l'expansion et le homing des HSC. Une caractérisation phénotypique et fonctionnelle des préparations de MSC a été effectuée à chaque passage afin de définir les critères qui reflètent le plus leurs activités biologiques. Dans la seconde partie de ce travail, nous étudions la régulation de l'activité pro-hématopoïétique des MSC à l'aide d'anticorps bloquants ou d'inhibiteurs. Nous nous intéressons plus particulièrement aux voies de signalisation Notch, Wnt, BMP et HH ainsi qu'à la molécule d'adhésion VCAM-1 et aux cytokines IL-6 et IL-8.

Matériel & Méthodes

2. Matériel et méthodes

2.1. Les cellules

2.1.1. Les cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon ombilical (cellules CD34+)

Le sang de cordon ombilical humain a été recueilli stérilement après accouchement. Tous les échantillons ont été traités dans un délai de 24 heures. Dans les expériences exigeant un grand nombre de cellules, les échantillons ont été mis en commun. Tout le matériel a été acquis avec le consentement éclairé de la mère et utilisé selon les directives établies par le Comité d’Ethique de l’Université de Liège.

2.1.1.1. Séparation des cellules mononucléées sur gradient de densité

Les éléments figurés du sang, placés sur un milieu Ficoll de haute densité, subissent durant la centrifugation une migration différentielle qui conduit à leur séparation en deux fractions; d’une part, les érythrocytes et granulocytes (neutrophiles, éosinophiles, basophiles) qui sédimentent au fond du tube et, d’autre part, les lymphocytes, monocytes et plaquettes qui se localisent au niveau de l’interface plasma-Ficoll.

Le sang de cordon ombilical a été récupéré de façon stérile et dilué 2 fois avec du PBS (Phosphate Buffer Saline) 1 % PS (Pénicilline/Streptomycine) (Lonza, Verviers, Belgique). Le mélange a ensuite été déposé délicatement sur le Ficoll™ paque plus (GE Healthcare, Uppsala, Suède), dans une proportion deux tiers un tiers. Après une centrifugation à 500 g, durant 20 minutes à température ambiante, les cellules mononucléées de l’interface ont été récupérées et centrifugées à 500 g durant 8 minutes à 4 °C. A ce terme, le culot a été lavé avec du PBS 1% PS et centrifugé à nouveau à 500 g durant 8 minutes à 4 °C. Le culot de cellules mononucléées pouvait ainsi être utilisé pour le marquage magnétique.

2.1.1.2. Marquage magnétique des cellules mononucléées

Après récupération de ces cellules mononucléées, les cellules exprimant l’antigène CD34 sont marquées spécifiquement avec un anticorps monoclonal anti-CD34 couplé à un haptène (réactif A2) qui est reconnu par un deuxième anticorps lié à une microbille ferrique (réactif B). L’ajout préalable de FcR Blocking Reagent Human (réactif A1) permet d’éliminer les liaisons aspécifiques en bloquant les récepteurs de la partie constante des immunoglobulines.

Matériel et méthodes

Le culot a été incubé 30 minutes à 4 °C avec 25 µl de réactif A1 et 25 µl de réactif A2. Au terme de cette incubation, les cellules mononucléées ont été lavées avec 10 ml de PBS 1 % PS avant d'être centrifugées à 500 g durant 8 minutes à 4 °C. Une incubation de 30 minutes a été ensuite réitérée en présence de 25 µl de réactif B. Le culot a ensuite été lavé dans 10 ml de PBS 1 % PS et récolté par une centrifugation de 8 minutes à 500 g, avant d'être remis en suspension dans du PBS 1 % PS.

2.1.1.3. Séparation magnétique des cellules CD34+

La sélection positive des cellules CD34+ est effectuée par MACS (Magnetic Activated Cell Separation CD34+ isolation kits, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne). Seules les cellules CD34+ marquées par les microbilles ferriques seront retenues dans la colonne chromatographique placée dans un champ magnétique important. Le retrait de l'aimant permet ainsi la récupération de celles-ci.

L'aimant désinfecté a été équipé d'une colonne surmontée d'un pré-filtre qui permet d'éliminer les agrégats cellulaires de l'échantillon marqué. La colonne a été humidifiée à l'aide de 2 ml de PBS 1 % PS. La suspension cellulaire a ensuite été passée dans la colonne et, afin de récolter toutes les cellules mononucléées, le tube a été rincé avec 3 ml de PBS 1 % PS. L'éluat a ensuite été ajouté à la colonne. Le matériel non marqué (fraction négative) est passé au travers de la colonne tandis que les cellules CD34+ magnétiquement marquées (fraction positive) ont été retenues dans celle-ci. Dans le cas où des cellules CD34+ ne se seraient pas accrochées, la fraction négative a été passée une seconde fois dans la colonne. Après le retrait de celle-ci du champ magnétique, la fraction positive a été expulsée de la colonne à l'aide d'un piston dans 5 ml de PBS 1 % PS. Pour augmenter la pureté des cellules CD34+, la manipulation a été réitérée avec la fraction positive. La fraction positive finale a été comptée sur lame de Fuchs-Rosenthal.

2.1.1.4. Evaluation de la pureté des cellules CD34+

Les suspensions de cellules mononucléées de sang de cordon ombilical contiennent souvent moins d'un pourcent des cellules CD34+; un marquage est donc nécessaire pour évaluer si la pureté désirée est obtenue (> 97 %).

Environ 50000 cellules ont été additionnées de 5 µl d'IgG conjugué au PE (phycoerythrin) ou de 5 µl d'anti-CD34 conjugué au PE (BD Biosciences, Erembodegem, Belgique). Au terme d'une incubation de 30 minutes à 4 °C, les cellules ont été rincées avec 2 ml de PBS 1 % PS. Après avoir été récupéré par une centrifugation à 500 g durant 8 minutes, le culot cellulaire a été suspendu dans 300 µl de PBS 1 % formaldéhyde (Vel, Leuven, Belgique). Les échantillons ont été acquis à l'aide du BD FACSCanto II (BD Biosciences) et analysés avec le logiciel BD FACS DiVa (BD Biosciences).

2.1.2. Les cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse ou MSC

Les cellules ont été prélevées de la crête iliaque d'un volontaire adulte sain par ponction médullaire. Tout le matériel a été acquis avec le consentement éclairé du donneur et utilisé selon les directives établies par le Comité d'Éthique de l'Université de Liège.

La récupération des cellules mononucléées de moelle osseuse s'est faite sur base de Ficoll selon le principe précédemment énoncé au point 2.1.1.1. Environ $5 \cdot 10^5$ cellules/cm² ont été mises en culture dans du MSCGM (mesenchymal stem cell growth medium; Lonza) et incubées à 37 °C sous 5 % de CO₂ en atmosphère humide. Après 24 heures, les cellules non adhérentes ont été éliminées et le milieu a été remplacé. Deux fois par semaine, les cultures ont été entretenues jusqu'à l'obtention de 90 % de confluence. A ce terme, les cellules adhérentes ont été détachées avec une solution de trypsine (Lonza) et remises en culture à $5 \cdot 10^3$ cellules/cm² durant 10 passages. Vu l'abondance de cellules récoltées après chaque passage, une congélation a été systématiquement effectuée. Les MSC utilisées dans les expériences décrites ci-après ont été isolées de trois donneurs sains différents.

2.1.3. Congélation des cellules

Après récupération des MSC ou des cellules CD34+ par centrifugation à 500 g durant 8 minutes, le culot cellulaire a été suspendu dans 900 µl de sérum de veau foetal (Lonza). Neuf cents µl de sérum de veau foetal supplémenté de 20 % de diméthylsulfoxyde (Vel) ont ensuite été ajoutés goutte-à-goutte sur les cellules. L'entièreté de cette manipulation a été réalisée sur glace. De petites aliquotes de cellules en suspension ont ensuite été placées durant 24 heures à - 80 °C dans une boîte de congélation progressive de 1 °C par minute (5100 Cryo 11c Freezing Container) (Wessington Cryogenics, Tyne and Wear, Angleterre) avant d'être transférées dans l'azote liquide à - 180 °C.

2.1.4. Décongélation des cellules

Après décongélation de l'aliquote de cellules dans un bain-marie préalablement chauffé à 37 °C, la suspension cellulaire a été récupérée de façon stérile et lavée deux fois avec du milieu de culture ajouté goutte-à-goutte afin de ne pas soumettre les cellules à un choc osmotique. A ce terme, les cellules ont été récupérées par centrifugation à 500 g durant 8 minutes et suspendues dans du milieu de culture.

2.2. Etude de la capacité de différenciation des MSC

La capacité de différenciation en ostéocytes, chondrocytes et adipocytes est considérée comme une propriété cardinale des MSC.

2.2.1. Différenciation ostéocytaire

Environ 6000 MSC par cm² ont étéensemencées dans 2 puits d'une plaque 6 puits avec 2 ml de MSCGM et incubées à 37 °C pendant 24 heures. A ce terme, le milieu d'un des 2 puits a été changé par du MSCGM supplémenté avec 10 mM β -glycérol phosphate, 0,1 μ M dexaméthasone et 60 μ M ascorbate 2-phosphate. Le deuxième puits a servi de contrôle négatif. Les cellules ont été incubées à 37 °C pendant 3 semaines avec un entretien du milieu 2 fois par semaine. Au terme de ces 3 semaines, les cellules ont été fixées dans du PBS 10 % formaldéhyde pendant 20 minutes à température ambiante puis colorées à l'Alizarin Red pH 4,1 (1 mg/ml dans de l'éthanol 70 %) pendant 20 minutes à température ambiante (le tout provenant de Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique). L'Alizarin Red colore en rouge les dépôts calciques.

2.2.2. Différenciation adipocytaire

Environ 20000 MSC par cm² ont étéensemencées dans 2 puits d'une plaque 6 puits avec 2 ml de MSCGM et incubées à 37 °C jusqu'à la confluence. Ensuite, le milieu d'un des 2 puits a été changé par du MSCGM supplémenté avec 5 μ g/ml insuline, 60 μ M indométhacine et 1 μ M dexaméthasone. Le deuxième puits a servi de contrôle négatif. Les cellules ont été incubées à 37 °C pendant 3 semaines avec un entretien du milieu 2 fois par semaine. Au terme de ces 3 semaines, les cellules ont été fixées dans du PBS 10 % formaldéhyde pendant 20 minutes à température ambiante puis colorées à l'Oil Red O (7 mg/ml dans de l'éthanol) pendant 20 minutes à température ambiante (le tout provenant de Sigma-Aldrich). L'Oil Red O colore en rouge les vacuoles lipidiques.

2.2.3. Différenciation chondrocytaire

Environ 500000 MSC ont étéensemencées dans 2 tubes en polystyrène de 10 ml et centrifugées à 500 g pendant 8 minutes. Dans un tube, les cellules ont été recouvertes de MSCGM (tube contrôle) et, dans l'autre tube, de MSCGM supplémenté de 10 ng/ml TGF- β 3 (ImmunoTools, Friesoythe, Allemagne), 50 μ M ascorbate 2-phosphate et 0,5 μ g/ml insuline. Les culots de cellules ont été incubés à 37 °C pendant 3 semaines avec un entretien de la moitié du milieu 2 fois par semaine. Au terme de ces 3 semaines, les cellules ont été fixées dans de la paraffine. Les coupes ont été colorées avec du bleu de toluidine (50 % isopropanol + 50 % PBS + poudre de bleu de toluidine) (Sigma-Aldrich) pendant 30 minutes à 37 °C puis rincées au PBS et à l'eau distillée. Ensuite, les lames ont été déshydratées dans de l'isopropanol (Vel) avant d'être montées. Le bleu de toluidine colore en bleu les protéoglycans.

2.3. CFU-F (Colony forming unit-fibroblast)

Ensemencées à faible concentration, les MSC forment des colonies cellulaires fibroblastiques. Les MSC sont ainsi appelées colony-forming unit-fibroblast (CFU-F). La proportion de CFU-F par rapport au nombre de cellules totales présentes dans une préparation donnée est le reflet de l'enrichissement en MSC.

Environ 5 à 2000 MSC par cm² ont été ensemencées dans des T12,5 dans 3 ml de MesenCult® complet medium (Stem Cell Technologies, Myelan, France) pendant 14 jours à 37 °C. A ce terme, les colonies ont été fixées au méthanol (VWR, Leuven, Belgique) pendant 5 minutes à température ambiante puis mises à sécher. Ensuite, les colonies ont été colorées avec une solution de Giemsa (Sigma-Aldrich) pendant 5 minutes à température ambiante puis rincées à l'eau distillée.

2.4. Analyse par cytométrie en flux des préparations de MSC

Les anticorps suivants ont été utilisés pour la caractérisation phénotypique des MSC: anti-CD13, anti-CD14, anti-CD36 conjugués à la fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-CD11b, anti-CD49a, anti-CD73, anti-CD90, anti-CD106, anti-CD146, anti-CD271, anti-SSEA4 conjugués au PE, anti-CD45 conjugué à l'allophycocyanine (APC), anti-GD2 purifié (tous de BD Biosciences), anti-CD105 conjugué au PE (Serotec, Düsseldorf, Allemagne), anti-STRO1 conjugué au PE (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Allemagne), anti-mouse IgG conjugué à l'APC (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Angleterre), anti-Jagged 1 biotinylé (R&D systems, Abingdon, Angleterre) et de la streptavidine conjuguée à l'APC (Invitrogen, Merelbeke, Belgique). Les cellules ont été incubées avec les anticorps ou les contrôles IgG pendant 30 minutes à 4 °C dans l'obscurité. Ensuite, les cellules ont été lavées avec du PBS et fixées dans du PBS 1 % formaldéhyde. Les échantillons ont été acquis à l'aide du BD FACSCanto II et analysés avec le logiciel BD FACS DiVa.

2.5. Etude de la sécrétion de cytokines-chimiokines par les MSC

2.5.1. Conditionnement du milieu de culture

Pour étudier la sécrétion de cytokines-chimiokines par les MSC, celles-ci ont été cultivées jusqu'à la confluence. A ce terme, le milieu de culture MSCGM a été remplacé par du milieu LTC (voir composition au point 2.7.1). Après 3 ou 10 jours, le milieu a été récupéré et congelé à - 20 °C. Dans une autre expérience, le milieu a été conditionné de la même manière mais 10 ng/ml d'IL-1 α ont été ajoutés dans la culture un jour sur deux. Ces milieux de culture conditionnés ont été utilisés pour effectuer les manipulations décrites aux points 2.5.2 et 2.5.3.

2.5.2. RayBio® human cytokine antibody arrays

Le système de «protein arrays» permet de détecter simultanément les niveaux d'expression de plusieurs cytokines-chimiokines dans du milieu conditionné. Ces molécules sont capturées par des anticorps fixés sur une membrane puis révélées par un système chimioluminescent. Le protocole du kit RayBio® human cytokine antibody arrays (RayBiotech, Norcross, GA) recommandé par le fabricant a été effectué. Les molécules suivantes ont été analysées: BMP-4, BMP-7, Flt-3 ligand, G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-15, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, LIF, L-selectin, SCF, SDF-1, TGF β 1, TPO, VCAM-1, ICAM-1, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-10, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2 et TIMP-4.

2.5.3. Cytometric Bead arrays

Le CBA (cytometric bead arrays) consiste en un immunoassay sur billes. Des microbilles de taille homogène sont identifiables en fonction de leurs différences d'intensité de fluorescence rouge et portent chacune des anticorps de capture dirigés contre différentes protéines solubles. Après incubation avec l'échantillon, les protéines présentes qui se sont fixées à l'anticorps de capture sont détectées avec des anticorps de révélation couplés au PE. Grâce à des standards, les protéines mises en évidence peuvent être quantifiées. Le kit BD CBA Flex Set (BD Biosciences) a été utilisé pour détecter la sécrétion de l'IL-6 et l'IL-8.

2.6. Etude de l'expression de Jagged 1

2.6.1. RT-PCR

L'ARN a été isolé à l'aide du kit RNeasy Blood & Tissue (Qiagen, K J Venlo, Pays-Bas). La concentration et la pureté de l'ARN ont été estimées par mesure de la densité optique. Pour éviter les contaminations par de l'ADN génomique, l'ARN a été préalablement traité avec de la DNase (Fermentas GMBH, St.Leon-Rot, Allemagne) à 37 °C pendant 30 minutes. La synthèse d'ADNc a été effectuée à l'aide du kit RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas). L'analyse de l'ADNc a été effectuée par PCR en temps réel. L'amplification a été effectuée en utilisant l'ABI Prism 7700 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA). Un mélange réactionnel contenant 10 μ l de Power SYBR® Green PCR master mix (Applied Biosystems), l'ADNc, les amorces sens et antisens a été utilisé. L'amorce sens du gène Jagged 1 était AGGAGATGATGTCACCAGGTCTTAC et l'amorce antisens était GCGGAAACATTCTTCAAATATTCA. Le gène de référence était β 2M (cf. Tableau 6 pour les séquences des amorces). La quantité relative de l'expression du gène de Jagged 1 a été calculée en utilisant la méthode comparative des Ct. Une expérience de validation a été effectuée pour confirmer que le rendement de la cible et de la référence était similaire. La valeur absolue de la pente des Δ Ct en fonction du logarithme de la quantité d'ADN était inférieure à 0,1, comme recommandé par le fabricant.

2.6.2. Western blot

Le «Western blot» permet de détecter la présence d'une protéine particulière dans les extraits cellulaires en utilisant un anticorps spécifique. Les protéines sont séparées par une migration sur gel dénaturant. Elles sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose qui est incubée dans une solution contenant l'anticorps spécifique. L'anticorps fixé à la protéine est reconnu par un second anticorps couplé à une enzyme dont l'activité est révélée grâce à un substrat chemoluminescent.

2.6.2.1. Migration sur gel d'acrylamide (PAGE)

L'électrophorèse a été effectuée à travers un gel d'acrylamide discontinu. La première partie du gel contenait 4,5 % d'acrylamide (15 % v/v de mélange acrylamide-bisacrylamide 30/0,8 %, 125 mM Tris pH 6,8, 0,2 % p/v SDS, 6,25 mM EDTA pH 7, 0,12 % p/v APS et 0,2 % v/v Temed) et permettait de concentrer les protéines. La seconde partie du gel contenait 12 % d'acrylamide (40 % v/v de mélange acrylamide-bisacrylamide 30/0,8 %, 375 mM Tris pH 8,8, 0,2 % p/v SDS, 10 % v/v glycérol, 6,225 mM EDTA, 0,08 % p/v APS, 0,1 % v/v Temed) et permettait de séparer les protéines. Les extraits protéiques, additionnés de 1/5 volume de tampon de charge (325 mM Tris pH 6,8, 15 % p/v SDS, 50 % v/v glycérol, 25 % v/v β -mercaptoéthanol, 0,005 % v/v bleu de bromophénol), ont été dénaturés 3 minutes à 100 °C avant leur dépôt sur gel. Le marqueur «Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus» (Fermentas) a permis de visualiser la migration des protéines et d'évaluer leur poids moléculaire. Les protéines ont migré à travers le gel de concentration sous un ampérage constant de 20 mA. Lorsqu'elles atteignaient le gel de séparation, l'ampérage était augmenté à 40 mA. La migration a été réalisée dans un tampon TEGS (0,4 M glycine, 50 mM Tris, 2 mM EDTA pH 7, 0,5 % p/v SDS).

2.6.2.2. Transfert sur membrane de nitrocellulose

Une fois la migration des protéines achevée, le gel a été lavé dans du tampon de transfert (0,2 M glycine, 25 mM Tris, 20 % v/v méthanol, pH 8,3). Les extraits protéiques ont ensuite été transférés par électro-transfert (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK) sur une membrane de nitrocellulose «Amersham Hybond-P» (GE Healthcare), en présence de tampon de transfert, sous un ampérage constant de 120 mA durant 2 heures.

2.6.2.3. Immunoblot

Afin d'empêcher une fixation non spécifique des anticorps sur la membrane, celle-ci a été placée durant une nuit dans une solution de blocage constituée de tampon TBS-T (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0,1 % p/v Tween) contenant 5 % p/v de lait en poudre (Nestlé, Bruxelles, Belgique). Après 3 lavages de 5 minutes dans du tampon TBS-T, la membrane a été incubée 2 heures à température ambiante et sous agitation avec l'anticorps primaire: IgG polyclonales de chèvre anti-Jagged 1 ou anti-actine (Santa Cruz Biotechnology). Celui-ci a été dilué dans du TBS-T additionné

Matériel et méthodes

de 10 % de «Milk Diluent» (KPL, Gaithersburg, Maryland, USA). Trois lavages de 5 minutes ont à nouveau été réalisés, puis la membrane a été incubée dans une solution de TBS-T contenant l'anticorps secondaire IgG de lapin anti-chèvre couplé à la peroxydase (R&D systems) pendant une heure à température ambiante sous agitation.

2.6.2.4. Révélation

Les protéines reconnues par l'anticorps primaire ont été révélées au moyen du kit «ECL Western Blotting» (GE Healthcare). Un mélange (proportions égales) des réactifs 1 et 2 a été ajouté à la membrane (0,125 ml de mélange/cm²). Le mélange de réactifs contient un substrat de la peroxydase, le luminol. En conditions alcalines, l'enzyme catalyse l'oxydation du luminol qui s'accompagne d'une émission de lumière qui impressionne le film autoradiographique. Après incubation d'une minute, l'excès de réactif a été éliminé et la membrane a été exposée à un film autoradiographique.

2.7. Culture à long terme

2.7.1. Principe

Les cellules stromales sont importantes pour le maintien de l'activité des progéniteurs primitifs. La co-culture avec des cellules stromales est à la base du système dit de culture à long terme (long term culture, LTC). Les cellules stromales utilisées dans les cultures à long terme entraînent une prolifération minimale des cellules hématopoïétiques. Après 5 à 6 semaines de culture, seuls les progéniteurs primitifs sont encore présents dans la culture; les autres progéniteurs plus différenciés ne peuvent survivre aussi longtemps, car ils subissent plus rapidement une différenciation terminale.

Dans un puits d'une plaque 12 puits, 5000 cellules CD34+ de sang de cordon ombilical ont été déposées sur des MSC à confluence récoltées à différents passages dans 1 ml de milieu de culture à long terme (LTC) composé de l' α -MEM supplémenté de 8 % de sérum de cheval, 8 % de sérum de veau fœtal, 0,2 mM de glutamine, 100 U/ml de pénicilline, 100 U/ml de streptomycine (tous de Lonza), 0,1 mM de 2-mercaptoéthanol (Invitrogen) et 0,2 mM inositol (Sigma-Aldrich). Pour les conditions sans contact, les cellules CD34+ ont été séparées des MSC par une membrane perméable avec des pores de 0,4 μ m. Les cultures ont été maintenues à 37 °C dans 5 % de CO₂ avec un entretien hebdomadaire de la moitié du milieu. Après 3 semaines, les cultures ont été trypsinisées et lavées pour effectuer les analyses suivantes (Figure 16A).

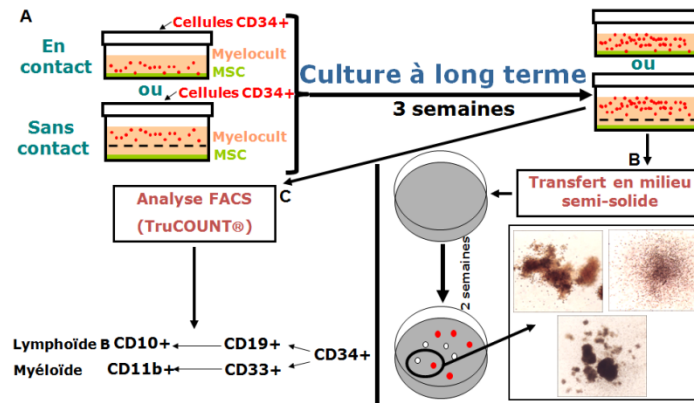


Figure 16: Plan d'expérimentation: culture à long terme. **(A)** 5000 cellules CD34+ de sang de cordon ombilical ont été déposées sur des MSC à confluence. Pour les conditions sans contact, les cellules CD34+ ont été séparées des MSC par une membrane perméable. Après 3 semaines, les cultures ont été trypsinisées et lavées pour effectuer les analyses suivantes. **(B)** La persistance des progéniteurs primitifs est mise en évidence en transférant le contenu de la culture à long terme dans un milieu semi-solide. Dans ce milieu, les progéniteurs primitifs persistants vont se différencier et donner naissance à des colonies secondaires. **(C)** Le contenu de la culture est également récupéré pour effectuer un comptage par cytométrie en flux du nombre de cellules positives pour les antigènes CD34 pour les cellules immatures, CD33 et CD11b pour la lignée myéloïde, CD19 et CD10 pour la lignée lymphoïde.

2.7.2. Enumération des progéniteurs clonogènes en méthycellulose

La persistance des progéniteurs primitifs est mise en évidence en transférant le contenu de la culture à long terme dans un milieu semi-solide. Dans ce milieu, les progéniteurs primitifs persistants vont se différencier et donner naissance à des colonies secondaires.

Un tiers de la culture à long terme a été transféré en duplicata dans un milieu semi-solide consistant en du MethoCult® GF+ H4435 (Stem Cell Technologies). Après une incubation supplémentaire de 2 semaines à 37 °C, les colonies secondaires ont été comptées (Figure 16B).

2.7.3. Analyse phénotypique des cellules amplifiées

2.7.3.1. Phénotype général

Les cellules restantes ont été récoltées pour une analyse par cytométrie en flux. Les nombres absolus de cellules CD34+, CD10+, CD19+, CD11b+ et CD33+ amplifiées en culture ont été déterminés en utilisant des TruCount tubes (BD Biosciences) contenant un nombre connu de billes (± 50000) (Figure 16C). Pour calculer le nombre exact de cellules, la formule suivante a été utilisée:

$$\frac{\text{Nombre de billes dans le tube}}{\text{Nombre de billes comptées}} \times \text{Nombre de cellules comptées} \times 3^*$$

* car un tiers de la culture a été utilisé.

Matériel et méthodes

Les anticorps suivants ont été utilisés: l'anti-CD34 conjugué à l'APC, l'anti-CD10 conjugué au PE-Cy7, l'anti-CD19 conjugué à l'APC-Cy7, l'anti-CD11b conjugué au PE et l'anti-CD33 conjugué au PerCP-Cy5.5 (tous de BD Biosciences). Les cellules ont été incubées avec les anticorps ou les contrôles IgG pendant 30 minutes à 4 °C dans l'obscurité. Ensuite, les cellules ont été lavées avec du PBS et fixées dans du PBS 1 % formaldéhyde. Les échantillons ont été acquis à l'aide du BD FACSCanto II et analysés avec le logiciel BD FACS DiVa.

2.7.3.2. Phénotype spécifique des cellules B

Le stade de maturation des cellules B générées après 3 semaines de co-culture en contact avec des MSC a été étudié par cytométrie en flux. Les anticorps suivants ont été utilisés: anti-chaînes légères κ conjugué au FITC, anti-chaînes légères λ conjugué au PE, anti-chaînes lourdes μ conjugué au FITC et anti-CD79a conjugué au PE (tous de BD Biosciences). Pour le marquage extracellulaire, les cellules ont été incubées avec les anticorps ou les contrôles IgG pendant 30 minutes à 4 °C dans l'obscurité. Ensuite, les cellules ont été lavées avec du PBS et fixées dans du PBS 1 % formaldéhyde. Pour le marquage intracellulaire, les cellules ont été préalablement fixées et perméabilisées à l'aide du kit BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization (BD Biosciences). Les échantillons ont été acquis à l'aide du BD FACSCanto II et analysés avec le logiciel BD FACS DiVa.

2.7.4. Expression de gènes spécifiques des cellules B

Le stade de maturation des cellules B générées a également été évalué par une analyse RT-qPCR des gènes B spécifiques. L'extraction d'ARN, la transcription inverse ainsi que la PCR en temps réel ont été effectuées comme décrit au point 2.6.1. Les gènes cibles étaient EBF, $\lambda 5$, Pax-5, RAG-1, TdT et VpreB (cf. Tableau 6 pour les séquences des amorces). Le gène de référence était $\beta 2M$. La quantité relative des gènes cibles a été calculée en utilisant la méthode des courbes standards recommandée par Applied Biosystems.

Tableau 6: Séquences des amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'étude de l'expression de gènes spécifiques des cellules B.

Nom des amorces	Séquences
$\beta 2M$	Sens: 5'-GAGTATGCCTGCCGTGTG-3' Antisens: 5'-AATCCAAATGCGGCATCT-3'
EBF	Sens: 5'-GATACGGCTCTGCCGCAAT-3' Antisens: 5'-CAGCTGAGCCGTTGAGGAA-3'
Pax-5	Sens: 5'-TGGAGGATCCAAACCAAAGG-3' Antisens: 5'-GGCAAACATGGTGGGATTTT-3'
RAG-1	Sens: 5'-CATCAAGCCAACCTTCGACAT-3' Antisens: 5'-CAGGACCATGGACTGGATATCTC-3'
TdT	Sens: 5'-TTGCCCTGTTGGGATGGA-3' Antisens: 5'-TCCGCTCATGTGTGGCATAG-3'
VpreB	Sens: 5'-GACATCGGTGTGTACAGCGTCTA-3' Antisens: 5'-TGGCTCTTGTCTGATTGTGAGAA-3'

2.8. Greffe de cellules souches hématopoïétiques aux souris NOD/SCID

Environ 24 heures avant la greffe, des souris NOD/SCID âgées de 2 mois ont été irradiées à 3 Gy par une source de ^{137}Cs (GammaCell 40, Nordion, Ontario, Canada). Ensuite, 4 heures avant la greffe, 10 jours et 21 jours après celle-ci, les souris ont reçu 20 μl d'anti-asialo GM1 antiserum (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Allemagne) par injection intrapéritonéale. Ce produit permet d'inhiber les cellules NK de la souris. Les souris ont reçu $1,5 \cdot 10^5$ cellules CD34+ non cultivées ou le produit d'expansion de $1,5 \cdot 10^5$ cellules CD34+ co-cultivées dans du milieu LTC pendant une semaine en contact avec des MSC à confluence récoltées aux passages 1 à 10 (Figure 17A). D'autres souris ont été greffées avec le produit d'expansion de $1,5 \cdot 10^5$ cellules CD34+ co-cultivées dans du milieu LTC pendant une semaine séparées des MSC de passage 4 à confluence par une membrane perméable avec des pores de $0,4 \mu\text{m}$ (Figure 17B). Des souris supplémentaires ont été injectées avec des cellules CD34+ simplement incubées pendant une semaine avec du milieu conditionné par des MSC de passage 4 ou du milieu non conditionné (Figure 17C). Pour les expériences de co-transplantation, les souris ont reçu $1,5 \cdot 10^5$ cellules CD34+ non cultivées et $1,5 \cdot 10^5$ MSC récoltées aux passages 1 à 10 (Figure 17D). Les cellules ont été injectées par intraveineuse dans la queue. Après 5 semaines, les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale et les cellules de moelle osseuse ont été récoltées des fémurs et des tibias dans de l'IMDM (Lonza) supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal. La récupération des cellules mononucléées de moelle osseuse s'est faite sur base de Ficoll selon le principe précédemment énoncé au point 2.1.1.1. Les cellules ont été lavées puis suspendues dans de l'IMDM supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal. Environ $6 \cdot 10^5$ cellules de moelle osseuse de souris NOD/SCID ont été mises en culot et incubées pendant 30 minutes à 4°C avec les anticorps suivants: l'anti-CD45 humain conjugué à l'APC, l'anti-CD33 humain conjugué au FITC et l'anti-CD19 humain conjugué au PE (tous de BD Biosciences). Les cellules ont été lavées dans du PBS et fixées dans du PBS 1 % formaldéhyde. Les échantillons ont été acquis à l'aide du BD FACSCanto II et analysés avec le logiciel BD FACS DiVa. Les cellules positives ont été identifiées par comparaison avec les IgG contrôles.

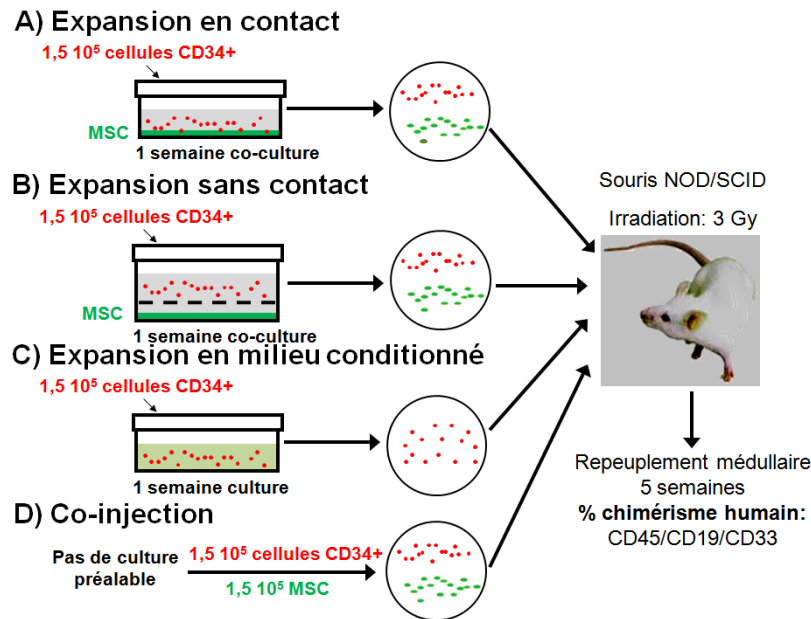


Figure 17: Plan d'expérimentation: greffe de cellules souches hématopoïétiques aux souris NOD/SCID.

2.9. Distribution tissulaire des MSC après injection aux souris NOD/SCID

Environ 24 heures avant la greffe, des souris NOD/SCID âgées de 2 mois ont été irradiées à 3 Gy par une source de ^{137}Cs . Ensuite, 4 heures avant la greffe, 10 jours et 21 jours après celle-ci, les souris ont reçu 20 μl d'anti-asialo GM1 antiserum par injection intrapéritonéale. Les souris ont reçu 2×10^5 MSC de passage 3 ou 7 par injection intraveineuse dans la queue (Figure 18). Après 24 heures ou 5 semaines, les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale et le sang, la moelle osseuse, la rate, les poumons, le foie, les reins et l'intestin grêle ont été récupérés et congelés. L'ADN génomique a été isolé des tissus des souris à l'aide du kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen). La concentration et la pureté de l'ADN ont été estimées par mesure de la densité optique. Les analyses de l'ADN ont été réalisées par PCR en temps réel. L'amplification a été effectuée en utilisant l'ABI Prism 7700 sequence detection system. Un mélange réactionnel contenant 10 μl de Power SYBR[®] Green PCR master mix, l'ADNc, ainsi que les amorces sens et antisens a été utilisé. Le gène cible était l'albumine humaine; l'amorce sens était TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTT, l'amorce antisens était CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT. Le gène de référence était la β -actine murine; l'amorce sens était CCTGTGGCATCCATGAAACTAC, l'amorce antisens était CACTGT GTTGGCATAGAGGTCTTT. La quantité relative du gène de l'albumine humaine a été calculée en utilisant la méthode comparative des Ct. Une expérience de validation a été effectuée pour confirmer que le rendement de la cible et de la référence était similaire. La valeur absolue de la pente des ΔCt en fonction du logarithme de la quantité d'ADN était inférieure à 0,1, comme recommandé par le fabricant.

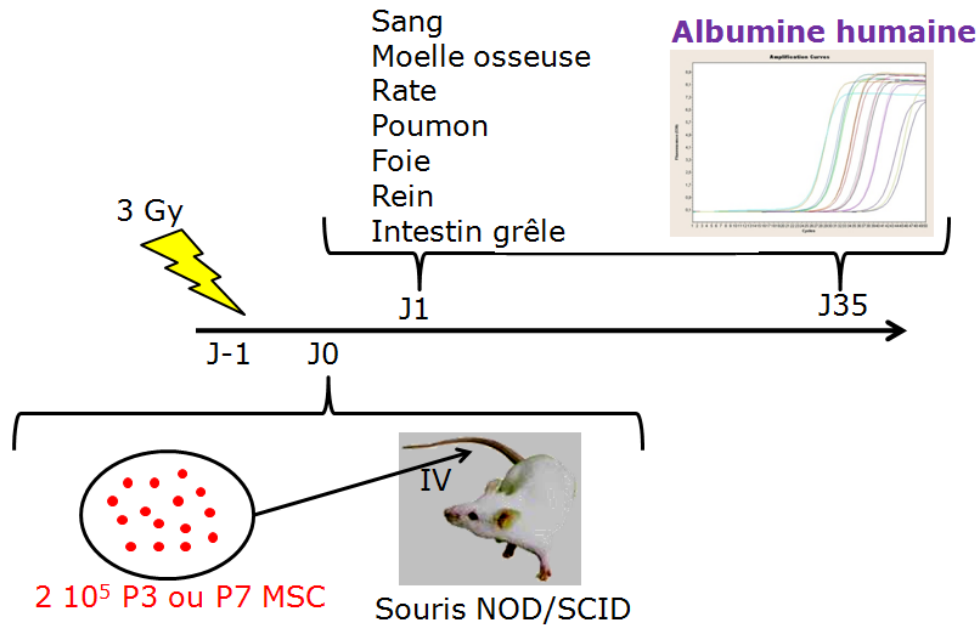


Figure 18: Plan d'expérimentation: distribution tissulaire des MSC après injection aux souris NOD/SCID.

2.10. Inhibiteurs et anticorps bloquants utilisés

Pour mieux définir comment les MSC soutiennent l'hématopoïèse, dans les cultures à long terme et les cultures précédant les greffes de cellules souches aux souris NOD/SCID, des inhibiteurs ou des anticorps bloquants ont été ajoutés un jour sur deux ou une fois par semaine aux concentrations décrites dans le Tableau 7. La «Cyclopamine KAAD» (cyclo) inhibe spécifiquement la voie de signalisation Hedgehog en se liant au récepteur Smoothed. Le «γ40 secretase inhibitor II» (Inhib sécrétase) bloque la transmission du signal de la voie de signalisation Notch. Le «Recombinant Human DKK-1» (Dkk) inhibe la voie de signalisation Wnt. Le «Recombinant Human BMPR-IA/Fc chimera» (BMPR) lie BMP-4 et empêche l'action de celui-ci. L'«anti-human jagged 1 antibody» (anti-jagged 1) bloque la voie de signalisation Notch. Le «Monoclonal Anti-human CXCL8/IL-8 Antibody» (anti-IL8), le «Monoclonal Anti-human IL-6 Antibody» (anti-IL6) et l'«Anti-Integrin alpha 4 + beta 1 Antibody» (anti-α4) empêchent respectivement l'action de l'IL-8, de l'IL-6 et du VLA4 en se liant à ceux-ci.

Matériel et méthodes

Tableau 7: Abréviations et concentrations des inhibiteurs et des anticorps bloquants utilisés dans les cultures à long terme et dans les cultures précédant les greffes de cellules souches aux souris NOD/SCID.

Abréviation	Molécule	Concentration	Fournisseur
Cyclo	Cyclopamine KAAD	0,35 µg/ml	Calbiochem
Inhib sécrétase	γ40 secretase inhibitor II	10 µg/ml	Calbiochem
Dkk	Recombinant Human DKK-1	0,5 µg/ml	R&D systems
BMPR	Recombinant Human BMPR-IA/Fc chimera	5 µg/ml	R&D systems
Anti-jagged 1	Anti-human jagged 1 Antibody	5 µg/ml	R&D systems
Anti-IL8	Monoclonal Anti-human CXCL8/IL-8 Antibody	1 µg/ml	R&D systems
Anti-IL6	Monoclonal Anti-human IL-6 Antibody	1 µg/ml	R&D systems
Anti-α4	Anti-Integrin alpha 4 + beta 1 Antibody	2,5 µg/ml	Abcam
IgG contrôle	Mouse IgG1 Isotype Control	1 µg/ml	R&D systems

2.11. Statistiques

Les résultats présentés ont été obtenus à partir de plusieurs expériences indépendantes; la moyenne et l'erreur type ont été calculées. Les comparaisons des différentes conditions expérimentales ont été réalisées par le test T de Student ou le test Z ou le test de Mann-Whitney à l'aide des logiciels SigmaPlot et SigmaStat (SPSS, Richmond, CA).

Résultats

3. Résultats: Première partie: Etude de l'influence du nombre de passages des MSC sur leur activité pro-hématopoïétique

3.1. Expansion et caractérisation des préparations de MSC

Les MSC ont été purifiées par adhérence au plastique et amplifiées dans du MSCGM (mesenchymal stem cell growth medium). Les cellules ont été passées tous les 10 jours. Le nombre de doublings à chaque passage était de 2 à 3 (Figure 19).

La prolifération des MSC a été maintenue au moins jusqu'au passage 10. Les cellules ont été récupérées à chaque passage pour l'étude de leur phénotype, de leur capacité de différenciation et de leur capacité à former des colonies cellulaires fibroblastiques.

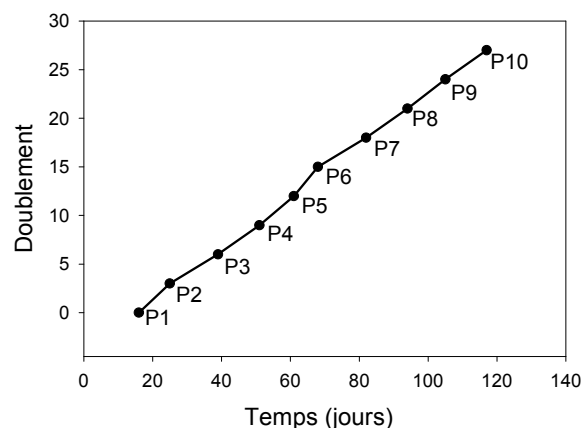


Figure 19: Caractérisation des MSC: nombre de doublings à chaque passage.

Le phénotype des MSC a été analysé après chaque passage par cytométrie en flux. Dès le second passage, les cellules étaient négatives pour les antigènes CD11b, CD14, CD34, CD36 et CD45. Les cellules étaient faiblement positives (mean channel fluorescence ratio, MCFR 1,5 à 3,5) pour les antigènes CD49a, CD105, CD106 et CD146. Les cellules étaient positives (MCFR 3,5 à 9) pour les antigènes CD13 et CD73 et fortement positives (MCFR > 25) pour les antigènes CD90 et GD2. Les cellules n'expriment pas les antigènes CD271, SSEA4 et STRO-1 comme décrit précédemment (Gang *et al*, 2007; Jones *et al*, 2006; Gronthos *et al*, 2003) (Figure 20).

La différenciation en graisse, os et cartilage a été évaluée en transférant les MSC dans des milieux d'induction spécifique. Les vacuoles lipidiques, les dépôts de calcium et la différenciation chondrocytaire ont été respectivement révélés avec de l'Oil Red O, de l'Alizarin Red et du bleu de toluidine. Des MSC de passages précoces

Résultats

et de passages tardifs pouvaient se différencier dans ces trois tissus. La capacité de différenciation adipocytaire, chondrocytaire et ostéocytaire était maintenue jusqu'au passage 10 (Figure 21).

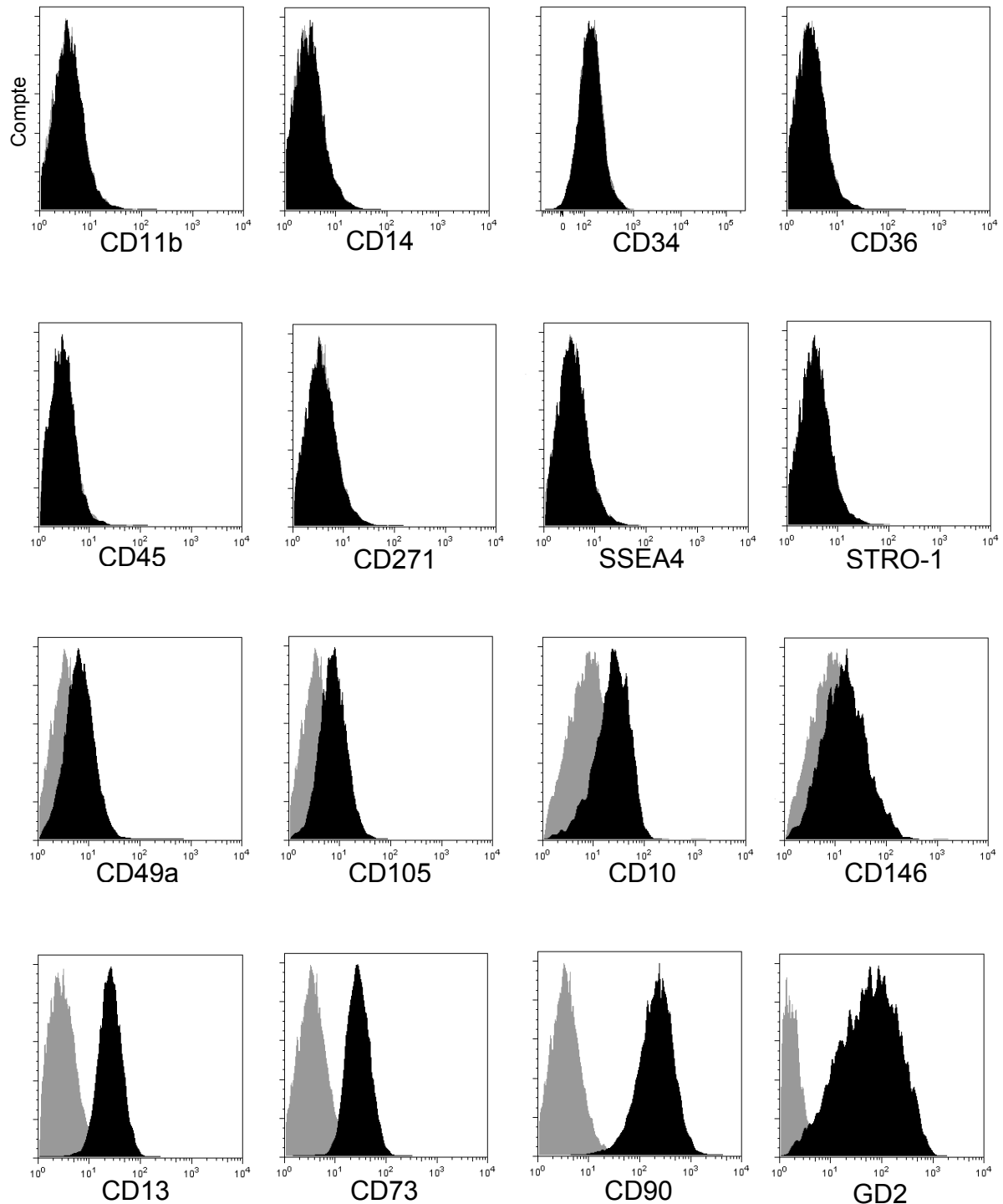


Figure 20: Caractérisation des MSC: analyse représentative par cytométrie en flux des MSC obtenues par adhésion au plastique. En gris, histogramme obtenu par marquage avec un IgG contrôle.

Résultats

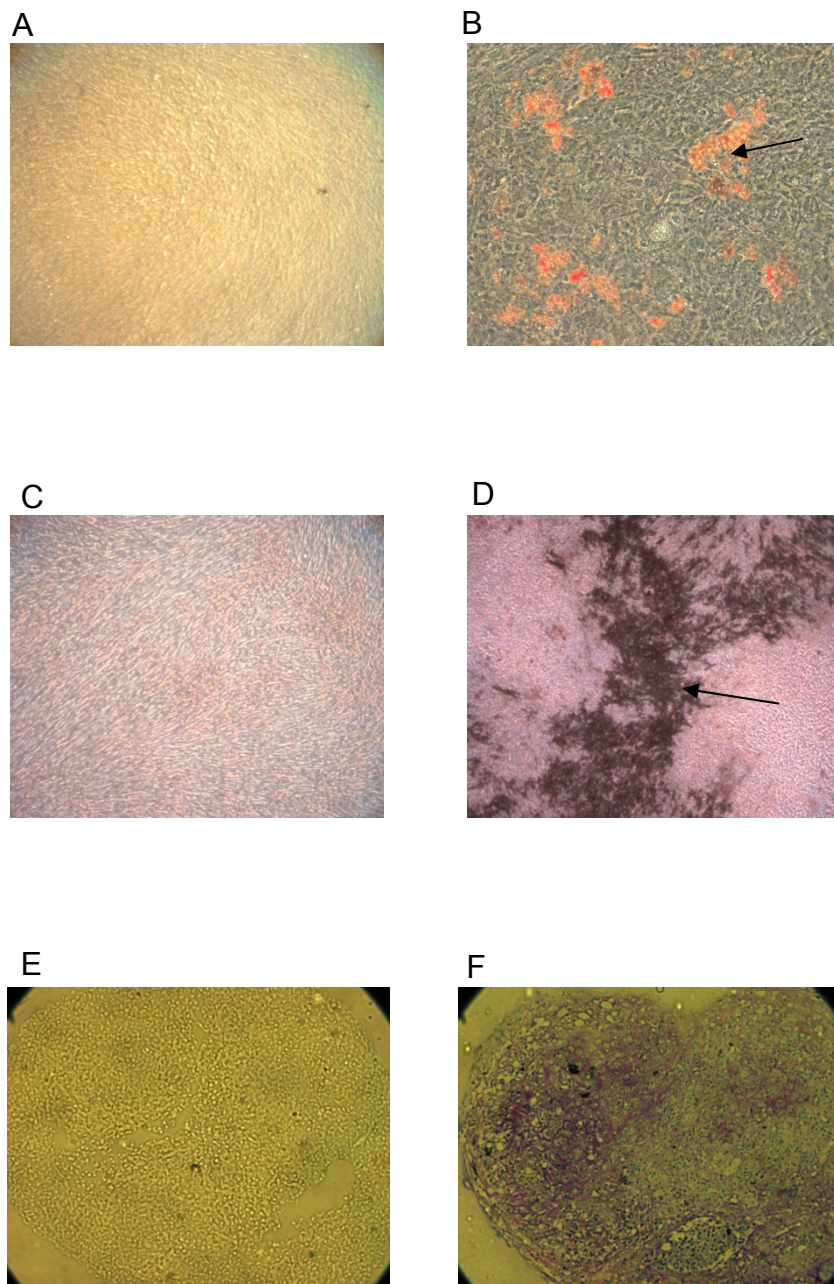


Figure 21: Images représentatives de la différenciation des MSC. **(A)** Culture contrôle incubée dans du MSCGM et colorée à l'Oil Red O. **(B)** Différenciation adipocytaire colorée à l'Oil Red O, la flèche indique les vacuoles lipidiques. **(C)** Culture contrôle incubée dans du MSCGM et colorée à l'Alizarin Red. **(D)** Différenciation ostéocytaire colorée à l'Alizarin Red, la flèche indique les dépôts calciques. **(E)** Culture contrôle incubée dans du MSCGM et colorée au bleu de toluidine. **(F)** Différenciation chondrocytaire colorée au bleu de toluidine (grossissement 20X).

Résultats

La capacité des MSC à former des colonies cellulaires fibroblastiques a été étudiée pour évaluer la fréquence et la pureté de ces MSC en culture. Nous observons que le nombre de CFU-F (Colony forming unit-fibroblast) atteint le maximum aux passages 3 ($10,16 \pm 3,19$ %) et 8 ($10,21 \pm 2,07$ %) après leur expansion dans le MSCGM (Figure 22).

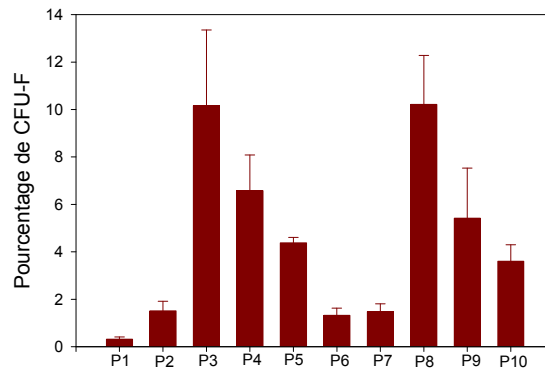


Figure 22: Caractérisation des MSC: pourcentage de CFU-F des MSC récoltées à différents passages (P), $n \geq 3$.

Toutes les préparations de MSC utilisées dans les essais décrits ci-dessus présentent le même phénotype, la même capacité de différenciation et la capacité à former des colonies cellulaires fibroblastiques.

3.2. Profil sécrétoire

La présence de plusieurs cytokines hématopoïétiques, de molécules d'adhésion et de métalloprotéases dans le milieu conditionné par des MSC a été étudiée à différents passages par «RayBio® human cytokine antibody arrays» (limite de détection: 4-25 pg/ml). Les molécules suivantes ont été analysées: BMP-4, BMP-7, Flt-3 ligand, G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-15, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, LIF, L-selectin, SCF, SDF-1, TGF- β 1, TPO, VCAM-1, ICAM-1, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-10, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2 et TIMP-4. TIMP-2 a été détecté dans le milieu non conditionné, les autres molécules n'étaient pas présentes (Figure 23A). Dans les conditions basales, IL-6, IL-8, VCAM-1, ICAM-1, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-13, TIMP-1 et TIMP-4 sont détectés dans le milieu conditionné par les MSC (Figure 23B). Quand les MSC sont stimulées avec de l'IL-1 α , une sécrétion supplémentaire de GM-CSF, LIF et MMP-10 est observée (Figure 23C). Les profils de sécrétion basale et stimulée à l'IL-1 α sont maintenus jusqu'au passage 10, sans variation dans la nature des molécules détectées.

Ensuite, l'expression d'IL-6 et d'IL-8, les 2 molécules les plus sécrétées, a été mesurée quantitativement par «cytometric bead arrays». Nous observons que la sécrétion d'IL-6 était de $4,95 \pm 1,27$ ng/ml après les passages 1 à 3 et augmentait à $24,0 \pm 8,5$ ng/ml après les passages 4 à 6 ($p < 0,001$) puis était maintenue jusqu'au passage 10 (Figure 24A). Inversement, la sécrétion d'IL-8 diminuait progressivement

Résultats

de $8,1 \pm 3,6$ ng/ml aux passages 1 à 3 à $4,7 \pm 1,4$ ng/ml après les passages 4 à 6, à $4,3 \pm 0,7$ ng/ml aux passages 7 et 8, et à $2,3 \pm 0,6$ ng/ml après les passages 9 et 10 ($p < 0,01$ vs passages 1 à 3; Figure 24B).

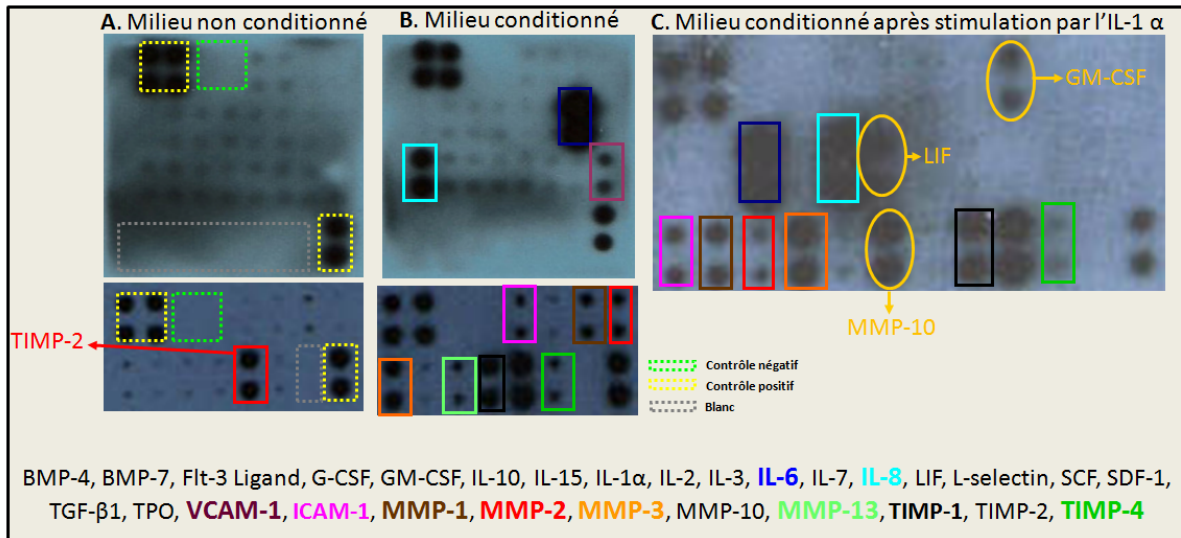


Figure 23: Expression constitutive et inducible de cytokines, métalloprotéinases et molécules d'adhésion par les MSC. **(A)** Milieu non conditionné. **(B)** Milieu conditionné par les MSC pendant 10 jours. **(C)** Milieu conditionné par les MSC stimulées par de l'IL-1 α pendant 10 jours. Chaque cadre de couleur entoure les spots des molécules détectées écrites dans la même couleur.

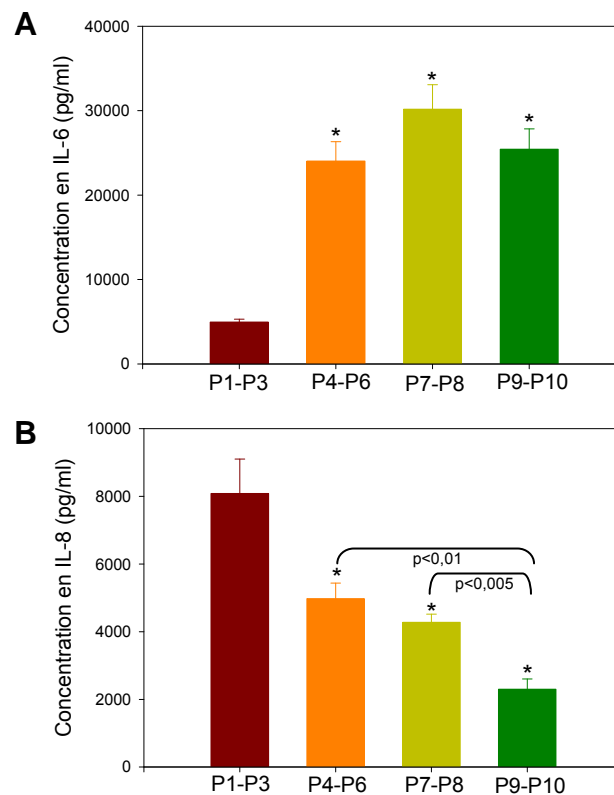


Figure 24: Expression d'IL-6 **(A)** et d'IL-8 **(B)** dans du milieu conditionné par les MSC récoltées aux passages (P) indiqués. * $p < 0,01$ versus P1-P3, test T de Student, $n \geq 3$.

3.3. Capacité pro-hématopoïétique des MSC dans les cultures à long terme

La capacité pro-hématopoïétique des MSC in vitro a été évaluée en établissant des cultures à long terme dans des conditions de contact ou sans contact. Cinq mille cellules CD34+ ont été cultivées sur un tapis de MSC en contact ou sans contact séparées par une membrane perméable. Les cultures ont été maintenues pendant 3 semaines. A ce terme, la persistance des progéniteurs primitifs est mise en évidence en transférant le contenu de la culture à long terme dans un milieu semi-solide. Dans ce milieu, les progéniteurs primitifs persistants vont se différencier et donner naissance à des colonies secondaires. Comme contrôle, des cellules CD34+ non cultivées ont été directement transférées dans le milieu semi-solide. En contact, la production de colonies secondaires était plus importante après co-culture avec des MSC de passage 1 et plus faible après co-culture avec des MSC récoltées aux passages 4 et supérieurs, comparé aux cellules non cultivées ($p < 0,05$; Figure 25A).

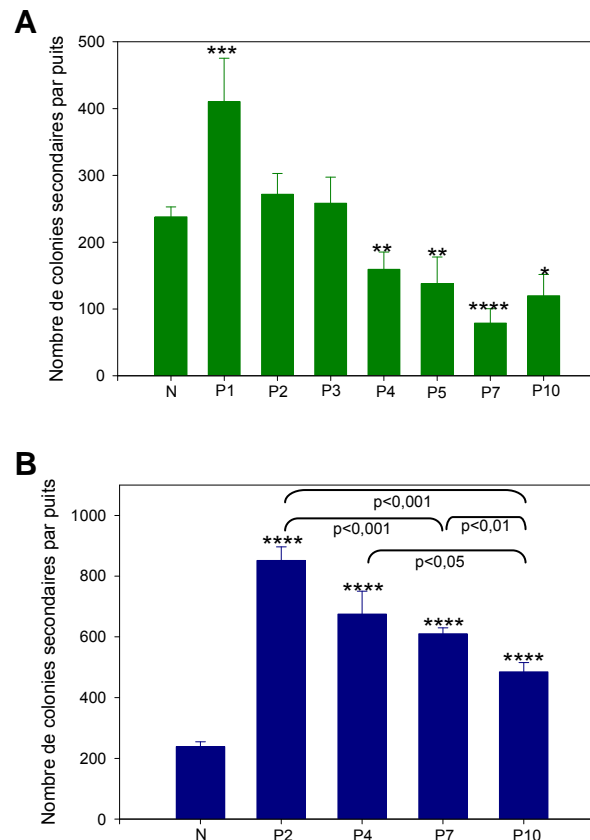


Figure 25: Capacité pro-hématopoïétique des MSC in vitro dans les cultures à long terme en contact ou sans contact. **(A)** Nombre de colonies secondaires après 3 semaines de co-culture initiée avec 5000 cellules CD34+ au contact des MSC récoltées aux passages indiqués (P) ou à partir de 5000 cellules CD34+ non cultivées (N). **(B)** Les cultures ont été effectuées sans contact avec les MSC. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$ versus cellules CD34+ non cultivées, test T de Student, $n \geq 4$.

Résultats

Dans les cultures sans contact (Figure 25B), le nombre de colonies secondaires était plus important que dans les cultures en contact, quelles que soient les préparations de MSC utilisées. Une diminution significative de la capacité de support de l'hématopoïèse avec le nombre de passages était également observé dans les conditions sans contact ($p < 0,05$).

Le phénotype des cellules hématopoïétiques amplifiées en culture avec des MSC a été étudié. L'expression des antigènes CD34, CD33, CD11b, CD19 et CD10 a été testée sur les cellules récupérées après 3 semaines de culture en contact ou sans contact. En contact (Figure 26B), l'expansion des cellules CD34+ a été constatée après culture avec des MSC de passage 2. L'expansion des cellules CD34+ n'a pas été observée après culture en contact avec des MSC récoltées aux passages 4 et plus ($p > 0,05$). Les cellules myéloïdes exprimant CD33 et/ou CD11b augmentent également après culture avec des MSC de passage 2 mais beaucoup moins avec des MSC des autres passages ($p < 0,05$). Par contre, les cellules lymphoïdes exprimant CD19 et/ou CD10 sont maintenues ou amplifiées avec des MSC de passage 2 aussi bien qu'avec des MSC de passages 4 et 7.

Dans les conditions sans contact (Figure 26C), les cellules CD34+ persistaient après culture avec des MSC de passages 2, 4 et 7 sans une nette prolifération. Les cellules myéloïdes disparaissaient pratiquement après culture avec des MSC de passage 7 ($p < 0,05$) tandis que le nombre de cellules lymphoïdes était plus important après culture avec des MSC de passage 7 comparé aux passages 2 ou 4 ($p < 0,05$). Ainsi, dans les conditions de contact et dans les conditions sans contact, le support des progéniteurs myéloïdes par les MSC diminue avec le nombre de passages tandis que le support des cellules lymphoïdes B est maintenu ou même augmenté avec des MSC de passages tardifs.

La maturation des cellules CD34+ in vitro en cellules B a été rapportée précédemment comme étant dépendante de co-culture avec des lignées cellulaires stromales murines spécifiques comme les MS-5 et les S17 (Berardi *et al*, 1997; Fluckiger *et al*, 1998). Nous avons donc vérifié si la récapitulation de l'ontogénie des cellules B pouvait être obtenue avec des MSC humaines. Pour définir le stade de maturation des cellules B amplifiées, une analyse phénotypique et moléculaire a été effectuée. L'analyse FACS des cellules cultivées montre l'expression du CD79a, des chaînes légères κ et λ cytoplasmiques et de surface ainsi que l'expression des chaînes lourdes μ cytoplasmiques et de surface de plus de 30 % des cellules (Figure 27). Pour comparaison, moins de 4 % des cellules CD34+ non cultivées expriment les mêmes marqueurs. L'expression membranaire des chaînes légères κ et λ ainsi que l'IgM était montrée sur les cellules CD34+ cultivées mais pas sur les cellules CD34+ non cultivées.

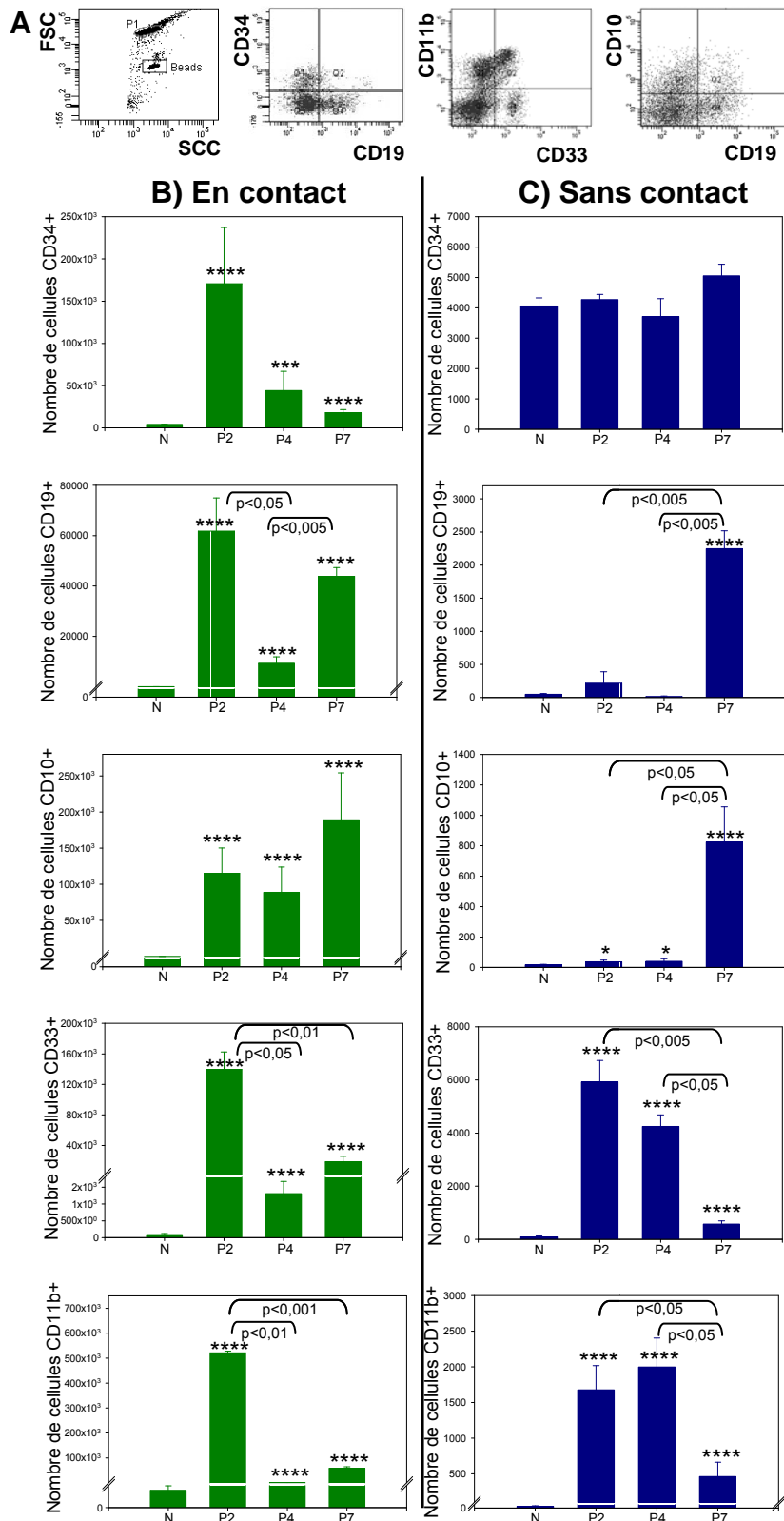


Figure 26: Nombre absolu de cellules CD34+, CD19+, CD10+, CD33+ et CD11b+ amplifiées après 3 semaines de culture à long terme avec des MSC récoltées aux passages indiqués (P) ou des cellules CD34+ non cultivées (N), n = 3. **(A)** Résultats représentatifs de l'analyse par cytométrie en flux. **(B)** Les cellules CD34+ ont été cultivées au contact des MSC. **(C)** Les cellules CD34+ ont été cultivées séparées des MSC par une membrane perméable (sans contact). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005, ****p<0,001 versus cellules CD34+ non cultivées, test T de Student.

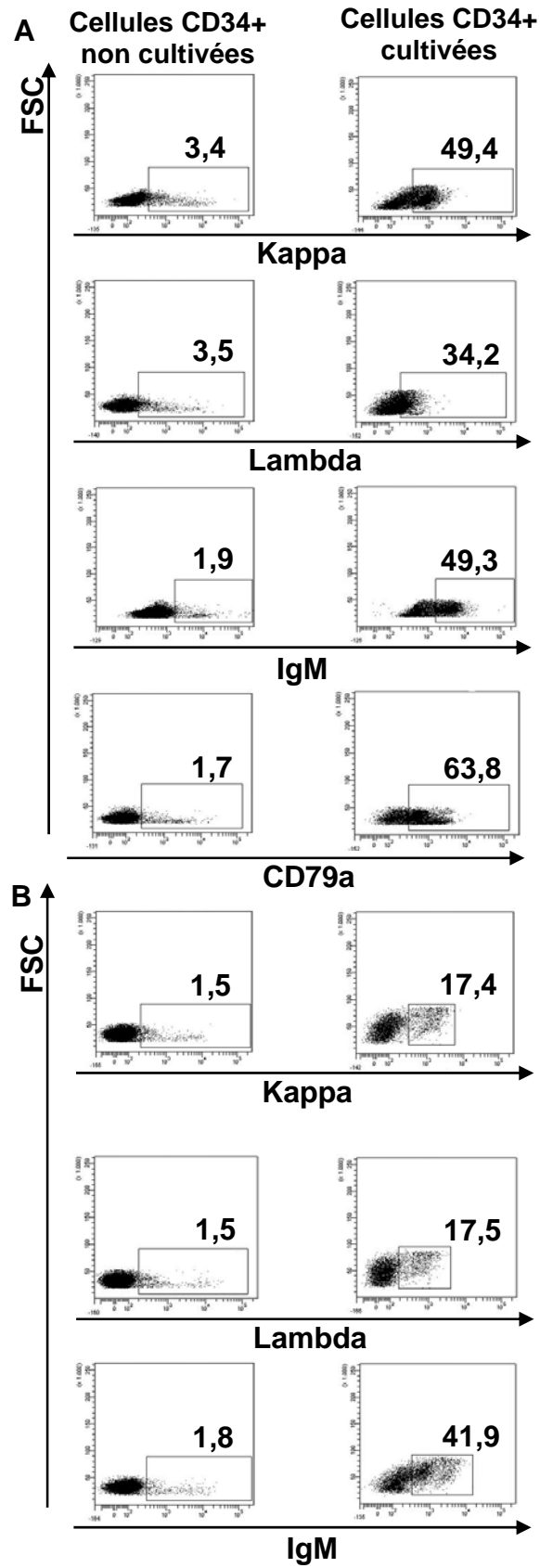


Figure 27: Génération de cellules B stimulées par les MSC. Analyse représentative par cytométrie en flux des cellules amplifiées après 3 semaines de culture à long terme avec des MSC (à droite) ou des cellules CD34+ non cultivées (à gauche). **(A)** Marquage intracellulaire. **(B)** Marquage extracellulaire.

Résultats

Par RT-qPCR, l'expression des gènes spécifiques des cellules B comme TdT, RAG, VpreB, EBF et Pax-5 a été détectée dans les cellules récoltées après 3 semaines de co-culture avec les MSC (Figure 28). Ceci indique l'induction du programme transcriptionnel des cellules B au contact des MSC. Ainsi, les cellules CD34+ subissent la différenciation en cellules B jusqu'au stade de cellules B immatures IgM+ au contact des MSC humaines, de façon similaire aux modèles rapportés précédemment utilisant des lignées cellulaires stromales murines.

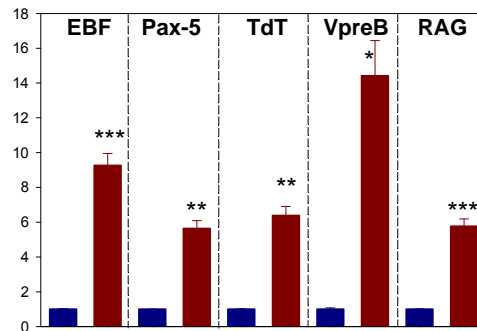


Figure 28: Génération de cellules B stimulées par les MSC. Quantité relative d'ARNm pour les gènes spécifiques des cellules B (EBF, Pax-5, TdT, VpreB et RAG) des cellules CD34+ non cultivées (en bleu) ou des cellules amplifiées après 3 semaines de co-culture avec des MSC (en rouge). *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,001 versus cellules CD34+ non cultivées, n = 3.

3.4. Maintien des SRC en co-culture avec des MSC

Des souris NOD/SCID âgées de 2 mois et irradiées à 3 Gy ont été utilisées dans ces expériences. Les cellules ont été transplantées par injection intraveineuse dans la queue. Après 6 semaines, les souris ont été euthanasiées et les cellules de la moelle osseuse ont été récupérées des fémurs et des tibias. Le chimérisme humain a été analysé par cytométrie en flux (Figure 29A). Les souris ont été considérées comme positives lorsqu'au moins 10 cellules CD45+ co-exprimant CD19 ou CD33 ont été détectées sur un total de 100000 cellules analysées (limite de détection: 0,01 %).

Premièrement, les souris ont reçu $1,5 \cdot 10^5$ cellules CD34+ non cultivées ou le produit d'expansion de $1,5 \cdot 10^5$ cellules CD34+ après une semaine de co-culture avec des MSC à confluence récoltées aux passages 1 à 10 (Figure 29C, Tableau 8). Les cellules humaines CD45+/CD19+ ou CD33+ ont été détectées dans la moelle osseuse de 50 % des souris greffées avec des cellules CD34+ non cultivées et montrant un chimérisme moyen de $1,38 \pm 0,53$ %. Après co-culture avec des MSC de passages précoces, le pourcentage de souris positives était de plus de 50 % (P1-P2: 70 %, P3-P4: 68 %). Cependant, il n'y a aucune différence significative dans le pourcentage de cellules humaines greffées entre les souris transplantées avec des cellules CD34+ non cultivées et les souris recevant les cellules CD34+ co-cultivées avec des MSC de passages précoces (jusqu'au passage 4). Après co-culture avec des MSC de passages tardifs (P5 à P10), seulement 10 % des souris étaient positives et le pourcentage des cellules CD45+/CD19+ ou CD33+ était très faible

Résultats

(0,02 %; $p < 0,005$ comparé à la co-culture avec des MSC de passages 1 à 4). Ainsi, le maintien des cellules repeuplantes était plus efficace en contact avec des MSC de passages précoces comparé à des MSC de passages tardifs.

Ensuite, les souris ont été transplantées avec le produit d'expansion de $1,5 \cdot 10^5$ cellules CD34+ co-cultivées pendant une semaine avec des MSC de passage 4 à confluence, séparées par une membrane perméable. Des souris supplémentaires ont été injectées avec des cellules CD34+ simplement incubées pendant une semaine dans du milieu conditionné par des MSC de passage 4 (Figure 29D, Tableau 8). Le pourcentage de souris positives était semblable après transplantation de cellules CD34+ cultivées sans contact (72 %) ou avec du milieu conditionné (80 %) comparé à la culture en contact (68 %). Il n'y a pas de différence significative dans le pourcentage de cellules humaines CD45+/CD19+ ou CD33+ entre les souris transplantées avec des cellules CD34+ cultivées en contact avec des MSC (P3-P4: $0,63 \pm 0,21$ %) et des souris greffées avec des cellules CD34+ cultivées dans du milieu conditionné par les MSC ($0,56 \pm 0,32$ %). Cependant, le pourcentage de cellules humaines CD45+/CD19+ ou CD33+ était plus important après transplantation avec le produit d'expansion des cellules CD34+ co-cultivées sur une membrane perméable ($4,66 \pm 2,68$ %) mais cette différence n'atteint pas une signification statistique. La transplantation des souris avec des cellules CD34+ cultivées dans du milieu non conditionné ne produit qu'une seule souris positive sur 5 avec 0,17 % de chimérisme humain.

Ensuite, nous avons étudié la capacité des MSC à favoriser le homing des cellules CD34+ non cultivées. A cet effet, $1,5 \cdot 10^5$ cellules CD34+ de sang de cordon ont été directement co-transplantées avec $1,5 \cdot 10^5$ MSC récupérées aux passages 1 à 10 (Figure 29E, Tableau 8). Dans ces expériences, plus de 50 % des souris montraient une reconstitution hématopoïétique humaine. Comparé à l'injection de cellules CD34+ seules, le pourcentage de cellules humaines greffées était radicalement augmenté après co-transplantation avec des MSC récoltées aux passages 1 à 8 ($p < 0,005$). Inversement, les MSC récoltées aux passages 9 et 10 sont inefficaces pour améliorer la prise de greffe des cellules CD34+ non cultivées ($p < 0,05$).

Résultats

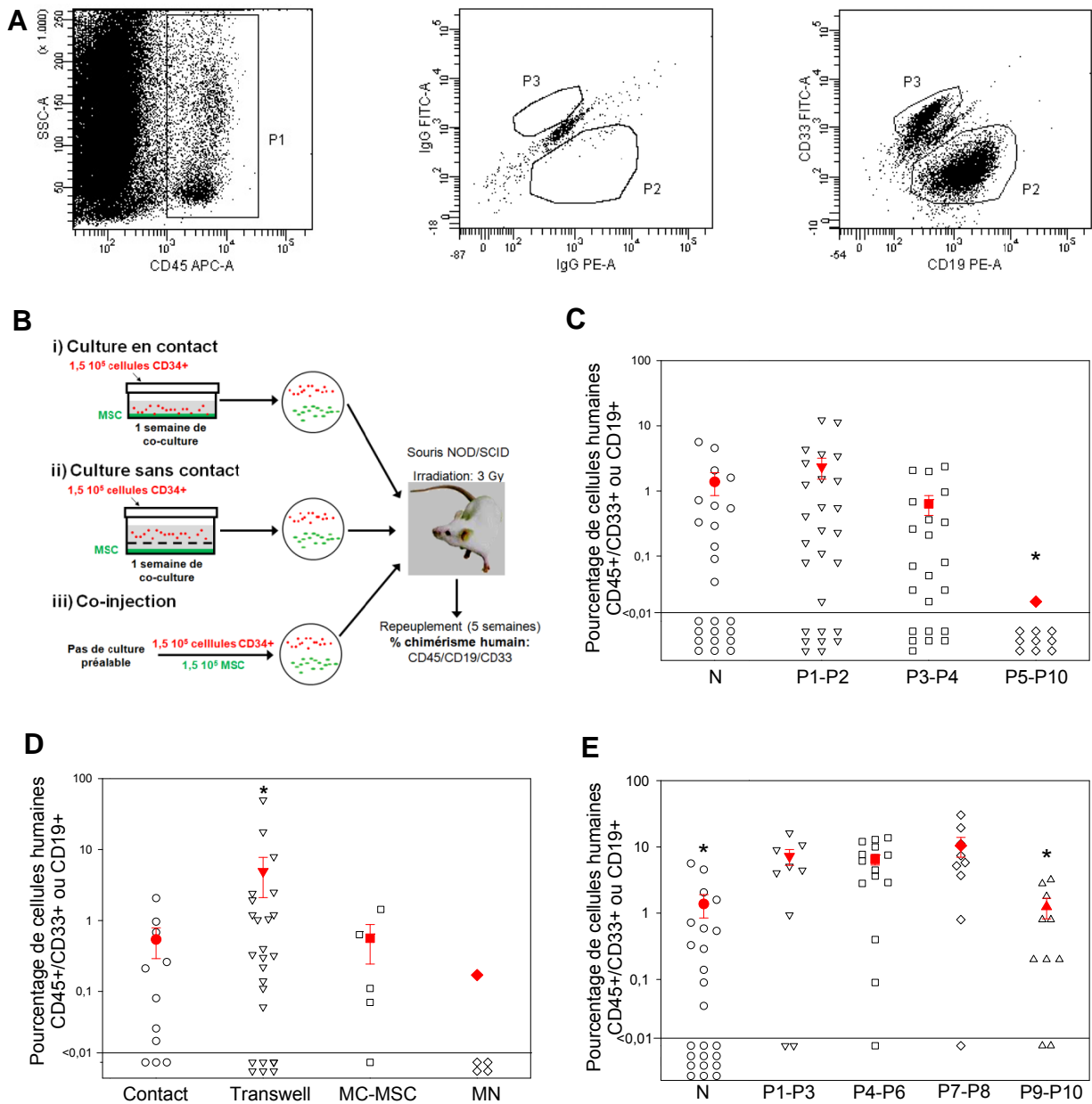


Figure 29: Pourcentage de cellules humaines CD45+/CD19+ ou CD33+ dans la moelle osseuse de souris NOD/SCID greffées. **(A)** Résultats représentatifs de l'analyse par cytométrie en flux des cellules mononucléées de la moelle osseuse de souris NOD/SCID, utilisant l'anti-CD45, l'anti-CD19 et l'anti-CD33 humains. **(B)** Plan d'expérimentation. **(C)** Les souris ont reçu des cellules CD34+ non cultivées (N) ou le produit d'expansion des cellules CD34+ co-cultivées pendant une semaine avec des MSC à confluence et récoltées aux passages 1 à 10 (P). Chaque point représente une souris. La moyenne et l'erreur type sont dessinées en rouge. Les souris ont été considérées comme positives lorsqu'au moins 10 cellules CD45+ co-exprimant CD19 ou CD33 ont été détectées sur un total de 100000 cellules analysées (limite de détection: 0,01 %). Les résultats sont exprimés sur une échelle logarithmique. * $p < 0,005$ versus autres passages, test de Mann-Whitney. **(D)** Les souris ont reçu le produit d'expansion des cellules CD34+ co-cultivées pendant une semaine en contact avec des MSC de P4 (Contact) ou sans contact avec des MSC de P4 (Transwell) ou avec du milieu conditionné par des MSC de P4 (MC-MSC) ou avec du milieu non conditionné (MN). * $p < 0,05$ versus milieu non conditionné, test de Mann-Whitney. **(E)** Les cellules CD34+ non cultivées ont été co-injectées avec des MSC récoltées aux passages 1 à 10 sans culture préalable. * $p < 0,01$ versus P1-P3, P4-P6 et P7-P8, test de Mann-Whitney.

Résultats

Tableau 8: Activité des SRC après co-culture ou co-injection de MSC.

	Nombre de passages des MSC utilisées	Nombre de souris positives/nombre total de souris injectées (%)	% de cellules humaines dans la moelle hôte
Cellules CD34+ non cultivées	-	12/24 (50)	1,38 ± 0,53
Cellules CD34+ cultivées en contact avec MSC	P1-P2	19/27 (70)	2,34 ± 0,83 ¹
	P3-P4	15/22 (68)	0,63 ± 0,21 ¹
	P5-P10	1/10 (10)	0,02 ± 0,00
Cellules CD34+ cultivées sans contact avec MSC	P4	18/25 (72)	4,66 ± 2,68 ²
Cellules CD34+ cultivées avec du MC-MS	P4	4/5 (80)	0,56 ± 0,32
Cellules CD34+ cultivées avec du MN	-	1/5 (20)	0,17 ± 0,00
Cellules CD34+ co-injectées avec MSC	P1-P3	7/9 (78)	7,21 ± 1,94 ^{3,4}
	P4-P6	14/15 (93) ⁵	6,51 ± 1,18 ^{3,4}
	P7-P8	8/9 (89)	10,48 ± 3,46 ^{3,4}
	P9-P10	8/10 (80)	1,25 ± 0,43

Les souris NOD/SCID ont été transplantées avec $1,5 \cdot 10^5$ cellules CD34+ non cultivées, le produit d'expansion de $1,5 \cdot 10^5$ cellules CD34+ cultivées dans les conditions indiquées ou $1,5 \cdot 10^5$ cellules CD34+ non cultivées co-injectées avec des MSC. Les passages des préparations de MSC ont été utilisés comme indiqué. La proportion de souris positives et le pourcentage moyen de cellules humaines dans les souris positives sont donnés pour chaque condition 5 semaines après greffe. Abréviations: MSC, cellules souches mésenchymateuses; P, passage; MC-MS, milieu conditionné par MSC; MN, milieu non conditionné.

¹p<0,05 versus P5-P10, tests de Mann-Whitney.

²p<0,05 versus culture avec du milieu non conditionné, tests de Mann-Whitney.

³p<0,01 versus P9-P10, tests de Mann-Whitney.

⁴p<0,01 versus cellules CD34+ non cultivées, tests de Mann-Whitney.

⁵p<0,05 versus cellules CD34+ non cultivées, Z-tests.

3.5. Distribution tissulaire des MSC après injection intraveineuse chez la souris NOD/SCID

La distribution des MSC dans plusieurs tissus a été testée avec des MSC de passage 3 ou 7. Des souris âgées de 2 mois et irradiées à 3 Gy ont reçu $2 \cdot 10^5$ MSC de passage 3 ou 7 par injection intraveineuse dans la queue. Après 24 heures ou 5 semaines, les souris ont été euthanasiées et le sang, la moelle osseuse, la rate, les poumons, le foie, les reins et l'intestin grêle ont été récoltés pour une analyse de l'ADN de l'albumine humaine par PCR en temps réel. Vingt-quatre heures après l'injection de MSC de passage 3, la moelle osseuse, l'intestin grêle, le foie et les

Résultats

poumons étaient positifs pour l'albumine humaine chez au moins une souris par groupe de 4 (Tableau 9). Les autres tissus étaient négatifs chez toutes les souris. Toutes les souris étaient positives pour les poumons et nous avons observé une accumulation d'approximativement 10 fois plus de MSC dans les poumons comparés aux autres tissus. Après 5 semaines, seule la moelle osseuse était positive chez toutes les souris. Les autres organes étaient négatifs sauf chez une souris pour l'intestin grêle. Les MSC de passages précoce (P3) et tardif (P7) avaient une distribution tissulaire similaire. Ces résultats suggèrent que les MSC, quel que soit le nombre de passages, sont d'abord piégées dans les poumons avant d'atteindre d'autres organes tels que l'intestin grêle ou la moelle osseuse. Dans la moelle osseuse uniquement, les MSC sont capables de survivre jusqu'à 5 semaines.

Tableau 9: Distribution des MSC dans plusieurs tissus après injection intraveineuse.

Tissus	Souris positives/souris greffées			
	Nombre de passages des MSC utilisées			
	P3		P7	
	Temps après greffe			
	24 heures	5 semaines	24 heures	5 semaines
Sang	0/1	0/3	1/3	0/4
Moelle osseuse	1/4	3/3	2/4	4/4
Rate	0/4	0/3	0/4	0/4
Rein	0/4	0/3	0/4	0/4
Intestin grêle	3/4	0/3	2/4	1/4
Foie	1/4	0/3	0/4	0/4
Poumon	4/4	0/3	4/4	0/4

Les souris NOD/SCID ont été injectées en intraveineuse avec des MSC récoltées au passage 3 ou 7. L'albumine des MSC a été détectée par PCR en temps réel 24 heures ou 5 semaines après transplantation.

3.6. Discussion de la première partie

Des essais cliniques récents indiquent que les MSC pourraient être utiles pour prévenir et/ou traiter la maladie du greffon contre l'hôte et promouvoir la prise de greffe des cellules du donneur après transplantation de HSC (Le Blanc *et al*, 2008; Koc *et al*, 2000). Les procédures utilisées pour préparer les MSC pour l'application clinique sont basées sur l'enrichissement en MSC présentes dans les cellules mononucléées de la moelle osseuse par adhérence au plastique suivi de l'expansion ex vivo dans du milieu contenant du sérum sélectionné (Dominici *et al*, 2006). La durée de l'étape d'expansion ex vivo est très variable et dépend du rapport entre le nombre de MSC dans l'échantillon de moelle osseuse initial et le nombre de MSC nécessaires pour l'injection au patient. Il a été décrit que la capacité des MSC à se greffer dans la moelle osseuse du receveur diminue avec le nombre de passages (Kyriakou *et al*, 2008). Aucune étude n'a encore montré jusqu'à présent si l'activité pro-hématopoïétique des MSC était modifiée avec la durée de la culture.

Résultats

Dans cette étude, les cultures des cellules CD34+ de sang de cordon ombilical ont été effectuées au contact d'une couche nourricière consistant en des MSC récoltées après les passages 2 à 10. Les cellules ont étéensemencées en l'absence de cytokines exogènes. Nos principaux résultats indiquent une diminution progressive de la production de colonies secondaires par les cellules CD34+ cultivées avec des MSC de passages croissants. De même, la génération de cellules myéloïdes CD33+ et CD11b+ différenciées était réduite quand des MSC de passages tardifs étaient utilisées. De plus, le maintien des SRC ex vivo était diminué quand les MSC avaient effectué plus de 5 passages, ce qui représente approximativement 10 à 12 doublements. Par contre, le support des cellules lymphoïdes CD19+ et CD10+ par les MSC n'était pas dépendant du nombre de passages. Quand l'activité de promotion de la prise de greffe par les MSC était étudiée par co-transplantation avec des cellules CD34+ non cultivées, il était observé que les MSC de passages tardifs (> 9 passages ou 25 doublements) étaient moins efficaces que les MSC de passages précoces.

Une caractérisation détaillée des préparations de MSC révélait des variations très faibles au cours des passages. Le phénotype des échantillons de MSC était stable au moins jusqu'au passage 10. La différenciation en graisse, os et cartilage était également conservée. La nature des cytokines, molécules d'adhésion et protéases matricielles détectées dans le milieu conditionné par les MSC était similaire à tous les passages testés. Cependant, les mesures quantitatives des deux molécules les plus abondamment sécrétées par les MSC, IL-6 et IL-8, montraient un déclin progressif de la production d'IL-8 durant la culture tandis que la sécrétion d'IL-6 augmentait. En culture liquide, l'ajout d'IL-8 stimule la prolifération des cellules CD34+ tandis que l'ajout d'un anticorps bloquant le récepteur de l'IL-8 inhibe leur prolifération (Corre *et al*, 1999). Ceci suggère que la mesure d'IL-8 peut constituer un marqueur reflétant partiellement l'activité pro-hématopoïétique des MSC.

Nos résultats indiquent également l'importance du contact direct entre les MSC et les cellules CD34+ dans les co-cultures. Les cultures de cellules CD34+ séparées des MSC par une membrane semi-perméable ne réduisaient pas la production de colonies secondaires et de SRC en comparaison avec les cultures en contact. Par contre, la production des cellules myéloïdes et lymphoïdes matures était fortement réduite dans les conditions sans contact. Ainsi, le contact direct avec des MSC apparaît être important pour la différenciation des progéniteurs tardifs mais pas pour les premières étapes de l'hématopoïèse. D'un point de vue pratique pour l'utilisation en clinique des co-cultures de cellules CD34+/MSC, les conditions sans contact pourraient permettre l'expansion des cellules en limitant la génération de cellules matures.

Notre étude a également révélé la forte activité pro-lymphopoïétique des MSC. La génération des cellules B in vitro a été précédemment rapportée comme dépendant des lignées cellulaires stromales murines (Fluckiger *et al*, 1998). Dans notre étude et comme déjà montré récemment par le groupe d'Ichii (Ichii *et al*, 2008), les MSC sont

Résultats

capables de supporter la production de progéniteurs cellulaires B et des cellules B immatures IgM⁺ dans du milieu contenant du sérum en l'absence de cytokines exogènes. Nous avons étendu ces constatations en montrant, par analyse RT-PCR en temps réel, l'expression des gènes TdT, RAG-1, VpreB, Pax-5 et EBF dans les cellules B cultivées mais pas dans les cellules CD34⁺ non cultivées. Les cellules B générées dans ce système de co-culture peuvent se différencier jusqu'au stade de cellules B immatures exprimant IgM. Ces cellules pourraient être utilisées pour identifier les signaux extrinsèques impliqués dans le développement des cellules B humaines. L'activité pro-lymphopoïétique des MSC n'est pas affectée par la culture ex vivo prolongée jusqu'à 30 doublements. La génération des cellules B par co-culture de cellules CD34⁺ et de MSC ouvre la voie à de nouvelles possibilités thérapeutiques. Dans des études cliniques futures, il serait intéressant d'étudier si la co-transplantation de MSC chez les patients subissant une greffe de HSC permet de hâter la régénération des cellules B. L'augmentation de la maturation in vitro des cellules CD34⁺ en lymphocytes B par les MSC pourrait également avoir des implications dans la conception de procédures d'immunothérapie adoptive (Luo *et al*, 2009).

En conclusion, notre étude montre que la culture prolongée de MSC de moelle osseuse est associée à une diminution de l'activité supportrice envers les cellules souches repopulantes et les progéniteurs myéloïdes tandis que le soutien des progéniteurs lymphoïdes B est maintenu. Ces changements ne sont pas accompagnés par des altérations du phénotype ou de la capacité de différenciation des MSC. Une implication importante est la suivante: les procédures de contrôle de qualité actuelles utilisées dans les laboratoires de thérapie cellulaire et basées sur l'analyse du phénotype ne reflètent pas fidèlement les propriétés biologiques des préparations de MSC.

4. Résultats: Deuxième partie: Etude de la régulation de l'activité pro-hématopoïétique des MSC

Pour étudier la régulation de l'activité pro-hématopoïétique des MSC, des anticorps bloquants ou des inhibiteurs des voies de signalisation Notch, Wnt, BMP et HH, de la molécule d'adhésion VCAM-1 et des cytokines IL-6 et IL-8 ont été ajoutés dans les cultures à des concentrations décrites au point 2.10. Les molécules utilisées sont les suivantes:

- la «Cycloamine KAAD» (Cyclo), qui inhibe spécifiquement la voie de signalisation **Hedgehog** en se liant au récepteur Smoothed,
- le « γ 40 secretase inhibitor II» (Inhib sécrétase), qui bloque la transmission du signal de la voie de signalisation **Notch**,
- l'«anti-human jagged 1 antibody» (anti-Jagged 1), qui bloque la voie de signalisation **Notch**,
- le «Recombinant Human DKK-1» (Dkk), qui inhibe la voie de signalisation **Wnt**,
- le «Recombinant Human BMPR-IA/Fc chimera» (BMPR), qui lie **BMP-4** et empêche l'action de celui-ci,
- le «Monoclonal Anti-human CXCL8/IL-8 Antibody» (anti-IL-8), le «Monoclonal Anti-human IL-6 Antibody» (anti-IL-6) et l'«Anti-Integrin alpha 4 + beta 1 Antibody» (anti- α 4), qui empêchent respectivement l'action de l'**IL-8**, de l'**IL-6** et du **VLA4** en se liant à ceux-ci.

Comme contrôle, les cellules ont été exposées à un «Mouse IgG1 Isotype Control» (IgG contrôle) ou à du méthanol (MetOH) ou à du diméthylsulfoxyde (DMSO) respectivement les solvants de la Cyclo et de l'Inhib sécrétase.

4.1. Effet direct des anticorps bloquants ou des inhibiteurs sur les MSC

Avant d'étudier la régulation de l'activité pro-hématopoïétique des MSC à l'aide d'anticorps bloquants ou d'inhibiteurs, une étude de l'effet direct de ces molécules sur le phénotype, la capacité de différenciation, la capacité à former des colonies fibroblastiques et la sécrétion de cytokines des MSC a d'abord été réalisée après 2 semaines de culture en présence de ces molécules.

4.1.1. Phénotype

Pour vérifier que le phénotype des MSC reste inchangé après 2 semaines de culture avec des anticorps bloquants ou des inhibiteurs, une analyse par cytométrie en flux des antigènes les plus couramment utilisés pour la caractérisation des MSC a été

Résultats

effectuée. Les cellules étaient négatives pour les antigènes CD11b, CD14, CD36 et CD45 et positives pour les antigènes CD13, CD73, CD90, CD105 et CD106. Le phénotype ne se modifie donc pas même après inhibition des voies de signalisation, de la molécule d'adhésion et des cytokines analysées dans ce travail.

4.1.2. Différenciation

La capacité de différenciation adipocytaire, chondrocytaire et ostéocytaire des MSC a été analysée après 2 semaines de culture en présence des anticorps bloquants ou des inhibiteurs.

4.1.2.1. Différenciation adipocytaire

La différenciation en adipocytes a été révélée à l'aide d'Oil Red O. Les vacuoles lipidiques ont été détectées dans toutes les conditions analysées. Les molécules utilisées n'ont donc pas d'effet sur la capacité de différenciation adipocytaire des MSC.

4.1.2.2. Différenciation chondrocytaire

La différenciation en chondrocytes a été révélée à l'aide de bleu de toluidine. Les MSC incubées avec de la Cyclo, de l'Inhib sécrétase et son solvant le DMSO ne se sont pas différenciées (Figure 30), tandis qu'en présence d'anti-IL-6 et d'anti-IL-8, une plus forte différenciation a été observée en comparaison à l'IgG contrôle. Ceci prouve à croire que la neutralisation de l'IL-6 et de l'IL-8 facilite la différenciation chondrocytaire. En présence des autres molécules, la différenciation s'était effectuée de façon semblable au contrôle.

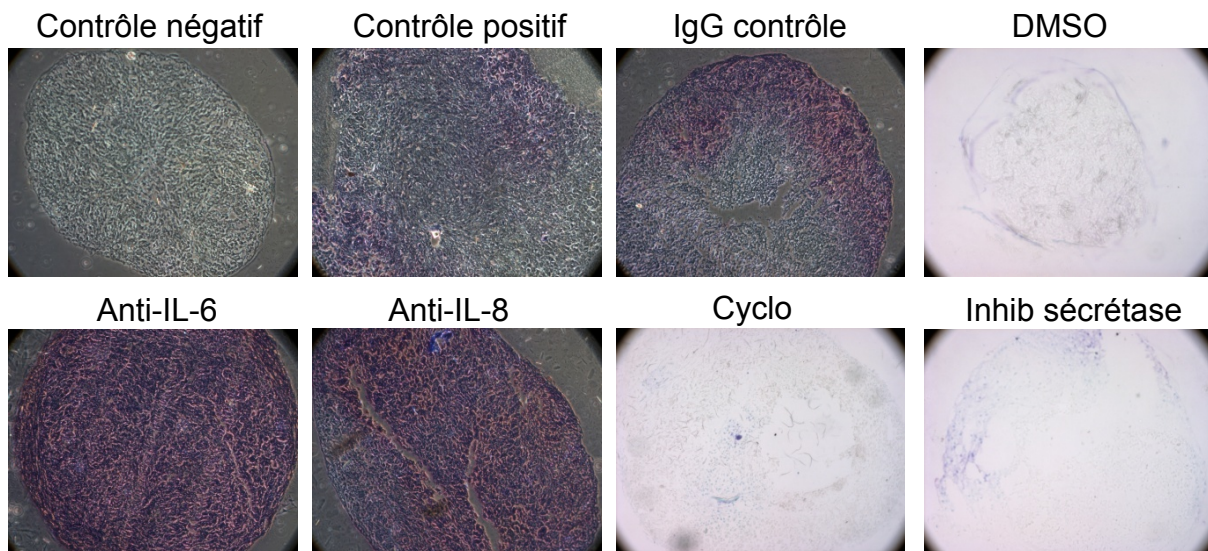


Figure 30: Images représentatives de la différenciation chondrocytaire des MSC après culture en présence d'IgG contrôle, de DMSO, d'anti-IL-6, d'anti-IL-8, de Cyclo et d'Inhib sécrétase. Le contrôle négatif consiste en une culture sans milieu d'induction suivi de la coloration au bleu de toluidine. Le contrôle positif a été effectué à l'aide de MSC non traitées préalablement par les molécules d'inhibition (grossissement 20X).

Résultats

4.1.2.3. Différenciation ostéocytaire

La différenciation en ostéocytes a été révélée à l'aide d'Alizarin Red. Des dépôts calciques ont été détectés dans toutes les conditions analysées. Ceux-ci étaient particulièrement abondants en présence de BMPR (Figure 31).

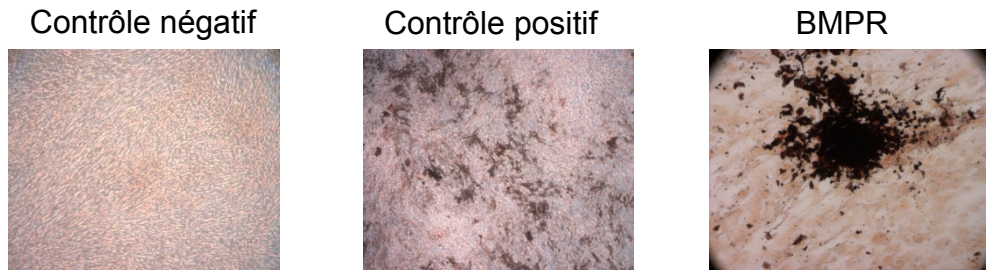


Figure 31: Images représentatives de la différenciation ostéocytaire des MSC après culture en présence de BMPR. Le contrôle négatif consiste en une culture sans milieu d'induction suivi de la coloration à l'Alizarin Red. Le contrôle positif a été effectué à l'aide de MSC non traitées préalablement par les molécules d'inhibition (grossissement 20X).

4.1.3. CFU-F

Des cultures clonogènes ont été réalisées pour évaluer si, en présence des anticorps bloquants ou des inhibiteurs ou leurs contrôles, la fréquence et la pureté des MSC varient. Le nombre de CFU-F n'a pas changé de façon significative. Ces molécules ne jouent donc pas un rôle essentiel dans la capacité des MSC à former des colonies fibroblastiques.

4.1.4. Sécrétion d'IL-6 et d'IL-8

La sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 par les MSC a été analysée après 2 semaines de culture en présence des anticorps bloquants ou des inhibiteurs. L'effet de l'anti- $\alpha 4$ n'a pas été étudié. La concentration en IL-6 augmentait significativement ($p < 0,001$) de 4,5 fois en présence de MetOH et de 3,8 fois en présence de DMSO. L'Inhib sécrétase dont le solvant est le DMSO diminuait la sécrétion d'IL-6 de 2,2 fois ($p < 0,001$). La Cyclo dont le solvant est le MetOH n'a pas d'effet sur la sécrétion d'IL-6. Les effets de la Cyclo et de l'Inhib sécrétase sont difficilement interprétables vu l'artefact induit par leur solvant mais ces molécules auraient tendance à faire diminuer la sécrétion d'IL-6. La présence de l'anti-IL-6 a permis la diminution de l'activité d'IL-6 de 8,5 fois, confirmant l'activité et la spécificité de l'anticorps utilisé. Les autres molécules étudiées n'ont pas fait varier la concentration en IL-6 de façon significative (Figure 32A). De la même façon, la sécrétion d'IL-8 était fortement augmentée ($p < 0,001$) en présence de MetOH (5,5 fois) et de DMSO (6 fois). Quant à la Cyclo et l'Inhib sécrétase, elles diminuaient également la sécrétion de l'IL-8 respectivement de 1,6 fois et de 2,7 fois. Les résultats sont également difficilement interprétables mais montraient une diminution de la sécrétion d'IL-8 en présence de ces 2 molécules. L'anti-Jagged 1 et Dkk augmentaient significativement ($p < 0,01$)

Résultats

l'expression de l'IL-8 respectivement de 1,7 et 1,4 fois. La concentration en IL-8 était indétectable en présence d'anti-IL-8 confirmant également l'activité et la spécificité de l'anticorps utilisé. En présence de BMPR, l'IgG contrôle et d'anti-IL-6, aucune différence significative n'a été observée (Figure 32B).

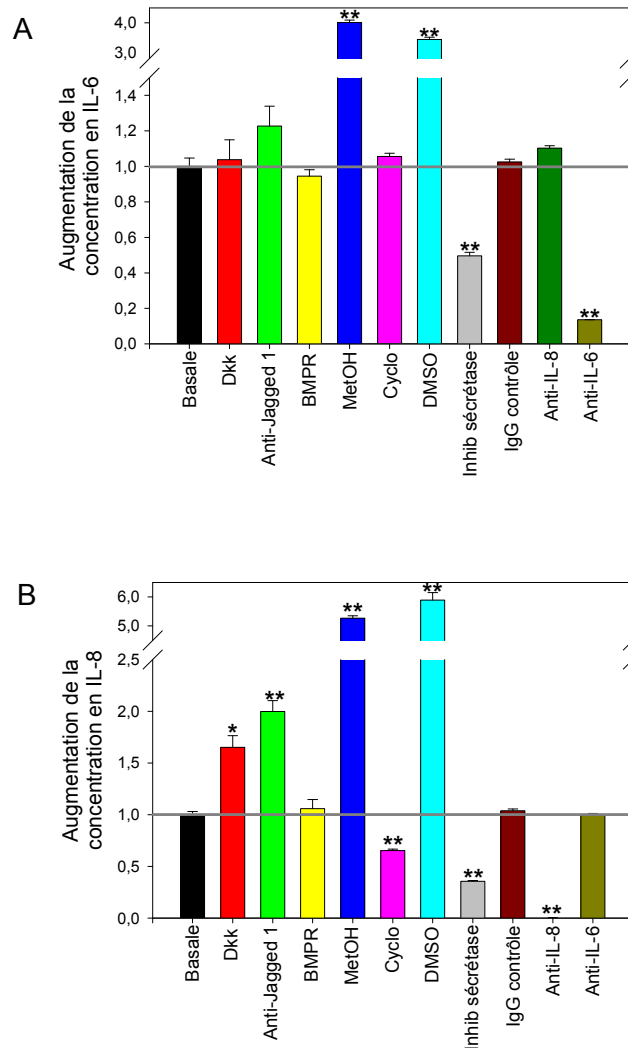


Figure 32: Mesure de la concentration en IL-6 et IL-8 dans du milieu conditionné par des MSC en présence d'anticorps bloquants ou d'inhibiteurs. La ligne grise indique le niveau de la sécrétion basale. **(A)** Augmentation de la concentration en IL-6 par rapport à la condition basale. **(B)** Augmentation de la concentration en IL-8 par rapport à la condition basale.

4.2. Expression de Jagged 1 par les MSC

L'ARNm Jagged 1 a été détecté dans toutes les préparations de MSC analysées par qRT-PCR. Pour montrer la présence de la protéine, un western blot a été réalisé. Les cellules Caski ont été utilisées comme contrôle positif (Veeraraghavalu *et al*, 2004). Les MSC exprimaient la protéine quel que soit le passage ou quelle que soit la moelle osseuse d'origine (Figure 33). Ces résultats ont été confirmés par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage intracellulaire (Figure 34).

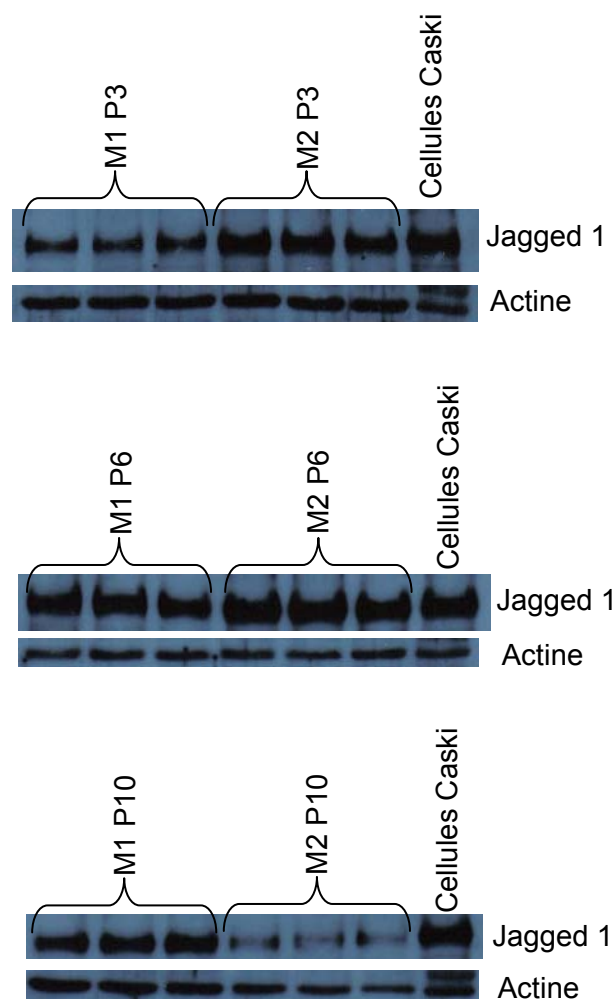


Figure 33: Mise en évidence de la protéine Jagged 1 par «Western blot» dans les MSC de 2 moelles osseuses (M) récoltées aux passages indiqués (P). Les cellules Caski ont été utilisées comme contrôle positif. La révélation de l'actine sur la même membrane est utilisée comme standard interne.

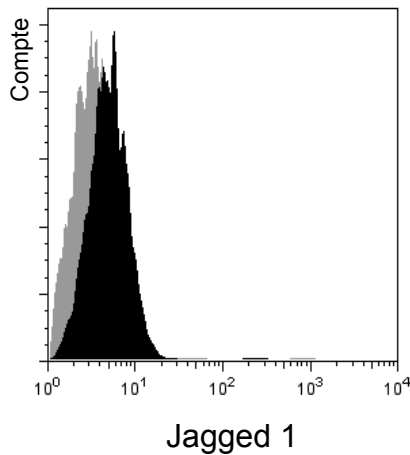


Figure 34: Analyse par cytométrie en flux de l'expression de la protéine Jagged 1 après marquage intracellulaire. Le gris représente le contrôle.

4.3. Effet des anticorps bloquants ou des inhibiteurs sur l'activité pro-hématopoïétique des MSC dans les cultures à long terme

Premièrement, pour étudier le rôle des voies de signalisation Notch, Wnt, BMP et HH dans la régulation de l'hématopoïèse, 5000 cellules CD34⁺ ont été cultivées avec des MSC dans du milieu supplémenté d'inhibiteurs ou d'anticorps neutralisant ces voies de signalisation. Peu importe l'inhibiteur, l'anticorps bloquant, le solvant utilisé ou le passage des MSC, aucune différence significative n'a été observée en comparaison à la condition basale (sans rien ajouter dans la culture) (Figure 35).

Deuxièmement, nous avons entrepris de définir les cytokines ou molécules d'adhésion essentielles contribuant à l'activité pro-hématopoïétique des MSC. Les cellules CD34⁺ ont été cultivées en contact avec des MSC dans du milieu supplémenté d'anticorps neutralisant IL-6 ou IL-8 ou VLA4 ou de l'IgG contrôle. Les cultures à long terme ont été effectuées avec des MSC de passage 2 ou 7 comme couche nourricière. Une diminution des cellules CD34⁺ ($p < 0,05$), CD33⁺ ($p < 0,05$) et CD19⁺ ($p > 0,05$) amplifiées a été observée en présence d'anticorps neutralisant IL-6 ou IL-8 ou VLA4 après 3 semaines de culture au contact des MSC de passage 2. Inversement, quand les cultures sont réalisées avec des MSC de passage 7, aucun effet de l'anticorps neutralisant IL-6 n'a été observé tandis qu'une augmentation des cellules CD34⁺ et CD19⁺ amplifiées a été notée après inhibition de IL-8. La neutralisation de VLA4 diminuait les cellules CD34⁺ et augmentait les cellules CD19⁺ et CD33⁺ ($p < 0,001$) (Figure 36).

Résultats

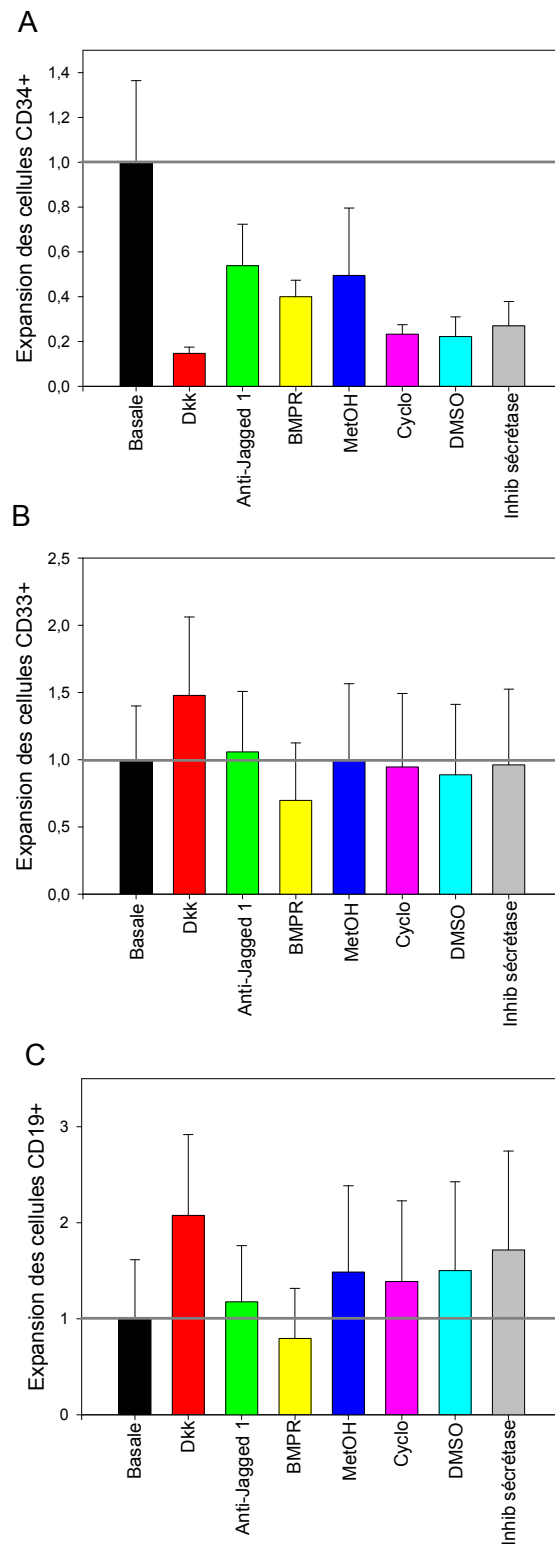


Figure 35: Expansion des cellules CD34+ (**A**), CD33+ (**B**) et CD19+ (**C**) après 3 semaines de culture à long terme avec des MSC (tous passages confondus) en présence d'anticorps bloquants ou d'inhibiteurs par rapport à la condition basale. La ligne grise indique le niveau basal. $n \geq 3$.

Résultats

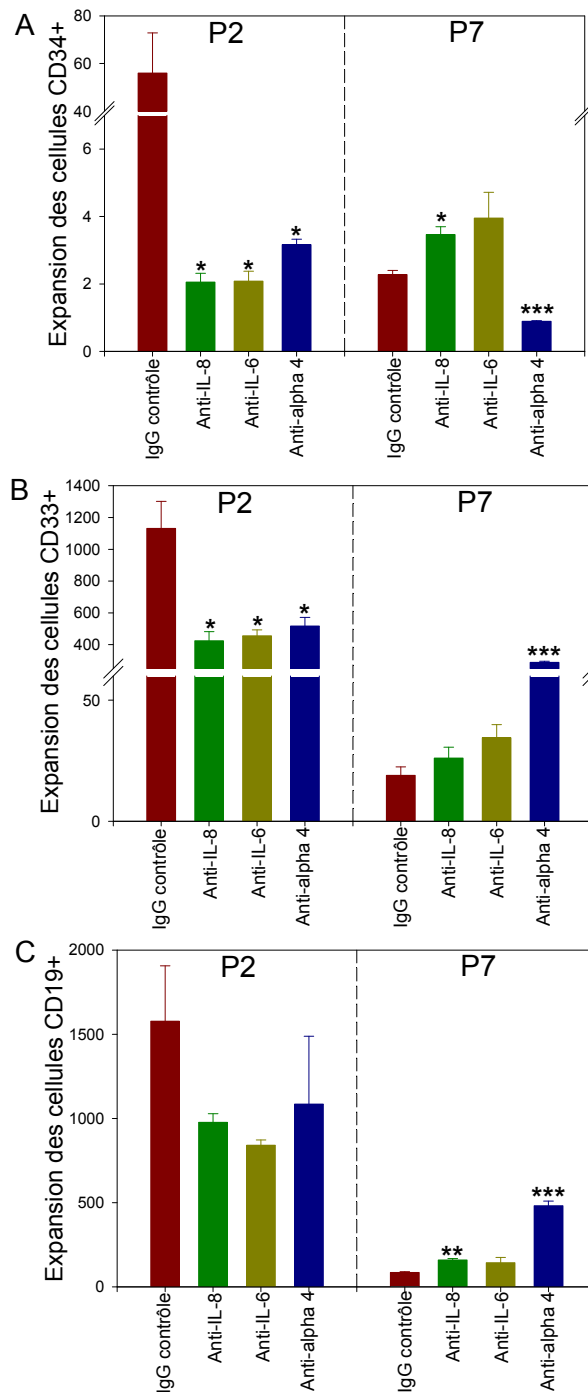


Figure 36: Expansion des cellules CD34+ (A), CD33+ (B) et CD19+ (C) après 3 semaines de culture à long terme avec des MSC de passage (P) 2 ou 7 dans du milieu supplémenté d'anticorps neutralisant IL-8 (vert) ou IL-6 (jaune) ou VLA4 (bleu) ou du contrôle IgG (rouge), n = 3. *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,001 versus IgG contrôle, test T de Student.

4.4. Effet des anticorps bloquants ou des inhibiteurs sur le maintien des SRC en culture ex vivo

Des souris NOD/SCID âgées de 2 mois et irradiées à 3 Gy ont été utilisées dans ces expériences. Les cellules ont été transplantées par injection intraveineuse dans la queue. Après 6 semaines, les souris ont été euthanasiées et les cellules de la moelle osseuse ont été récupérées des fémurs et des tibias. Le chimérisme humain a été analysé par cytométrie en flux. Les souris ont été considérées comme positives lorsqu'au moins 10 cellules CD45+ co-exprimant CD19 ou CD33 ont été détectées sur un total de 100000 cellules analysées (limite de détection: 0,01 %).

Premièrement, les souris ont reçu le produit d'expansion de $1,5 \cdot 10^5$ cellules CD34+ après une semaine de co-culture avec des MSC de passage 2 en présence d'IgG contrôle, anti-Jagged 1 ou Inhib sécrétase (Figure 37A, Tableau 10). L'inhibition de la voie de signalisation Notch via l'anti-Jagged 1 augmentait le pourcentage de cellules humaines dans les souris hôtes ($9,91 \pm 3,25$) en comparaison à l'IgG contrôle ($2,62 \pm 0,78$) tandis que l'inhibition via l'Inhib sécrétase n'augmentait pas le pourcentage de chimérisme de façon significative. La voie de signalisation Notch/Jagged 1 influence le maintien des cellules souches hématopoïétiques au contact des MSC et son activité est essentiellement inhibitrice.

Deuxièmement, le rôle des voies de signalisation BMP, HH et Wnt dans le maintien des SRC a été étudié en injectant aux souris NOD/SCID le produit d'expansion de $1,5 \cdot 10^5$ cellules CD34+ après une semaine de co-culture avec des MSC de passage 2 en présence respectivement de BMPR, Cyclo ou Dkk (Figure 37B, Tableau 10). Aucune différence dans le nombre de souris positives ou dans le pourcentage de chimérisme n'a été observée. Ces 3 voies de signalisation n'influencent donc pas la survie des SRC au contact des MSC dans notre système de co-culture.

Troisièmement, des souris NOD/SCID ont été transplantées avec des cellules CD34+ cultivées une semaine au contact de MSC de passage 2 dans du milieu supplémenté d'anticorps neutralisant IL-6, IL-8, VLA4 ou du IgG contrôle (Figure 37C, Tableau 10). Une faible diminution, statistiquement significative, de l'activité de repeuplement a été notée après neutralisation de l'IL-8 tandis que l'inhibition d'IL-6 ou du VLA4 n'a aucun effet. Ainsi, seul IL-8 serait impliqué dans le maintien des cellules repeuplantes.

Résultats

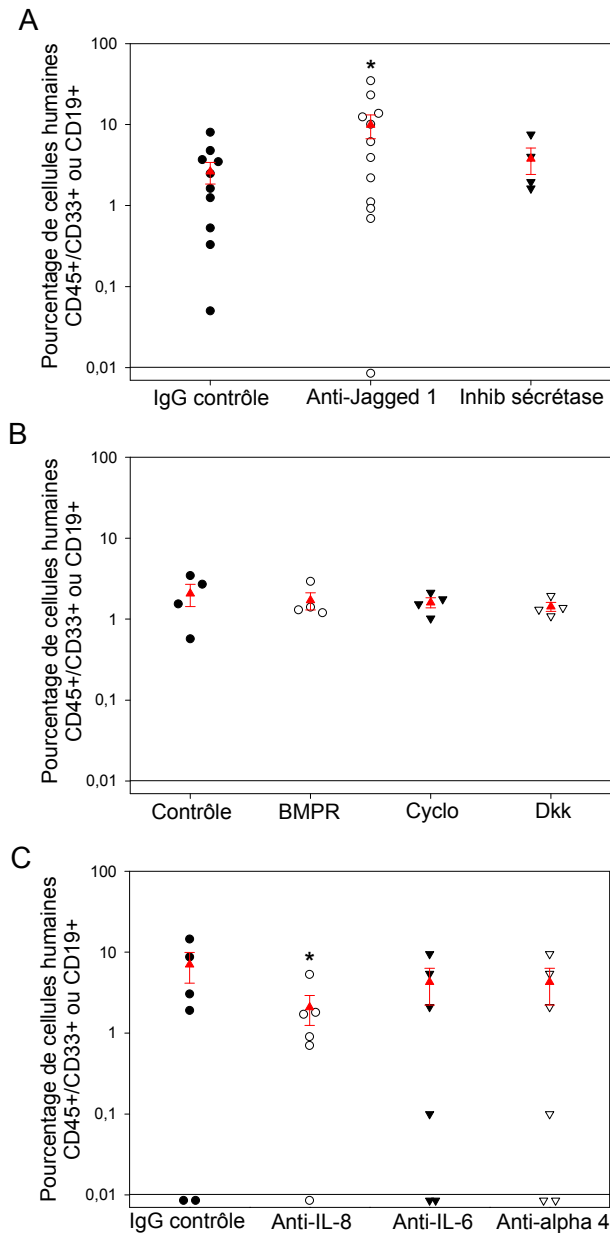


Figure 37: Pourcentage de cellules humaines CD45+/CD19+ ou CD33+ dans la moelle osseuse de souris NOD/SCID greffées. **(A)** Les souris ont reçu le produit d'expansion des cellules CD34+ co-cultivées pendant une semaine avec des MSC en présence d'IgG contrôle, anti-Jagged 1 ou Inhib sécrétase. Chaque point représente une souris. La moyenne et l'erreur-type sont dessinées en rouge. Les souris ont été considérées comme positives lorsqu'au moins 10 cellules CD45+ co-exprimant CD19 ou CD33 ont été détectées sur un total de 100000 cellules analysées (limite de détection: 0,01 %). Les résultats sont exprimés sur une échelle logarithmique. * $p=0,051$ versus IgG contrôle, test T de Student. **(B)** Les souris ont reçu le produit d'expansion des cellules CD34+ co-cultivées pendant une semaine avec des MSC en présence ou non de BMPR, Cyclo ou Dkk. **(C)** Les souris ont reçu le produit d'expansion des cellules CD34+ co-cultivées pendant une semaine avec des MSC en présence d'IgG contrôle, d'anti-IL-8, d'anti-IL-6 ou d'anti- $\alpha 4$. * $p<0,05$ versus IgG contrôle, test de Mann-Whitney.

Résultats

Tableau 10: Récupération des cellules repoplantes après co-culture avec des MSC.

	En présence d'anticorps bloquants ou d'inhibiteurs	Nombre de souris positives/nombre total de souris injectées (%)	% de cellules humaines dans la moelle hôte
Notch	IgG contrôle	10/10 (100)	2,62 ± 0,78
	Anti-Jagged 1	11/12 (92)	9,91 ± 3,25 ¹
	Inhib sécrétase	4/4 (100)	3,79 ± 1,36
BMP, HH et Wnt	Contrôle	4/4 (100)	2,06 ± 0,63
	BMPR	4/4 (100)	1,71 ± 0,41
	Cyclo	4/4 (100)	1,61 ± 0,23
	Dkk	4/4 (100)	1,43 ± 0,18
IL-8, IL-6 et VLA4	IgG contrôle	9/11 (82)	3,53 ± 1,63
	Anti-IL-8	9/11 (82)	2,26 ± 0,61 ²
	Anti-IL-6	8/11 (73)	3,58 ± 1,39
	Anti-α4	4/6 (67)	4,28 ± 2,06

Les souris NOD/SCID ont été transplantées avec le produit d'expansion après une semaine de co-culture de $1,5 \cdot 10^5$ cellules CD34+ et de MSC de passage 2 dans les conditions indiquées. La proportion de souris positives et le pourcentage moyen de cellules humaines dans les souris positives sont donnés pour chaque condition 5 semaines après greffe.

¹p=0,051 versus IgG contrôle, test de T de Student.

²p<0,05 versus IgG contrôle, test de Mann-Whitney.

4.5. Discussion de la deuxième partie

Le microenvironnement hématopoïétique de la moelle osseuse est une structure cellulaire complexe. De nombreuses investigations sont entreprises dans le but de préciser les composants cellulaires et moléculaires de ce microenvironnement ainsi que leur rôle dans la régulation et l'entretien de l'hématopoïèse. Nous nous attardons principalement sur les cellules souches mésenchymateuses (MSC) de la niche hématopoïétique. Le potentiel multiple des MSC, leurs facilités d'isolement et de culture ainsi que leur haut potentiel d'expansion in vivo font de ces cellules un outil thérapeutique intéressant, capable de jouer un rôle dans de nombreuses applications cliniques (Minguell *et al*, 2001).

Notre intérêt s'est d'abord porté sur les voies de signalisation Notch, Wnt, HH et BMP. Ces voies sont connues comme jouant un rôle dans l'hématopoïèse mais leurs implications exactes ne sont pas encore bien définies. De nombreuses études ont montré des résultats parfois très différents, voire contradictoires. C'est pourquoi une étude plus approfondie de ces voies de signalisation reste nécessaire. Pour cela, des inhibiteurs et des anticorps bloquant ces voies ont été utilisés dans les cultures de MSC et dans nos systèmes de co-culture entre MSC et cellules CD34+ de sang de cordon ombilical.

Pour mieux définir l'effet exact de ces molécules dans nos systèmes de co-culture, les MSC ont été cultivées en présence de ces inhibiteurs ou anticorps bloquants pour déterminer l'effet direct de ces molécules sur le phénotype, la capacité de différenciation, la capacité à former des colonies fibroblastiques et la sécrétion de

Résultats

cytokines. Nos résultats montrent que les voies de signalisation Notch, Wnt, BMP et HH n'ont pas d'effet sur le phénotype ni sur la capacité à former des colonies fibroblastiques des MSC. Les MSC ont conservé leur potentiel de différenciation intact en présence des inhibiteurs étudiés, à l'exception de la chondrogenèse qui est inhibée par la Cyclo et l'Inhib sécrétase. Toutefois, le DMSO, solvant de l'Inhib sécrétase, produit le même effet. Ceci ne permet pas de conclure à un rôle direct de la voie Notch sur la chondrogenèse. Nos résultats suggèrent néanmoins que la voie HH joue un rôle important dans la différenciation chondroblastique. Une différenciation ostéoblastique a été notée en présence de Dkk, inhibiteur de la voie Wnt, ce qui contraste avec les observations de l'équipe de Gregory (Gregory et al, 2005a). Cette discordance peut s'expliquer de diverses façons. D'une part, les MSC pourraient utiliser une voie alternative pour compenser l'inhibition de Wnt; d'autre part, l'intensité et la durée de l'inhibition utilisées dans nos expériences seraient insuffisantes pour altérer le potentiel ostéoblastique des MSC.

Dkk et anti-Jagged 1 stimulent la sécrétion d'IL-8. Ceci démontre l'intervention des voies Wnt et Jagged 1/Notch dans l'activité sécrétoire des MSC et, par cet intermédiaire, sur l'activité biologique des MSC vis-à-vis des lymphocytes B et des neutrophiles.

L'inhibition des voies de signalisation Wnt, HH et BMP n'a montré aucun effet sur les LTC-IC ni sur les SRC. Ceci pourrait s'expliquer par une inhibition trop peu importante de ces voies dans notre système ou par le fait que l'effet dû à l'inhibition d'une de ces voies est peut-être pallié par une autre voie toujours active.

La voie Jagged 1/Notch, quant à elle, interviendrait pour inhiber le maintien des SRC au contact des MSC. En effet, l'inhibiteur de la voie Notch, l'anti-Jagged 1, produit une augmentation du chimérisme des souris hôtes. Ces observations semblent contredire les résultats publiés dans la littérature montrant que Notch favorise l'autorenouvellement par rapport à la différenciation (Milner & Bigas, 1999). En culture à long terme, nous observons en effet que l'anti-Jagged 1 inhibe la multiplication de cellules CD34+. Dès lors, nous pouvons émettre deux hypothèses pour expliquer nos résultats: en inactivant Notch, les cellules CD34+ voient leur prolifération ralentie, ce qui pourrait favoriser le maintien de leur immaturité ou, en freinant leur multiplication, l'anti-Jagged 1 maintiendrait les cellules CD34+ dans un état de quiescence qui favorise l'implantation médullaire des HSC.

L'IL-6 et l'IL-8 sont les molécules les plus abondamment sécrétées par les MSC. Des expériences d'inhibition ont également été effectuées pour mieux définir le rôle de ces cytokines dans le support de l'hématopoïèse des MSC. Ces essais ont montré que chacune de ces molécules contribuait à la production des cellules CD34+, CD19+ et CD33+ dans les cultures supportées par les MSC de passages faibles mais pas avec des MSC de passages élevés. De façon intéressante, l'inhibition de l'IL-8, mais pas celle de l'IL-6, était aussi associée à la diminution du maintien des SRC en culture avec des MSC de passage 2. Ceci suggère que la mesure d'IL-8

Résultats

peut représenter un marqueur montrant l'activité pro-hématopoïétique des MSC tandis que la sécrétion élevée d'IL-6, comme observé dans le milieu conditionné par des MSC de passages tardifs, ne contribue pas à un meilleur support des cellules hématopoïétiques. En culture liquide, l'ajout d'IL-8 stimule la prolifération des cellules CD34+ tandis que l'ajout d'un anticorps bloquant le récepteur de l'IL-8 inhibe leur prolifération (Corre *et al*, 1999). Le mécanisme par lequel IL-8 favorise le maintien des SRC en culture *ex vivo* nécessite d'être analysé. IL-8 a été rapporté comme stimulant les métastases et l'angiogenèse dans différents modèles de tumeurs (Li *et al*, 2005). De la même façon, notre hypothèse est que l'IL-8 favorise la prise de greffe des cellules repeuplantes en augmentant l'expression de MMP-2 et, par conséquent, la migration et l'infiltration dans la moelle osseuse.

En culture de Dexter, la neutralisation de VCAM-1 ou de VLA4 inhibe le développement tant des progéniteurs myéloïdes que lymphoïdes (Miyake *et al*, 1991a; Miyake *et al*, 1991b). De la même façon, dans nos co-cultures, au passage 2, la neutralisation du VLA4 entraîne une diminution de la différenciation et de la prolifération des cellules CD34+. Inversement, la génération de cellules différenciées est plus importante au passage 7. Nous pourrions émettre l'hypothèse qu'au passage 2, la liaison de l'anticorps neutralisant anti- $\alpha 4$ détache les HSC des MSC. Cette séparation ne permet plus l'action des signaux positifs émis par les MSC pour stimuler la différenciation et la prolifération. A l'inverse, pendant la neutralisation de la liaison VCAM/VLA4 au passage 7, les HSC ne subiraient plus l'influence de signaux intrinsèques négatifs et donc se différencieraient de façon plus rapide. En effet, nous avons observé, dans la première partie de notre travail, que le support de l'hématopoïèse diminue avec le nombre de passages. L'apparition de signaux inhibiteurs avec le nombre de passages est donc envisageable.

En conclusion, la voie de signalisation Jagged 1/Notch jouerait un rôle essentiel dans le support des HSC médié par les MSC et aurait une action préférentiellement inhibitrice. Les voies de signalisation Wnt, HH et BMP auraient un impact moins important. Inversement, la cytokine IL-8 ainsi que la molécule d'adhésion VCAM-1 auraient une action activatrice favorisant la prolifération et la différenciation des HSC, au contact de MSC de passages précoces. IL-6 ne jouerait pas un rôle primordial.

Discussion
générale
&
Perspectives

5. Discussion générale et perspectives

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) résident dans la moelle osseuse et se différencient en de multiples types cellulaires qui constituent le microenvironnement hématopoïétique: fibroblastes, cellules endothéliales, adipocytes et ostéoblastes. Les MSC peuvent aussi donner naissance à d'autres types cellulaires d'origine mésodermique, tels que les chondrocytes et les cellules musculaires striées, qui ne participent pas à l'hématopoïèse. Certains travaux suggèrent qu'elles peuvent également se différencier en cellules d'origine neuroectodermique (neurones, astrocytes, oligodendrocytes), voire endodermique (hépatocytes). Les MSC ou leur descendance jouent un rôle indirect dans l'hématopoïèse en tant que cellules accessoires des cellules souches hématopoïétiques (HSC), dont elles favorisent la survie, la prolifération et l'implantation médullaire (Koc *et al*, 2000; Bensedhoum *et al*, 2004).

Les interactions entre les HSC et les cellules stromales ont été principalement étudiées par le biais des «cultures à long terme» initialement décrites par Dexter (Dexter *et al*, 1977). Dans les cultures primaires de moelle osseuse, la fraction cellulaire adhérente permet la multiplication de cellules souches capables secondairement de régénérer l'hématopoïèse d'un receveur irradié.

Les greffes de HSC sont principalement pratiquées dans le traitement des hémopathies malignes mais également dans celui des cancers solides, dans le but de pallier les effets secondaires hématologiques des traitements de chimiothérapie et/ou de radiothérapie à hautes doses (Storb, 2003).

La capacité d'amplifier les HSC *ex vivo* aurait un impact important sur leur transplantation en clinique. On éliminerait en grande partie les difficultés liées au nombre insuffisant de HSC recueillies pour la transplantation, en particulier dans le cas du sang de cordon, qui contient un nombre fini de cellules, insuffisant pour permettre une reconstitution hématologique rapide et durable après greffe. Bien que des progrès significatifs aient été réalisés pour identifier les cytokines permettant le maintien, voire l'expansion modeste, des HSC *in vitro*, un protocole permettant leur amplification extensive reste à définir. Les résultats les plus prometteurs ont été obtenus en cultivant les HSC sur des couches de cellules nourricières, provenant de lignées de fibroblastes murins immortalisés. En raison du risque pathogène de telles lignées, l'application clinique d'un tel procédé reste difficile. Dans cette application, les MSC humaines pourraient remplacer les lignées stromales murines.

Dans la première partie de cette étude, nous analysons l'influence du nombre de passages sur la capacité des MSC à soutenir l'expansion et le homing des HSC. Dans la seconde partie de ce travail, nous étudions la régulation de l'activité pro-hématopoïétique des MSC à l'aide d'anticorps bloquants ou d'inhibiteurs. Nous nous intéressons plus particulièrement aux voies de signalisation Notch, Wnt, BMP et HH ainsi qu'à la molécule d'adhésion VCAM-1 et aux cytokines IL-6 et IL-8.

Une caractéristique des cellules souches mésenchymateuses est leur capacité à produire un spectre de cytokines et de facteurs de croissance qui régulent la prolifération, la différenciation et la survie des HSC et de leurs précurseurs. Dans la première partie de ce travail, nous avons analysé l'expression constitutive de ces facteurs par les MSC ainsi que leur expression en réponse à un traitement avec de l'IL-1 α . Par rapport aux résultats rapportés par l'équipe de Majumdar, qui montre, par une analyse RT-PCR, une expression du mRNA de l'IL-6, de l'IL-7, de l'IL-8, de l'IL-15, de LIF, de Flt-3 ligand et de SCF dans des conditions de culture normale (Majumdar *et al*, 1998), nous observons une expression supplémentaire des protéines VCAM-1 et TIMP-1. Par contre, même si l'IL-7, l'IL-15, le Flt-3 ligand et le SCF sont exprimés au niveau génique, nous n'en retrouvons pas les protéines correspondantes. Le traitement avec la molécule inflammatoire IL-1 α montre une augmentation du taux du mRNA de l'IL-1 α , de l'IL-6, de l'IL-8, de l'IL-11, du G-CSF, du GM-CSF et de LIF et ne semble pas altérer l'expression d'IL-7, de SCF et de Flt-3 ligand (Majumdar *et al*, 1998). Nos résultats corroborent ceux du groupe de Majumdar à l'exception du manque d'expression protéique du G-CSF et de l'IL-11. Dans cette condition stimulée, nous avons ajouté 10 ng/ml d'IL-1 α durant 72 h, il est donc normal de détecter cette molécule. Cependant, Majumdar a montré une régulation autocrine de l'IL-1 α . Pour déterminer si le spot plus intense d'IL-1 α détecté est dû à la molécule stimulante ajoutée ou à une stimulation autocrine, la mesure de la quantité d'IL-1 α devrait être effectuée et permettrait de voir si elle est supérieure à celle ajoutée et/ou si l'expression génique est stimulée par IL-1 α . La stimulation des MSC par l'IL-1 α a des implications cliniques. En effet, les patients qui reçoivent une greffe sont préalablement irradiés et de ce fait entrent dans une période d'aplasie médullaire durant laquelle le nombre de globules blancs chute et favorise des infections opportunistes qui provoquent une inflammation et une augmentation de la molécule IL-1 α .

Nous avons également montré que certaines MMP et TIMP étaient sécrétées par les MSC. Dans les conditions basales, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-13, TIMP-1 et TIMP-4 sont détectés dans le milieu conditionné par les MSC. Quand les MSC sont stimulées avec de l'IL-1 α , une sécrétion supplémentaire de MMP-10 est observée. MMP-2 est une gélatinase qui a la capacité de dégrader le collagène de type IV, un composant majeur de la membrane basale. L'équipe de De Becker montre que la neutralisation de MMP-2 avec un anticorps bloquant ou un siRNA diminue la capacité de migration trans-endothéliale des MSC *in vitro* (De Becker *et al*, 2007). La capacité des MSC à se greffer dans la moelle hôte décline avec la durée de culture (Kyriakou *et al*, 2008). Un dosage de la sécrétion des MMP à différents passages permettrait de définir si la diminution du «homing» des MSC avec les passages serait corrélée à une réduction de la sécrétion d'une ou plusieurs MMP.

Les TIMP sont les inhibiteurs naturels des MMP impliquées dans le maintien de l'intégrité de la matrice extracellulaire. Quatre TIMP actuellement caractérisées chez l'humain sont exprimés par différents types cellulaires comme les cellules

hématopoïétiques et les kératinocytes (Gomez *et al*, 1997). Comme inhibiteurs naturels des MMP, les TIMP sont impliqués à la fois dans les situations physiologiques et pathologiques incluant l'invasion et l'angiogenèse (Fassina *et al*, 2000). En plus de leur activité inhibitrice des MMP, les TIMP, et en particulier TIMP-1, montrent d'autres fonctions biologiques dans la survie cellulaire, la différenciation et la prolifération (Lambert *et al*, 2004). TIMP-1 a d'abord été décrit pour son activité pro-érythroïde et ainsi proposé comme un important régulateur de l'érythropoïèse (Hayakawa *et al*, 1990) capable de stimuler la prolifération des cellules K562 (Avalos *et al*, 1988) ainsi que des progéniteurs érythroïdes précoces et tardifs de la moelle osseuse humaine (Westbrook *et al*, 1984). Cependant, l'équipe de Hayakawa a démontré que TIMP-1 montrait également une activité mitogénique sur les autres cellules et a proposé TIMP-1 comme un nouveau facteur de croissance cellulaire (Hayakawa *et al*, 1992). Une autre fonction de TIMP-1 a également été décrite; TIMP-1 régulerait la différenciation des lignées cellulaires B (Guedez *et al*, 2005). Il y a de nombreux arguments montrant que TIMP-1 est capable d'activer les voies de signalisation intracellulaires (Lambert *et al*, 2004). TIMP-1 pourrait donc être une molécule de choix pour étudier l'activité pro-hématopoïétique des MSC. De la même façon, l'utilisation d'un anticorps bloquant permettrait de mettre en évidence le rôle de TIMP-1 dans la différenciation des cellules souches hématopoïétiques. Dans notre travail, nous avons pu différencier les cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon ombilical jusqu'au stade de cellules B immatures exprimant IgM. Dans un premier temps, le dosage de TIMP-1 à différents passages nous permettrait de déterminer si celui-ci est sécrété de façon stable au cours des passages. Ensuite, l'inhibition de l'activité de TIMP-1, par un anticorps bloquant et/ou siRNA, nous permettrait de définir à quel stade cette molécule joue un rôle dans la différenciation lymphoïde B.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons observé que l'inhibition de Jagged 1 favorisait le repeuplement des cellules humaines chez la souris NOD/SCID. Cette inhibition était également accompagnée d'une augmentation de la sécrétion d'IL-8 par les MSC. Lorsque l'IL-8 était neutralisée, une diminution du chimérisme était observée. Ceci nous permettrait dans un premier temps d'établir l'hypothèse que la voie de signalisation Jagged 1/Notch pourrait avoir un impact indirect sur l'activité pro-hématopoïétique. Son inhibition permettrait la sécrétion d'IL-8 qui jouerait un rôle dans le soutien des SRC. En effet, une étude a montré qu'en culture liquide, l'ajout d'IL-8 stimule la prolifération des cellules CD34+ (Corre *et al*, 1999). Cependant, l'ajout d'Inhib sécrétase, qui inhibe la voie de signalisation Notch plus en aval et qui ne permet aucune activation ni par Jagged ni par Delta-like, n'a pas d'effet sur le soutien des SRC et fait même diminuer la sécrétion d'IL-8. Il faut donc imaginer un système beaucoup plus complexe. En effet, plusieurs études ont montré des résultats contradictoires sur l'effet de l'activation ou de l'inhibition de cette voie. Nous ne pouvons pas considérer un système ON/OFF. Il faut plutôt envisager que, suivant le niveau d'activation de la voie, un résultat plus ou moins important est observé. En effet, l'équipe de Delaney montre un effet dose dépendant du ligand

Delta-like 1 sur la différenciation *ex vivo* et sur la capacité de repeuplement *in vivo* des cellules de sang de cordon ombilical. Ils observent un meilleur repeuplement médullaire après culture des cellules CD34+ en présence de faibles concentrations de Delta-like 1 comparé au contrôle ou à des concentrations plus élevées (Delaney *et al*, 2005). Notre hypothèse est que, lorsque la voie Notch est inhibée avec l'anti-Jagged 1, Delta-like compense cette inhibition et active la voie, ce qui favorise entre autres la sécrétion d'IL-8. Pour confirmer notre hypothèse, une mesure de l'activation de la voie Notch serait nécessaire. L'étude de l'expression des gènes cibles de la voie tels que HES-1 et Deltex, en présence ou non de l'anti-Jagged 1 ou de Delta-like, permettrait de démontrer l'état d'activation de la voie.

Nous avons montré que la sécrétion d'IL-8 ainsi que le soutien des SRC par les MSC diminuent avec le nombre de passages. IL-8 aurait donc une action sur le soutien des SRC mais elle ne serait que partielle; d'autres molécules ou voies de signalisation, qui restent encore à définir, doivent également jouer un rôle. En effet, dans notre travail, nous observons que l'inhibition de la voie Wnt par Dkk provoque également l'augmentation de la sécrétion d'IL-8 mais n'a aucun effet sur le repeuplement médullaire.

Une simple caractérisation phénotypique suivie de différenciations, comme le propose l'ISCT (Dominici *et al*, 2006), est insuffisante pour prédire l'activité biologique des préparations de MSC. En effet, nous avons montré dans la première partie de notre travail que l'activité pro-hématopoïétique des MSC diminuait avec le nombre de passages, aussi bien sur le soutien des LTC-IC que des SRC. Nous avons également montré que la sécrétion d'IL-6 augmentait et celle d'IL-8 diminuait avec le nombre de passages. De plus, une étude a établi que la capacité des MSC à se greffer dans la moelle osseuse du receveur diminue avec le nombre de passages (Kyriakou *et al*, 2008). Ensuite, un groupe a observé que des MSC purifiées suivant leur expression de l'antigène STRO-1 ont un meilleur effet immunosuppresseur que des MSC purifiées par la méthode classique d'adhérence au plastique (Nasef *et al*, 2009). Les MSC STRO-1+ inhibent davantage la prolifération des lymphocytes que les MSC classiques. De plus, suivant la source des MSC utilisées, différents profils sécrétoires sont obtenus. Par exemple, les MSC de moelle osseuse, de sang de cordon, du sac amniotique et de la membrane déciduale du placenta expriment toutes les protéines MIF, IL-8, IL-6, GRO α et Serpin E1 mais à des taux très variables. En outre, les MSC de moelle osseuse sont les seules à sécréter du SDF-1. Seules les MSC du sac amniotique et de la moelle osseuse sécrètent MCP-1 (Hwang *et al*, 2009). Enfin, le profil sécrétoire est également variable suivant le milieu de culture utilisé (Lee *et al*, 2009). Dans tous ces exemples, les MSC présentaient un phénotype mésenchymateux et une capacité de différenciation; cependant, leur activité biologique et leur profil sécrétoire sont variables. C'est pourquoi la source, la méthode de purification, le milieu de culture et la durée d'expansion des MSC sont primordiaux pour leur utilisation en clinique.

Les applications cliniques des greffes de MSC sont potentiellement nombreuses. Des études récentes indiquent que la co-transplantation de HSC et de MSC facilite la récupération hématologique (Noort *et al*, 2002; Angelopoulou *et al*, 2003; Bensidhoum *et al*, 2004; Park *et al*, 2007; Lee *et al*, 2008). Les MSC possèdent également une action immunosuppressive et permettent de traiter la maladie du greffon contre l'hôte (graft-versus-host disease, GVHD) après greffe allogénique de HSC (Le Blanc *et al*, 2008). Enfin, les MSC ont la faculté de s'implanter dans de nombreux tissus extra-hématopoïétiques et pourraient contribuer aux processus de régénération ou de réparation tissulaires (Devine *et al*, 2003). Cependant, de nombreuses études montrent des résultats divergents. Par exemple, un essai clinique récent (Ning *et al*, 2008) a montré que les patients qui ont reçu une dose de MSC, en plus de la greffe de HSC, récupéraient leurs taux de plaquettes et de neutrophiles de la même façon que les patients qui n'ont reçu que les HSC. Le groupe qui a reçu des MSC présentait 5 fois moins de GVHD aiguës et 2 fois moins de GVHD chroniques mais 3 fois plus de rechutes que le groupe n'en ayant pas reçu. Ceci confirme que les MSC auraient bien un effet immunosuppresseur mais qu'il faut les utiliser avec précaution puisqu'elles favoriseraient la rechute. Une autre application clinique des MSC consiste à les utiliser pour la réparation de la fibrose du foie. Certaines études montrent que l'injection de MSC chez le rat, après induction chimique d'une fibrose hépatique, restaure le niveau d'albumine sérique et fait diminuer le taux des transaminases et le niveau de fibrose (Oyagi *et al*, 2006; Abdel Aziz *et al*, 2007). D'autres groupes, par contre, ne montrent aucun effet des MSC comparé au groupe contrôle (Popp *et al*, 2007; Carvalho *et al*, 2008). Ces résultats opposés peuvent être simplement expliqués par le fait que les MSC ne sont pas purifiées de la même façon et/ou n'ont pas le même tissu d'origine et/ou n'ont pas la même durée d'expansion et/ou n'ont pas été cultivées dans le même milieu de culture. Puisque les MSC sont une population hétérogène de cellules, suivant les techniques de préparations, une sous-population va être sélectionnée. C'est pourquoi standardiser les techniques de purification et d'expansion des préparations de MSC est primordial. Suivant l'application clinique désirée, il est essentiel de bien définir la source des MSC, les techniques de culture et la durée d'expansion, tout en démontrant leur efficacité pour sélectionner la population de MSC ayant l'activité biologique souhaitée.

Bibliographie

Bibliographie

- Abdel Aziz M.T., Atta H.M., Mahfouz S., Fouad H.H., Roshdy N.K., Ahmed H.H., Rashed L.A., Sabry D., Hassouna A.A., & Hasan N.M. (2007) Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. *Clin.Biochem.*, **40**, 893-899.
- Alakel N., Jing D., Muller K., Bornhauser M., Ehninger G., & Ordemann R. (2009) Direct contact with mesenchymal stromal cells affects migratory behavior and gene expression profile of CD133(+) hematopoietic stem cells during ex vivo expansion. *Exp Hematol.*, **37**, 504-513.
- Allers C., Sierralta W.D., Neubauer S., Rivera F., Minguell J.J., & Conget P.A. (2004) Dynamic of distribution of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice. *Transplantation*, **78**, 503-508.
- Alsalameh S., Amin R., Gemba T., & Lotz M. (2004) Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum.*, **50**, 1522-1532.
- Angelopoulou M., Novelli E., Grove J.E., Rinder H.M., Civin C., Cheng L., & Krause D.S. (2003) Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice. *Exp.Hematol.*, **31**, 413-420.
- Artavanis-Tsakonas S., Rand M.D., & Lake R.J. (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, **284**, 770-776.
- Austin T.W., Solar G.P., Ziegler F.C., Liem L., & Matthews W. (1997) A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. *Blood*, **89**, 3624-3635.
- Avalos B.R., Kaufman S.E., Tomonaga M., Williams R.E., Golde D.W., & Gasson J.C. (1988) K562 cells produce and respond to human erythroid-potentiating activity. *Blood*, **71**, 1720-1725.
- Battula V.L., Trembl S., Bareiss P.M., Gieseke F., Roelofs H., de Zwart P., Muller I., Schewe B., Skutella T., Fibbe W.E., Kanz L., & Bühring H.J. (2009) Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica*, **94**, 173-184.
- Behrens J., von Kries J.P., Kuhl M., Bruhn L., Wedlich D., Grosschedl R., & Birchmeier W. (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, **382**, 638-642.
- Bensidhoum M., Chapel A., Francois S., Demarquay C., Mazurier C., Fouillard L., Bouchet S., Bertho J.M., Gourmelon P., Aigueperse J., Charbord P., Gorin N.C., Thierry D., & Lopez M. (2004) Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood*, **103**, 3313-3319.
- Bentzon J.F., Stenderup K., Hansen F.D., Schroder H.D., Abdallah B.M., Jensen T.G., & Kassem M. (2005) Tissue distribution and engraftment of human mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **330**, 633-640.
- Berardi A.C., Meffre E., Pflumio F., Katz A., Vainchenker W., Schiff C., & Coulombel L. (1997) Individual CD34+CD38lowCD19-CD10- progenitor cells from human cord blood generate B lymphocytes and granulocytes. *Blood*, **89**, 3554-3564.
- Bernad A., Kopf M., Kulbacki R., Weich N., Koehler G., & Gutierrez-Ramos J.C. (1994) Interleukin-6 is required in vivo for the regulation of stem cells and committed progenitors of the hematopoietic system. *Immunity*, **1**, 725-731.
- Bertrand F.E., Eckfeldt C.E., Fink J.R., Lysholm A.S., Pribyl J.A., Shah N., & LeBien T.W. (2000) Microenvironmental influences on human B-cell development. *Immunol.Rev.*, **175**, 175-186.

Bibliographie

- Bhardwaj G., Murdoch B., Wu D., Baker D.P., Williams K.P., Chadwick K., Ling L.E., Karanu F.N., & Bhatia M. (2001) Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat.Immunol.*, **2**, 172-180.
- Bhatia M., Bonnet D., Wu D., Murdoch B., Wrana J., Gallacher L., & Dick J.E. (1999) Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *J.Exp.Med.*, **189**, 1139-1148.
- Bhatia M., Wang J.C., Kapp U., Bonnet D., & Dick J.E. (1997) Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **94**, 5320-5325.
- Boiret N., Rapatel C., Veyrat-Masson R., Guillouard L., Guerin J.J., Pigeon P., Descamps S., Boisgard S., & Berger M.G. (2005) Characterization of nonexpanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow. *Exp.Hematol.*, **33**, 219-225.
- Brenner M. (2000) To be or notch to be. *Nat.Med.*, **6**, 1210-1211.
- Calvi L.M., Adams G.B., Weibrecht K.W., Weber J.M., Olson D.P., Knight M.C., Martin R.P., Schipani E., Divieti P., Bringham F.R., Milner L.A., Kronenberg H.M., & Scadden D.T. (2003) Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, **425**, 841-846.
- Caplan A.I. (1991) Mesenchymal stem cells. *J.Orthop.Res.*, **9**, 641-650.
- Carvalho A.B., Quintanilha L.F., Dias J.V., Paredes B.D., Mannheimer E.G., Carvalho F.G., Asensi K.D., Gutfilen B., Fonseca L.M., Resende C.M., Rezende G.F., Takiya C.M., de Carvalho A.C., & Goldenberg R.C. (2008) Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury. *Stem Cells*, **26**, 1307-1314.
- Cashman J.D., Lapidot T., Wang J.C., Doedens M., Shultz L.D., Lansdorp P., Dick J.E., & Eaves C.J. (1997) Kinetic evidence of the regeneration of multilineage hematopoiesis from primitive cells in normal human bone marrow transplanted into immunodeficient mice. *Blood*, **89**, 4307-4316.
- Chapel A., Bertho J.M., Bensidhoum M., Fouillard L., Young R.G., Frick J., Demarquay C., Cuvelier F., Mathieu E., Trompier F., Dudoignon N., Germain C., Mazurier C., Aigueperse J., Borneman J., Gorin N.C., Gourmelon P., & Thierry D. (2003) Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J.Gene Med.*, **5**, 1028-1038.
- Chen J.K., Taipale J., Cooper M.K., & Beachy P.A. (2002) Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev.*, **16**, 2743-2748.
- Chiu C.P., Moulds C., Coffman R.L., Rennick D., & Lee F. (1988) Multiple biological activities are expressed by a mouse interleukin 6 cDNA clone isolated from bone marrow stromal cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **85**, 7099-7103.
- Conneally E., Cashman J., Petzer A., & Eaves C. (1997) Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **94**, 9836-9841.
- Corre I., Pineau D., & Hermouet S. (1999) Interleukin-8: an autocrine/paracrine growth factor for human hematopoietic progenitors acting in synergy with colony stimulating factor-1 to promote monocyte-macrophage growth and differentiation. *Exp.Hematol.*, **27**, 28-36.

Bibliographie

- Cuevas P., Carceller F., Garcia-Gomez I., Yan M., & Dujovny M. (2004) Bone marrow stromal cell implantation for peripheral nerve repair. *Neurol.Res.*, **26**, 230-232.
- da Silva C.L., Goncalves R., Crapnell K.B., Cabral J.M., Zanjani E.D., & Almeida-Porada G. (2005) 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.*, **33**, 828-835.
- De Bari C., Dell'Accio F., Tylzanowski P., & Luyten F.P. (2001) Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.*, **44**, 1928-1942.
- De Becker A., Van Hummelen P., Bakkus M., Vande Broek I., De Wever J., De Waele M., & Van Riet I. (2007) Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Haematologica*, **92**, 440-449.
- Delaney C., Varnum-Finney B., Aoyama K., Brashem-Stein C., & Bernstein I.D. (2005) Dose-dependent effects of the Notch ligand Delta1 on ex vivo differentiation and in vivo marrow repopulating ability of cord blood cells. *Blood*, **106**, 2693-2699.
- Detmer K. & Walker A.N. (2002) Bone morphogenetic proteins act synergistically with haematopoietic cytokines in the differentiation of haematopoietic progenitors. *Cytokine*, **17**, 36-42.
- Devine S.M., Bartholomew A.M., Mahmud N., Nelson M., Patil S., Hardy W., Sturgeon C., Hewett T., Chung T., Stock W., Sher D., Weissman S., Ferrer K., Mosca J., Deans R., Moseley A., & Hoffman R. (2001) Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp.Hematol.*, **29**, 244-255.
- Devine S.M., Cobbs C., Jennings M., Bartholomew A., & Hoffman R. (2003) Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*, **101**, 2999-3001.
- Dexter T.M., Moore M.A., & Sheridan A.P. (1977) Maintenance of hemopoietic stem cells and production of differentiated progeny in allogeneic and semiallogeneic bone marrow chimeras in vitro. *J.Exp.Med.*, **145**, 1612-1616.
- Dexter T.M. & Spooner E. (1987) Growth and differentiation in the hemopoietic system. *Annu.Rev.Cell Biol.*, **3**, 423-441.
- Djouad F., Charbonnier L.M., Bouffi C., Louis-Plence P., Bony C., Apparailly F., Cantos C., Jorgensen C., & Noel D. (2007) Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells*, **25**, 2025-2032.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., & Horwitz E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.*, **8**, 315-317.
- Duncan A.W., Rattis F.M., & DiMascio L.N. (2005) Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol*, **6**, 314-322.
- Eaves C.J. (1993) Peripheral blood stem cells reach new heights. *Blood*, **82**, 1957-1959.
- Erices A., Conget P., Rojas C., & Minguell J.J. (2002) Gp130 activation by soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 enhances osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp.Cell Res.*, **280**, 24-32.

Bibliographie

- Etheridge S.L., Spencer G.J., Heath D.J., & Genever P.G. (2004) Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, **22**, 849-860.
- Fassina G., Ferrari N., Brigati C., Benelli R., Santi L., Noonan D.M., & Albini A. (2000) Tissue inhibitors of metalloproteases: regulation and biological activities. *Clin.Exp.Metastasis*, **18**, 111-120.
- Fluckiger A.C., Sanz E., Garcia-Lloret M., Su T., Hao Q.L., Kato R., Quan S., de la Hera A., Crooks G.M., Witte O.N., & Rawlings D.J. (1998) In vitro reconstitution of human B-cell ontogeny: from CD34(+) multipotent progenitors to Ig-secreting cells. *Blood*, **92**, 4509-4520.
- Francois S., Bensidhoum M., Mouiseddine M., Mazurier C., Allenet B., Semont A., Frick J., Sache A., Bouchet S., Thierry D., Gourmelon P., Gorin N.C., & Chapel A. (2006) Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells*, **24**, 1020-1029.
- Friedenstein A.J., Petrakova K.V., Kurolesova A.I., & Frolova G.P. (1968) Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, **6**, 230-247.
- Fuchs O., Simakova O., Klener P., Cmejlova J., Zivny J., Zavadil J., & Stopka T. (2002) Inhibition of Smad5 in human hematopoietic progenitors blocks erythroid differentiation induced by BMP4. *Blood Cells Mol.Dis.*, **28**, 221-233.
- Fujisaki T., Berger M.G., Rose-John S., & Eaves C.J. (1999) Rapid differentiation of a rare subset of adult human lin(-)CD34(-)CD38(-) cells stimulated by multiple growth factors in vitro. *Blood*, **94**, 1926-1932.
- Gan O.I., Murdoch B., Larochelle A., & Dick J.E. (1997) Differential maintenance of primitive human SCID-repopulating cells, clonogenic progenitors, and long-term culture-initiating cells after incubation on human bone marrow stromal cells. *Blood*, **90**, 641-650.
- Gang E.J., Bosnakovski D., Figueiredo C.A., Visser J.W., & Perlingeiro R.C. (2007) SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood*, **109**, 1743-1751.
- Gao J., Dennis J.E., Muzic R.F., Lundberg M., & Caplan A.I. (2001) The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues.Organs*, **169**, 12-20.
- Gering M. & Patient R. (2005) Hedgehog signaling is required for adult blood stem cell formation in zebrafish embryos. *Dev.Cell*, **8**, 389-400.
- Gluckman E. (2000) Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Exp.Hematol.*, **28**, 1197-1205.
- Gluckman E., Rocha V., Boyer-Chammard A., Locatelli F., Arcese W., Pasquini R., Ortega J., Souillet G., Ferreira E., Laporte J.P., Fernandez M., & Chastang C. (1997) 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.*, **337**, 373-381.
- Goldsby R., Kindt T., & Osborne B. (2004) Immunologie. 4^e édition, Dunod, Paris, p28.
- Gomez D.E., Alonso D.F., Yoshiji H., & Thorgeirsson U.P. (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur.J.Cell Biol.*, **74**, 111-122.

Bibliographie

- Goncalves R., da Silva C.L., Cabral J.M., Zanjani E.D., & Almeida-Porada G. (2006) 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.*, **34**, 1353-1359.
- Grassinger J., Simon M., Mueller G., Drewel D., Andreesen R., & Hennemann B. (2007) Bone morphogenetic protein (BMP)-7 but not BMP-2 and BMP-4 improves maintenance of primitive peripheral blood-derived hematopoietic progenitor cells (HPC) cultured in serum-free medium supplemented with early acting cytokines. *Cytokine*, **40**, 165-171.
- Gregory C.A., Gunn W.G., Reyes E., Smolarz A.J., Munoz J., Spees J.L., & Prockop D.J. (2005a) How Wnt signaling affects bone repair by mesenchymal stem cells from the bone marrow. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **1049**, 97-106.
- Gregory C.A., Perry A.S., Reyes E., Conley A., Gunn W.G., & Prockop D.J. (2005b) Dkk-1-derived synthetic peptides and lithium chloride for the control and recovery of adult stem cells from bone marrow. *J.Biol.Chem.*, **280**, 2309-2323.
- Gregory C.A., Singh H., Perry A.S., & Prockop D.J. (2003) The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow. *J.Biol.Chem.*, **278**, 28067-28078.
- Gronthos S., Zannettino A.C., Hay S.J., Shi S., Graves S.E., Kortessidis A., & Simmons P.J. (2003) Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J.Cell Sci.*, **116**, 1827-1835.
- Guedez L., Martinez A., Zhao S., Vivero A., Pittaluga S., Stetler-Stevenson M., Raffeld M., & Stetler-Stevenson W.G. (2005) Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) promotes plasmablastic differentiation of a Burkitt lymphoma cell line: implications in the pathogenesis of plasmacytic/plasmablastic tumors. *Blood*, **105**, 1660-1668.
- Hammerschmidt M., Brook A., & McMahon A.P. (1997) The world according to hedgehog. *Trends Genet.*, **13**, 14-21.
- Hao Q.L., Shah A.J., Thiemann F.T., Smogorzewska E.M., & Crooks G.M. (1995) A functional comparison of CD34 + CD38- cells in cord blood and bone marrow. *Blood*, **86**, 3745-3753.
- Hauser S.P., Kajkenova O., & Lipschitz D.A. (1997) The pivotal role of interleukin 6 in formation and function of hematopoietically active murine long-term bone marrow cultures. *Stem Cells*, **15**, 125-132.
- Hayakawa T., Yamashita K., Kishi J., & Harigaya K. (1990) Tissue inhibitor of metalloproteinases from human bone marrow stromal cell line KM 102 has erythroid-potentiating activity, suggesting its possibly bifunctional role in the hematopoietic microenvironment. *FEBS Lett.*, **268**, 125-128.
- Hayakawa T., Yamashita K., Tanzawa K., Uchijima E., & Iwata K. (1992) Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett.*, **298**, 29-32.
- He T.C., Sparks A.B., Rago C., Hermeking H., Zawel L., da Costa L.T., Morin P.J., Vogelstein B., & Kinzler K.W. (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, **281**, 1509-1512.
- Houwei Li, Bo Yu, Yan Zhang, Zhenwei Pan, Wei Xu, & Hulun Li. (2006) Jagged1 protein enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **341**, 320-325.

Bibliographie

- Hu Y., Liao L., Wang Q., Ma L., Ma G., Jiang X., & Zhao R.C. (2003) Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. *J.Lab Clin.Med.*, **141**, 342-349.
- Hudak S., Thompson-Snipes L., Rocco C., Jackson J., Pearce M., & Rennick D. (1992) Anti-IL-6 antibodies suppress myeloid cell production and the generation of CFU-c in long-term bone marrow cultures. *Exp.Hematol.*, **20**, 412-417.
- Hwang J.H., Shim S.S., Seok O.S., Lee H.Y., Woo S.K., Kim B.H., Song H.R., Lee J.K., & Park Y.K. (2009) Comparison of cytokine expression in mesenchymal stem cells from human placenta, cord blood, and bone marrow. *J.Korean Med.Sci.*, **24**, 547-554.
- Ichii M., Oritani K., Yokota T., Nishida M., Takahashi I., Shirogane T., Ezoe S., Saitoh N., Tanigawa R., Kincade P.W., & Kanakura Y. (2008) Regulation of human B lymphopoiesis by the transforming growth factor-beta superfamily in a newly established coculture system using human mesenchymal stem cells as a supportive microenvironment. *Exp. Hematol.*, **36**, 587-597.
- Ikebuchi K., Wong G.G., Clark S.C., Ihle J.N., Hirai Y., & Ogawa M. (1987) Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **84**, 9035-9039.
- Ishibashi T., Kimura H., Uchida T., Kariyone S., Friese P., & Burstein S.A. (1989) Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **86**, 5953-5957.
- Jacobsen K., Kravitz J., Kincade P.W., & Osmond D.G. (1996) Adhesion receptors on bone marrow stromal cells: in vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and gamma-irradiated mice. *Blood*, **87**, 73-82.
- Jaleco A.C., Neves H., Hooijberg E., Gameiro P., Clode N., Haurly M., Henrique D., & Parreira L. (2001) Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation. *J.Exp.Med.*, **194**, 991-1001.
- Jang Y.K., Jung D.H., Jung M.H., Kim D.H., Yoo K.H., Sung K.W., Koo H.H., Oh W., Yang Y.S., & Yang S.E. (2006) Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Ann.Hematol.*, **85**, 212-225.
- Jarocho D., Lukasiewicz E., & Majka M. (2008) Advantage of mesenchymal stem cells (MSC) expansion directly from purified bone marrow CD105+ and CD271+ cells. *Folia Histochem.Cytobiol.*, **46**, 307-314.
- Jiang W.H., Ma A.Q., Zhang Y.M., Han K., Liu Y., Zhang Z.T., Wang T.Z., Huang X., & Zheng X.P. (2005) Migration of intravenously grafted mesenchymal stem cells to injured heart in rats. *Sheng Li Xue.Bao.*, **57**, 566-572.
- Jones E.A., English A., Henshaw K., Kinsey S.E., Markham A.F., Emery P., & McGonagle D. (2004) Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum.*, **50**, 817-827.
- Jones E.A., English A., Kinsey S.E., Straszynski L., Emery P., Ponchel F., & McGonagle D. (2006) Optimization of a flow cytometry-based protocol for detection and phenotypic characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Cytometry B Clin.Cytom.*, **70**, 391-399.

Bibliographie

- Jordan C.T., Yamasaki G., & Minamoto D. (1996) High-resolution cell cycle analysis of defined phenotypic subsets within primitive human hematopoietic cell populations. *Exp.Hematol.*, **24**, 1347-1355.
- Kadereit S., Deeds L.S., Haynesworth S.E., Koc O.N., Kozik M.M., Szekely E., Daum-Woods K., Goetchius G.W., Fu P., Welniak L.A., Murphy W.J., & Laughlin M.J. (2002) 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*, **20**, 573-582.
- Kanai M., Hirayama F., Yamaguchi M., Ohkawara J., Sato N., Fukazawa K., Yamashita K., Kuwabara M., Ikeda H., & Ikebuchi K. (2000) Stromal cell-dependent ex vivo expansion of human cord blood progenitors and augmentation of transplantable stem cell activity. *Bone Marrow Transplant.*, **26**, 837-844.
- Karanu F.N., Murdoch B., Gallacher L., Wu D.M., Koremoto M., Sakano S., & Bhatia M. (2000) The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J.Exp.Med.*, **192**, 1365-1372.
- Karanu F.N., Yuefei L., Gallacher L., Sakano S., & Bhatia M. (2003) Differential response of primitive human. *Leukemia*, **17**, 1366-1374.
- Kawada H., Ando K., Tsuji T., Shimakura Y., Nakamura Y., Chargui J., Hagihara M., Itagaki H., Shimizu T., Inokuchi S., Kato S., & Hotta T. (1999) Rapid ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitors using a novel culture system. *Exp.Hematol.*, **27**, 904-915.
- Kawano Y., Kobune M., Yamaguchi M., Nakamura K., Ito Y., Sasaki K., Takahashi S., Nakamura T., Chiba H., Sato T., Matsunaga T., Azuma H., Ikebuchi K., Ikeda H., Kato J., Niitsu Y., & Hamada H. (2003) Ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitor cells using a coculture system with human telomerase catalytic subunit (hTERT)-transfected human stromal cells. *Blood*, **101**, 532-540.
- Kern S., Eichler H., Stoeve J., Kluter H., & Bieback K. (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, **24**, 1294-1301.
- Kerre T.C., De Smet G., De Smedt M., Zippelius A., Pittet M.J., Langerak A.W., De Bosscher J., Offner F., Vandekerckhove B., & Plum J. (2002) Adapted NOD/SCID model supports development of phenotypically and functionally mature T cells from human umbilical cord blood CD34(+) cells. *Blood*, **99**, 1620-1626.
- Kim D.H., Yoo K.H., Yim Y.S., Choi J., Lee S.H., Jung H.L., Sung K.W., Yang S.E., Oh W.I., Yang Y.S., Kim S.H., Choi S.Y., & Koo H.H. (2006) Cotransplanted bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSC) enhanced engraftment of hematopoietic stem cells in a MSC-dose dependent manner in NOD/SCID mice. *J.Korean Med.Sci.*, **21**, 1000-1004.
- Kim J., Kang J.W., Park J.H., Choi Y., Choi K.S., Park K.D., Baek D.H., Seong S.K., Min H.K., & Kim H.S. (2009) Biological characterization of long-term cultured human mesenchymal stem cells. *Arch Pharm Res*, **32**, 117-126.
- Kishimoto T. (1989) The biology of interleukin-6. *Blood*, **74**, 1-10.
- Kobune M., Ito Y., Kawano Y., Sasaki K., Uchida H., Nakamura K., Dehari H., Chiba H., Takimoto R., Matsunaga T., Terui T., Kato J., Niitsu Y., & Hamada H. (2004) Indian hedgehog gene transfer augments hematopoietic support of human stromal cells including NOD/SCID-beta2m-/- repopulating cells. *Blood*, **104**, 1002-1009.

Bibliographie

- Kobune M., Kato J., Kawano Y., Sasaki K., Uchida H., Takada K., Takahashi S., Takimoto R., & Niitsu Y. (2008a) Adenoviral vector-mediated transfer of the Indian hedgehog gene modulates lymphomyelopoiesis in vivo. *Stem Cells*, **26**, 534-542.
- Kobune M., Kawano Y., Takahashi S., Takada K., Murase K., Iyama S., Sato T., Takimoto R., Niitsu Y., & Kato J. (2008b) Interaction with human stromal cells enhances CXCR4 expression and engraftment of cord blood Lin(-)CD34(-) cells. *Exp.Hematol.*, **36**, 1121-1131.
- Koc O.N., Gerson S.L., Cooper B.W., Dyhouse S.M., Haynesworth S.E., Caplan A.I., & Lazarus H.M. (2000) 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.*, **18**, 307-316.
- Koch U., Wilson A., Cobas M., Kemler R., Macdonald H.R., & Radtke F. (2008) Simultaneous loss of beta- and gamma-catenin does not perturb hematopoiesis or lymphopoiesis. *Blood*, **111**, 160-164.
- Kogler G., Sensken S., Airey J.A., Trapp T., Muschen M., Feldhahn N., Liedtke S., Sorg R.V., Fischer J., Rosenbaum C., Greschat S., Knipper A., Bender J., Degistirici O., Gao J., Caplan A.I., Colletti E.J., Almeida-Porada G., Muller H.W., Zanjani E., & Wernet P. (2004) A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J.Exp.Med.*, **200**, 123-135.
- Kollet O., Peled A., Byk T., Ben-Hur H., Greiner D., Shultz L., & Lapidot T. (2000) beta2 microglobulin-deficient (B2m(null)) NOD/SCID mice are excellent recipients for studying human stem cell function. *Blood*, **95**, 3102-3105.
- Kopf M., Baumann H., Freer G., Freudenberg M., Lamers M., Kishimoto T., Zinkernagel R., Bluethmann H., & Kohler G. (1994) Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature*, **368**, 339-342.
- Kopf M., Ramsay A., Brombacher F., Baumann H., Freer G., Galanos C., Gutierrez-Ramos J.C., & Kohler G. (1995) Pleiotropic defects of IL-6-deficient mice including early hematopoiesis, T and B cell function, and acute phase responses. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **762**, 308-318.
- Korinek V., Barker N., Morin P.J., van Wichen D., de Weger R., Kinzler K.W., Vogelstein B., & Clevers H. (1997) Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/colon carcinoma. *Science*, **275**, 1784-1787.
- Kyriakou C., Rabin N., Pizzey A., Nathwani A., & Yong K. (2008) Factors that influence short-term homing of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a xenogeneic animal model. *Haematologica*, **93**, 1457-1465.
- Lambert E., Dasse E., Haye B., & Petitfrere E. (2004) TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev.Oncol.Hematol.*, **49**, 187-198.
- Lapidot T., Pflumio F., Doedens M., Murdoch B., Williams D.E., & Dick J.E. (1992) Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science*, **255**, 1137-1141.
- Larochelle A., Vormoor J., Hanenberg H., Wang J.C., Bhatia M., Lapidot T., Moritz T., Murdoch B., Xiao X.L., Kato I., Williams D.A., & Dick J.E. (1996) Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat.Med.*, **2**, 1329-1337.

Bibliographie

- Laterveer L., Lindley I.J., Hamilton M.S., Willemze R., & Fibbe W.E. (1995) Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability. *Blood*, **85**, 2269-2275.
- Laterveer L., Zijlmans J.M., Lindley I.J., Hamilton M.S., Willemze R., & Fibbe W.E. (1996) Improved survival of lethally irradiated recipient mice transplanted with circulating progenitor cells mobilized by IL-8 after pretreatment with stem cell factor. *Exp.Hematol.*, **24**, 1387-1393.
- Lazzari L., Lucchi S., Rebulli P., Porretti L., Puglisi G., Lecchi L., & Sirchia G. (2001) Long-term expansion and maintenance of cord blood haematopoietic stem cells using thrombopoietin, Flt3-ligand, interleukin (IL)-6 and IL-11 in a serum-free and stroma-free culture system. *Br.J.Haematol.*, **112**, 397-404.
- Le Blanc K., Frassoni F., Ball L., Locatelli F., Roelofs H., Lewis I., Lanino E., Sundberg B., Bernardo M.E., Remberger M., Dini G., Egeler R.M., Bacigalupo A., Fibbe W., & Ringden O. (2008) Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*, **371**, 1579-1586.
- Lee O.K., Kuo T.K., Chen W.M., Lee K.D., Hsieh S.L., & Chen T.H. (2004) Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, **103**, 1669-1675.
- Lee S.K., Kim Y., Kim S.S., Lee J.H., Cho K., Lee S.S., Lee Z.W., Kwon K.H., Kim Y.H., Suh-Kim H., Yoo J.S., & Park Y.M. (2009) Differential expression of cell surface proteins in human bone marrow mesenchymal stem cells cultured with or without basic fibroblast growth factor containing medium. *Proteomics*. Epub ahead of print.
- Lee S.T., Maeng H., Chwae Y.J., Oh D.J., Kim Y.M., & Yang W.I. (2008) Effect of mesenchymal stem cell transplantation on the engraftment of human hematopoietic stem cells and leukemic cells in mice model. *Int.J.Hematol.*, **87**, 327-337.
- Li L., Milner L.A., Deng Y., Iwata M., Banta A., Graf L., Marcovina S., Friedman C., Trask B.J., Hood L., & Torok-Storb B. (1998) The human homolog of rat Jagged1 expressed by marrow stroma inhibits differentiation of 32D cells through interaction with Notch1. *Immunity.*, **8**, 43-55.
- Li A., Varney M.L., Valasek J., Godfrey M., Dave B.J., & Singh R.K. (2005) Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP-2 production and angiogenesis. *Angiogenesis.*, **8**, 63-71.
- Li N., Feugier P., Serrurier B., Latger-Cannard V., Lesesve J.F., Stoltz J.F., & 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.
- Lindsell C.E., Shawber C.J., Boulter J., & Weinmaster G. (1995) Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. *Cell*, **80**, 909-917.
- Liu Z., Tang Y., Qiu T., Cao X., & Clemens T.L. (2006) A dishevelled-1/Smad1 interaction couples WNT and bone morphogenetic protein signaling pathways in uncommitted bone marrow stromal cells. *J.Biol.Chem.*, **281**, 17156-17163.
- Luo X.M., Maarschalk E., O'Connell R.M., Wang P., Yang L., & Baltimore D. (2009) Engineering human hematopoietic stem/progenitor cells to produce a broadly neutralizing anti-HIV antibody after in vitro maturation to human B lymphocytes. *Blood*, **113**, 1422-1431.
- Maguer-Satta V., Bartholin L., Jeanpierre S., Ffrench M., Martel S., Magaud J.P., & Rimokh R. (2003) Regulation of human erythropoiesis by activin A, BMP2, and BMP4, members of the TGFbeta family. *Exp.Cell Res.*, **282**, 110-120.

Bibliographie

- Majumdar M.K., Thiede M.A., Mosca J.D., Moorman M., & Gerson S.L. (1998) Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J.Cell Physiol*, **176**, 57-66.
- Malhotra S. & Kincade P.W. (2009) Canonical Wnt pathway signaling suppresses VCAM-1 expression by marrow stromal and hematopoietic cells. *Exp.Hematol.*, **37**, 19-30.
- Martinez C., Hofmann T.J., Marino R., Dominici M., & Horwitz E.M. (2007) Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. *Blood*, **109**, 4245-4248.
- McKenzie J.L., Gan O.I., Doedens M., & Dick J.E. (2005) Human short-term repopulating stem cells are efficiently detected following intrafemoral transplantation into NOD/SCID recipients depleted of CD122+ cells. *Blood*, **106**, 1259-1261.
- McNiece I., Harrington J., Turney J., Kellner J., & Shpall E.J. (2004) Ex vivo expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells. *Cytotherapy.*, **6**, 311-317.
- Milner L.A. & Bigas A. (1999) Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood*, **93**, 2431-2448.
- Milner L.A., Kopan R., Martin D.I., & Bernstein I.D. (1994) A human homologue of the Drosophila developmental gene, Notch, is expressed in CD34+ hematopoietic precursors. *Blood*, **83**, 2057-2062.
- Minguell J.J., Erices A., & Conget P. (2001) Mesenchymal stem cells. *Exp.Biol.Med.*, **226**, 507-520.
- Miyake K., Medina K., Ishihara K., Kimoto M., Auerbach R., & Kincade P.W. (1991a) A VCAM-like adhesion molecule on murine bone marrow stromal cells mediates binding of lymphocyte precursors in culture. *J.Cell Biol.*, **114**, 557-565.
- Miyake K., Weissman I.L., Greenberger J.S., & Kincade P.W. (1991b) Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis. *J.Exp.Med.*, **173**, 599-607.
- Murdoch B., Chadwick K., Martin M., Shojaei F., Shah K.V., Gallacher L., Moon R.T., & Bhatia M. (2003) Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **100**, 3422-3427.
- Nasef A., Zhang Y.Z., Mazurier C., Bouchet S., Bensidhoum M., Francois S., Gorin N.C., Lopez M., Thierry D., Fouillard L., & Chapel A. (2009) Selected Stro-1-enriched bone marrow stromal cells display a major suppressive effect on lymphocyte proliferation. *Int.J.Lab Hematol.*, **31**, 9-19.
- Nakahara M., Takagi M., Hattori T., Wakitani S., & Yoshida T. (2005) Effect of Subcultivation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem on their Capacities for Chondrogenesis, Supporting Hematopoiesis, and Telomea Length. *Cytotechnology*, **47**, 19-27.
- Ning H., Yang F., Jiang M., Hu L., Feng K., Zhang J., Yu Z., Li B., Xu C., Li Y., Wang J., Hu J., Lou X., & Chen H. (2008) The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia*, **22**, 593-599.
- Noort W.A., Krusselbrink A.B., in't Anker P.S., Kruger M., van Bezooijen R.L., de Paus R.A., Heemskerk M.H., Lowik C.W., Falkenburg J.H., Willemze R., & Fibbe W.E. (2002) Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp.Hematol.*, **30**, 870-878.

Bibliographie

- Ohishi K., Varnum-Finney B., & Bernstein I.D. (2002) Delta-1 enhances marrow and thymus repopulating ability of human CD34(+)CD38(-) cord blood cells. *J.Clin.Invest*, **110**, 1165-1174.
- Ohishi K., Varnum-Finney B., Serda R.E., Anasetti C., & Bernstein I.D. (2001) The Notch ligand, Delta-1, inhibits the differentiation of monocytes into macrophages but permits their differentiation into dendritic cells. *Blood*, **98**, 1402-1407.
- Okada S., Nakauchi H., Nagayoshi K., Nakamura M., Miura Y., & Suda T. (1992) Synergistic effect of IL-3 and IL-6 on highly enriched murine hemopoietic progenitors. *Exp.Hematol.*, **20**, 546-551.
- Oyagi S., Hirose M., Kojima M., Okuyama M., Kawase M., Nakamura T., Ohgushi H., & Yagi K. (2006) Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl₄-injured rats. *J.Hepatol.*, **44**, 742-748.
- Papayannopoulou T., Craddock C., Nakamoto B., Priestley G.V., & Wolf N.S. (1995) The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **92**, 9647-9651.
- Park S.K., Won J.H., Kim H.J., Bae S.B., Kim C.K., Lee K.T., Lee N.S., Lee Y.K., Jeong D.C., Chung N.G., Kim H.S., Hong D.S., & Park H.S. (2007) Co-transplantation of human mesenchymal stem cells promotes human CD34+ cells engraftment in a dose-dependent fashion in NOD/SCID mice. *J.Korean Med.Sci.*, **22**, 412-419.
- Patchen M.L., MacVittie T.J., Williams J.L., Schwartz G.N., & Souza L.M. (1991) Administration of interleukin-6 stimulates multilineage hematopoiesis and accelerates recovery from radiation-induced hematopoietic depression. *Blood*, **77**, 472-480.
- Peled A., Kollet O., Ponomaryov T., Petit I., Franitza S., Grabovsky V., Slav M.M., Nagler A., Lider O., Alon R., Zipori D., & Lapidot T. (2000) The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood*, **95**, 3289-3296.
- Peled A., Petit I., Kollet O., Magid M., Ponomaryov T., Byk T., Nagler A., Ben-Hur H., Many A., Shultz L., Lider O., Alon R., Zipori D., & Lapidot T. (1999) Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science*, **283**, 845-848.
- Petzer A.L., Zandstra P.W., Piret J.M., & Eaves C.J. (1996) Differential cytokine effects on primitive (CD34+CD38-) human hematopoietic cells: novel responses to Flt3-ligand and thrombopoietin. *J.Exp.Med.*, **183**, 2551-2558.
- Piacibello W., Sanavio F., Severino A., Dane A., Gammaitoni L., Fagioli F., Perissinotto E., Cavalloni G., Kollet O., Lapidot T., & Aglietta M. (1999) Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34(+) cord blood cells after ex vivo expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. *Blood*, **93**, 3736-3749.
- Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., & Marshak D.R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, **284**, 143-147.
- Popp F.C., Slowik P., Eggenhofer E., Renner P., Lang S.A., Stoeltzing O., Geissler E.K., Piso P., Schlitt H.J., & Dahlke M.H. (2007) No contribution of multipotent mesenchymal stromal cells to liver regeneration in a rat model of prolonged hepatic injury. *Stem Cells*, **25**, 639-645.

Bibliographie

- Pruijt J.F., Fibbe W.E., Laterveer L., Pieters R.A., Lindley I.J., Paemen L., Masure S., Willemze R., & Opdenakker G. (1999) Prevention of interleukin-8-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by inhibitory antibodies against the metalloproteinase gelatinase B (MMP-9). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96**, 10863-10868.
- Pruijt J.F., Verzaal P., van Os R., de Kruijf E.J., van Schie M.L., Mantovani A., Vecchi A., Lindley I.J., Willemze R., Starckx S., Opdenakker G., & Fibbe W.E. (2002) Neutrophils are indispensable for hematopoietic stem cell mobilization induced by interleukin-8 in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **99**, 6228-6233.
- Pui J.C., Allman D., Xu L., DeRocco S., Karnell F.G., Bakkour S., Lee J.Y., Kadesch T., Hardy R.R., Aster J.C., & Pear W.S. (1999) Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity*, **11**, 299-308.
- Reya T., Duncan A.W., Ailles L., Domen J., Scherer D.C., Willert K., Hintz L., Nusse R., & Weissman I.L. (2003) A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, **423**, 409-414.
- Robinson S.N., Ng J., Niu T., Yang H., McMannis J.D., Karandish S., Kaur I., Fu P., Del Angel M., Messinger R., Flagge F., de Lima M., Decker W., Xing D., Champlin R., & Shpall E.J. (2006) Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant.*, **37**, 359-366.
- Robinson S.N., Pisarev V.M., Chavez J.M., Singh R.K., & Talmadge J.E. (2003) Use of matrix metalloproteinase (MMP)-9 knockout mice demonstrates that MMP-9 activity is not absolutely required for G-CSF or Flt-3 ligand-induced hematopoietic progenitor cell mobilization or engraftment. *Stem Cells*, **21**, 417-427.
- Romanov Y.A., Svintsitskaya V.A., & Smirnov V.N. (2003) Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*, **21**, 105-110.
- Rubinstein P., Rosenfield R.E., Adamson J.W., & Stevens C.E. (1993) Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood*, **81**, 1679-1690.
- Salingcarnboriboon R., Yoshitake H., Tsuji K., Obinata M., Amagasa T., Nifuji A., & Noda M. (2003) Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp.Cell Res.*, **287**, 289-300.
- Schofield R. (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, **4**, 7-25.
- Simmons P.J., Masinovsky B., Longenecker B.M., Berenson R., Torok-Storb B., & Gallatin W.M. (1992) Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. *Blood*, **80**, 388-395.
- Simmons P.J. & Torok-Storb B. (1991) Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*, **78**, 55-62.
- Son B.R., Marquez-Curtis L.A., Kucia M., Wysoczynski M., Turner A.R., Ratajczak J., Ratajczak M.Z., & Janowska-Wieczorek A. (2006) Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells*, **24**, 1254-1264.

Bibliographie

- Sorrentino A., Ferracin M., Castelli G., Biffoni M., Tomaselli G., Baiocchi M., Fatica A., Negrini M., Peschle C., & Valtieri M. (2008) Isolation and characterization of CD146(+) multipotent mesenchymal stromal cells. *Exp.Hematol.*, **36**, 1035-1046.
- Srour E.F., Brandt J.E., Briddell R.A., Grigsby S., Leemhuis T., & Hoffman R. (1993) Long-term generation and expansion of human primitive hematopoietic progenitor cells in vitro. *Blood*, **81**, 661-669.
- Storb R. (2003) Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation--yesterday, today, and tomorrow. *Exp.Hematol.*, **31**, 1-10.
- Sutherland H.J., Eaves C.J., Eaves A.C., Dragowska W., & Lansdorp P.M. (1989) Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood*, **74**, 1563-1570.
- Szilvassy S.J., Meyerrose T.E., & Grimes B. (2000) Effects of cell cycle activation on the short-term engraftment properties of ex vivo expanded murine hematopoietic cells. *Blood*, **95**, 2829-2837.
- Terstappen L.W., Huang S., Safford M., Lansdorp P.M., & Loken M.R. (1991) Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood*, **77**, 1218-1227.
- Ueda T., Tsuji K., Yoshino H., Ebihara Y., Yagasaki H., Hisakawa H., Mitsui T., Manabe A., Tanaka R., Kobayashi K., Ito M., Yasukawa K., & Nakahata T. (2000) Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J.Clin.Invest*, **105**, 1013-1021.
- Uhmann A., Dittmann K., Nitzki F., Dressel R., Koleva M., Frommhold A., Zibat A., Binder C., Adham I., Nitsche M., Heller T., Armstrong V., Schulz-Schaeffer W., Wienands J., & Hahn H. (2007) The Hedgehog receptor Patched controls lymphoid lineage commitment. *Blood*, **110**, 1814-1823.
- Van Den Berg D.J., Sharma A.K., Bruno E., & Hoffman R. (1998) Role of members of the Wnt gene family in human hematopoiesis. *Blood*, **92**, 3189-3202.
- Van Hennik P.B., de Koning A.E., & Ploemacher R.E. (1999) Seeding efficiency of primitive human hematopoietic cells in nonobese diabetic/severe combined immune deficiency mice: implications for stem cell frequency assessment. *Blood*, **94**, 3055-3061.
- Van Snick J. (1990) Interleukin-6: an overview. *Annu.Rev.Immunol.*, **8**, 253-278.
- Veeraraghavalu K., Pett M., Kumar R.V., Nair P., Rangarajan A., Stanley M.A., & Krishna S. (2004) Papillomavirus-mediated neoplastic progression is associated with reciprocal changes in JAGGED1 and manic fringe expression linked to notch activation. *J.Virol.*, **78**, 8687-8700.
- Wagner W., Feldmann R.E., Jr., Seckinger A., Maurer M.H., Wein F., Blake J., Krause U., Kalenka A., Burgers H.F., Saffrich R., Wuchter P., Kuschinsky W., & Ho A.D. (2006) The heterogeneity of human mesenchymal stem cell preparations--evidence from simultaneous analysis of proteomes and transcriptomes. *Exp.Hematol.*, **34**, 536-548.
- Wagner W., Roderburg C., Wein F., Diehlmann A., Frankhauser M., Schubert R., Eckstein V., & Ho A.D. (2007a) Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem Cells*, **25**, 2638-2647.

Bibliographie

- Wagner W., Wein F., Roderburg C., Saffrich R., Faber A., Krause U., Schubert M., Benes V., Eckstein V., Maul H., & Ho A.D. (2007b) Adhesion of hematopoietic progenitor cells to human mesenchymal stem cells as a model for cell-cell interaction. *Exp.Hematol.*, **35**, 314-325.
- Walker L., Lynch M., Silverman S., Fraser J., Boulter J., Weinmaster G., & Gasson J.C. (1999) The Notch/Jagged pathway inhibits proliferation of human hematopoietic progenitors in vitro. *Stem Cells*, **17**, 162-171.
- Westbrook C.A., Gasson J.C., Gerber S.E., Selsted M.E., & Golde D.W. (1984) Purification and characterization of human T-lymphocyte-derived erythroid-potentiating activity. *J.Biol.Chem.*, **259**, 9992-9996.
- Wynn R.F., Hart C.A., Corradi-Perini C., O'Neill L., Evans C.A., Wraith J.E., Fairbairn L.J., & Bellantuono I. (2004) A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*, **104**, 2643-2645.
- Xie C.G., Wang J.F., Xiang Y., Jia B.B., Qiu L.Y., Wang L.J., Wang G.Z., & Huang G.P. (2005) Marrow mesenchymal stem cells transduced with TPO/FL genes as support for ex vivo expansion of hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Mol.Life Sci.*, **62**, 2495-2507.
- Yahata T., Ando K., Sato T., Miyatake H., Nakamura Y., Muguruma Y., Kato S., & Hotta T. (2003) A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. *Blood*, **101**, 2905-2913.
- Yamaguchi M., Hirayama F., Kanai M., Sato N., Fukazawa K., Yamashita K., Sawada K., Koike T., Kuwabara M., Ikeda H., & Ikebuchi K. (2001) 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.*, **29**, 174-182.
- Yamaguchi M., Hirayama F., Murahashi H., Azuma H., Sato N., Miyazaki H., Fukazawa K., Sawada K., Koike T., Kuwabara M., Ikeda H., & Ikebuchi K. (2002) 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.*, **4**, 109-118.
- Young H.E., Steele T.A., Bray R.A., Hudson J., Floyd J.A., Hawkins K., Thomas K., Austin T., Edwards C., Cuzzourt J., Duenzl M., Lucas P.A., & Black A.C. (2001) Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat.Rec.*, **264**, 51-62.
- Zandstra P.W., Conneally E., Petzer A.L., Piret J.M., & Eaves C.J. (1997) Cytokine manipulation of primitive human hematopoietic cell self-renewal. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **94**, 4698-4703.
- Zanjani E.D., Flake A.W., Almeida-Porada G., Tran N., & Papayannopoulou T. (1999) Homing of human cells in the fetal sheep model: modulation by antibodies activating or inhibiting very late activation antigen-4-dependent function. *Blood*, **94**, 2515-2522.
- Zhang C.C., Kaba M., Iizuka S., Huynh H., & Lodish H.F. (2008) Angiopoietin-like 5 and IGFBP2 stimulate ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells as assayed by NOD/SCID transplantation. *Blood*, **111**, 3415-3423.
- Zhang Y., Li C.D., Jiang X.X., Li H.L., Tang P.H., & Mao N. (2004) Comparison of mesenchymal stem cells from human placenta and bone marrow. *Chin Med.J.(Engl.)*, **117**, 882-887.

Abréviations

Abréviations

°C	Degré Celsius
µg	Microgramme
µl	Microlitre
µM	Micromolaire
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
APC	Allophycocyanine
APS	Ammonium peroxydisulfate
ARN	Acide ribonucléique
BCR	B Cell Receptor
BFU-E	Burst Forming Unit-Erythroid
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPR	Bone Morphogenetic Protein Receptor
CBA	Cytometric Bead Array
CBF-1	Core Binding Factor-1
CD	Cluster of Differentiation
CFC	Colony-Forming Cells
cfr	Confer
CFU	Colony-Forming Unit
CFU-E	Colony-Forming Unit-Erythroid
CFU-F	Colony-Forming Unit-Fibroblast
CFU-GM	Colony-Forming Unit-Granulocyte Macrophage
CFU-M	Colony-Forming Unit-Macrophage
CFU-Mix	Colony-Forming Unit-Mixed
cm ²	Centimètre carré
Cs	Césium
Ct	threshold Cycle
DHH	Desert Hedgehog

Abréviations

Dkk-1	Dickkopf-1
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EBF	Early B-cell Factor
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
Epo	Erythropoïétine
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FGF-1	Fibroblast Growth Factor-1
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FL	Flt-3 Ligand
Flt-3	Fetal Liver Tyrosine kinase-3
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GD2	Disialoganglioside 2
GM-CSF	Granulocyte Macrophage colony-stimulating factor
GSK3 β	Glycogène Synthase Kinase 3 β
GvHD	Graft versus Host Disease
Gy	Gray
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HH	Hedgehog
HLA	Human Leucocyte Antigen
HSC	Hematopoietic Stem Cells
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule
Ig	Immunoglobuline
IHH	Indian Hedgehog
IL	Interleukine
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
ISCT	International Society for Cellular Therapy
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LRP	Lipoprotein-Related Protein
LTC-IC	Long-Term Culture Initiating Cells

Abréviations

M	Molaire
mA	Milliampère
MACS	Magnetic Activated Cell Separation
MCFR	Mean Channel Fluorescence Ratio
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MetOH	Méthanol
mg	Milligramme
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
MMP	Matrix Metalloprotease
MSC	Mesenchymal Stem Cells
MSCA1	Mesenchymal Stem Cells Antigen 1
MSCGM	Mesenchymal Stem Cells Growth Medium
ng	Nanogramme
NIH	National Institutes of Health
NK	Natural Killer
NOD/SCID	Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immune Deficient
P	Passage
p/v	Poids/volume
PAGE	Polyacrylamid gel electrophoresis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
pg	Picogramme
PS	Péniciline Streptomycine
PTCH	Patched
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RAG-1	Recombination Activating Gene-1
RT	Reverse Transcription

Abréviations

SCF	Stem Cell Factor
SDF-1	Stromal Derived Factor-1
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SHH	Sonic Hedgehog
SMO	Smoothened
SRC	SCID Repopulating Cells
SSEA4	Stage-Specific Embryonic Antigens 4
TBS	Tris-buffered saline
TCF	T Cell Factor
Temed	Tetramethylene diamine
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase
TPO	Thrombopoïétine
Tris	Tri-(hydroxymethy)-aminomethane
U	Unité
v/v	Volume/volume
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VLA-4	Very Late Antigen-4
WT	Wild Type
β 2M	β 2-Microglobuline
MC	Membrane cellulaire
ME	Milieu extracellulaire
C	Cytoplasme
N	Noyau
μ m	micromètre
MC-MSc	Milieu conditionné par MSC
MN	Milieu non conditionné
KO	Knockout
IGF	Insulin-like growth factor

Annexes

Publications

- ✓ Briquet A., Dubois S., Bekaert S., Dolhet M., Beguin Y. and Gothot A. Prolonged ex vivo culture of human bone marrow mesenchymal stem cells influences their supportive activity toward NOD/SCID-repopulating cells and committed progenitor cells of B lymphoid and myeloid lineages. **Haematologica**. **2009**;
- ✓ Belaid-Choucair Z., Lepelletier Y., Poncin G., Thiry A., Humblet C., Maachi M., Beaulieu A., Schneider E., Briquet A. and al. Human Bone Marrow Adipocytes Block Granulopoiesis through Neuropilin-1-induced G-CSF Inhibition. **Stem Cells**. **2008**; 26(6):1556-64.
- ✓ Chatel G., Ganeff C., Boussif N., Delacroix L., Briquet A., Nolens G. and Winkler R. Hedgehog signalling pathway is inactive in colorectal cancer cell lines. **Int J Cancer**. **2007**; 121(12): 2622-7.

Abstracts de conférence : présentation orale

- ✓ Briquet A., Beguin Y., Gothot A. *The hematopoiesis-supporting activity of mesenchymal stem cells increases with the number of passages*. **36th Annual Scientific Meeting of the ISEH - society for Hematology and Stem Cells**. Hamburg, September 28-30, 2007. *Experimental Hematology, Volume 35, Number 9, Supplement 2, p 125, September 2007*.
- ✓ Briquet A., Demeuse J., Beguin Y., Gothot A. *Phenotypical and functional characterization of mesenchymal stem cells for their use in haematopoietic cell therapy*. **21st General Meeting of the Belgian Hematological Society**. Genval, January 27-28, 2006. *Abstract book, p 52*.

Abstracts de conférence : présentation d'un poster

- ✓ Briquet A., Dolhet M., Beguin Y., Gothot A. *Inhibition of the Jagged-1/Notch pathway increases the hematopoiesis-supportive activity of mesenchymal stem cells*. **ISEH 38th Annual Scientific Meeting**. Athènes, September 9-12, 2009.
- ✓ Briquet A., Dubois S., Spelmans C., Beguin Y., Gothot A. *Reconstitution of human B lymphopoiesis using coculture with human mesenchymal stem cells*. **Biomedica 2009**. Liège, April 1-2, 2009. *Abstract book, p 144*.
- ✓ Briquet A., Dubois S., Spelmans C., Beguin Y., Gothot A. *Reconstitution of human B lymphopoiesis using coculture with human mesenchymal stem cells*. **24th General Meeting of the Belgian Hematological Society**. Ostende, January 30-31, 2009. *Abstract book, p 130*.
- ✓ Briquet A., Dolhet M., Bekaert S., Beguin Y., Gothot A. *Changes in the hematopoiesis-supportive activity of mesenchymal stem cells with the number of passages*. **ISCT Europe First Regional Meeting**. Anvers, September 14-16, 2008. *Abstract book, p 129*.

- ✓ Briquet A., Dolhet M., Bekaert S., Beguin Y., Gothot A. *Changes in the hematopoiesis-supportive activity of mesenchymal stem cells with the number of passages.* **European Hematology Association Workshop on Mesenchymal Stem Cells.** Mandelieu, 30 June-2 July, 2008. *Abstract book, poster 5.*
- ✓ Briquet A., Dolhet M., Bekaert S., Beguin Y., Gothot A. *Changes in the hematopoiesis-supportive activity of mesenchymal stem cells with the number of passages.* **23rd General Meeting of the Belgian Hematological Society.** Ostende, January 25-26, 2008. *Abstract book, p 119.*
- ✓ Briquet A., Dolhet M., Demeuse J., Beguin Y., Gothot A. *Contribution of signalling pathways NOTCH, Wnt, Shh and BMP in mesenchymal stem cell prohaematopoietic activity.* **22nd General Meeting of the Belgian Hematological Society.** Genval, January 26-27, 2007. *Abstract book, p 77.*
- ✓ Briquet A., Dolhet M., Demeuse J., Beguin Y., Gothot A. *Phenotypical and functional characterization of mesenchymal stem cells for their use in haematopoietic cell therapy.* **European Hematology Association Workshop on Biology and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells.** Mandelieu, October 6-8, 2006. *Abstract book, p 5.*



Early Release Paper

Prolonged ex vivo culture of human bone marrow mesenchymal stem cells influences their supportive activity toward NOD/SCID-repopulating cells and committed progenitor cells of B lymphoid and myeloid lineages

by Alexandra Briquet, Sophie Dubois, Sandrine Bekaert, Marie Dolhet, Yves Beguin, and André Gothot

Haematologica 2009 [Epub ahead of print]

doi:10.3324/haematol.2009.008524

Publisher's Disclaimer.

E-publishing ahead of print is increasingly important for the rapid dissemination of science. Haematologica is, therefore, E-publishing PDF files of an early version of manuscripts that have completed a regular peer review and have been accepted for publication. E-publishing of this PDF file has been approved by the authors. This paper will now undergo editing, proof correction and final approval by the authors. Please note that during this production process changes may be made, and errors may be identified and corrected. The final version of the manuscript will appear both in the print and the online journal. All legal disclaimers that apply to the journal also pertain to this production process.

Haematologica (pISSN: 0390-6078, eISSN: 1592-8721, NLM ID: 0417435, www.haematologica.org) publishes peer-reviewed papers across all areas of experimental and clinical hematology. The journal is owned by the Ferrata Storti Foundation, a non-profit organization, and serves the scientific community with strict adherence to the principles of open access publishing (www.doaj.org). In addition, the journal makes every paper published immediately available in PubMed Central (PMC), the US National Institutes of Health (NIH) free digital archive of biomedical and life sciences journal literature. Haematologica is the official organ of the European Hematology Association (www.ehaweb.org).

Support *Haematologica* and Open Access Publishing by becoming a member of the European Hematology Association (EHA) and enjoying the benefits of this membership, which include free participation in the online CME program

Prolonged *ex vivo* culture of human bone marrow mesenchymal stem cells influences their supportive activity toward NOD/SCID-repopulating cells and committed progenitor cells of B lymphoid and myeloid lineages

Alexandra Briquet, Sophie Dubois, Sandrine Bekaert, Marie Dolhet, Yves Beguin, and André Gothot

GIGA-Research, Hematology Unit, University of Liège, Belgium

ABSTRACT

Background

Bone marrow (BM) mesenchymal stem cells (MSC) support proliferation and differentiation of hematopoietic progenitor cells (HPC) *in vitro*. Since they represent a rare subset of BM cells, MSC preparations for clinical purposes involves a preparative step of *ex vivo* multiplication. The aim of our study was to analyze the influence of culture duration on MSC supportive activity.

Design and Methods

MSC were expanded for up to 10 passages. MSC and CD34⁺ cells were seeded in cytokine-free co-cultures after which the phenotype, clonogenic capacity and *in vivo* repopulating activity of harvested hematopoietic cells were assessed.

Results

Early passage MSC supported HPC expansion and differentiation toward both B lymphoid and myeloid lineages. Late passage MSC did not support HPC and myeloid cell outgrowth but maintained B cell supportive ability. *In vitro* maintenance of NOD/SCID mouse repopulating cells cultured for one week in contact with MSC was effective until the fourth MSC passage and declined afterwards. CD34⁺ cells achieved higher levels of engraftment in NOD/SCID mice when co-injected with early passage MSC; however MSC expanded beyond 9 passages were ineffective in promoting CD34⁺ cell engraftment. Non-contact cultures indicated that MSC supportive activity involved diffusible factors. Among these, interleukin (IL)-6 and IL-8 contributed to the supportive activity of early passage MSC but not of late passage MSC. MSC phenotype as well as fat, bone and cartilage differentiation capacity did not change during MSC culture.

Conclusions

Extended MSC culture alters their supportive ability toward HPC without concomitant changes in phenotype and differentiation capacity.

Key words: human bone marrow mesenchymal stem cells, NOD/SCID-repopulating cells, progenitor cells of B lymphoid.

Citation: Briquet A, Dubois S, Bekaert S, Dolhet M, Beguin Y, and Gothot A. Prolonged *ex vivo* culture of human bone marrow mesenchymal stem cells influences their supportive activity toward NOD/SCID-repopulating cells and committed progenitor cells of B lymphoid and myeloid lineages. *Haematologica* 2009; doi:10.3324/haematol.2009.008524

©2010 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper.

Funding: this work was supported by grants from the Fonds National de la Recherche Scientifique (F.N.R.S., Belgium), the Centre Anticancéreux près l'Université de Liège and the Fédération Belge contre le Cancer (a non-profit organization). A.B. was supported by a Télévie fellowship. Y.B. is Research Director of the F.N.R.S.

Acknowledgments: flow cytometric data were acquired on the Cell Imaging and Flow Cytometry facility at GIGA-Research, University of Liège, under the supervision of Dr Sandra Ormenese.

Manuscript received on May 13, 2009; revised version arrived on June 24, 2009; manuscript accepted on July 7, 2009.

Correspondence: André Gothot, University of Liège, Laboratory Hematology CHU Sart Tilman B35 13, avenue de l'Hôpital B-4000 Liège, Belgium. E-mail: agothot@ulg.ac.be

This paper contains a Supplementary Appendix.

Introduction

Umbilical cord blood (CB) is a valid alternative to bone marrow or mobilized peripheral blood as a source of hematopoietic stem cells (HSC) for clinical transplantation. However the use of CB HSC in adult recipients is limited by the small numbers of cells present in a single unit. Numerous studies have attempted to expand HSC *ex vivo* in cell cultures supplemented with various combinations of hematopoietic cytokines. Although large numbers of committed progenitors can be obtained in a short period of 7 to 10 days, expansion of true long term repopulating cells has been difficult to achieve.

MSC are non-hematopoietic cells which can typically differentiate into adipocytic, osteocytic and chondrocytic tissues. They may also participate in the formation of hematopoietic stem cell niches.¹² Indeed, human MSC have been reported to secrete various hematopoietic growth factors and support hematopoiesis *in vitro*. In cytokine-supplemented cultures of CD34⁺ cells together with MSC, the expansion of nucleated cells as well as colony-forming cells is increased, compared to cultures without MSC.³ Differentiation of primitive progenitor cells occurs mainly along the myeloid lineage, but B lymphoid development has also been reported.⁴⁵ In such coculture systems, repopulating cells, assayed in xenogeneic recipients, are maintained or modestly expanded.⁶⁷ From such studies however, the relative contribution of the cytokines and the feeder cells in the overall supportive activity has not been clearly determined. We have previously reported that SDF-1 may participate in the cell cycle-promoting activity of MSC towards co-cultured CD34⁺ cells.⁸

Another aspect of the hematopoiesis-supporting activity of MSC lies in their ability to enhance BM homing of co-injected hematopoietic stem and progenitor cells.^{9,10} In this procedure, improved hematopoietic reconstitution can be achieved without *ex vivo* expansion of hematopoietic progenitors. In the NOD/SCID mouse model, BM homing is particularly enhanced when limiting numbers of CD34⁺ cells are infused.¹¹ The capacity of MSC to improve engraftment of CD34⁺ cells can be enhanced by stimulation with cytokines that increase CXCR4 expression by MSC.¹²

Since they represent a very small fraction of BM cells, preparations of MSC for clinical purposes involves a preliminary step of *ex vivo* multiplication. While considerable expansion of MSC is often required to obtain large cell doses starting from a BM aspirate, the optimal duration of MSC culture has not been defined. It has recently been reported that BM homing of MSC decreases with prolonged *ex vivo* culture.¹³ Whether other properties of MSC relevant to their hematopoiesis-supporting activity are modified *ex vivo* remains to be established.¹⁴

In the present study, we analyzed the influence of culture duration on the supportive activity of MSC. The phenotype and differentiation capacity of MSC preparations was assessed after up to 10 passages. In parallel, the ability of MSC to support differentiation and self-renewal of CB hematopoietic stem/progenitor cells was assayed in cytokine-free co-cultures. Enhancement of BM homing

was studied by co-transplantation of MSC and unmanipulated CB CD34⁺ cells in NOD/SCID mice.

Design and Methods

Cell isolation and preparation

Human BM samples were obtained from normal adult volunteers. Mononuclear cells were isolated by centrifugation over Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare, Diegem, Belgium) and washed in DPBS (Lonza, Verviers, Belgium). Cells were seeded at a density of 5×10^5 cells/cm² in mesenchymal stem cell growth medium (MSCGM; Lonza). MSCGM is a ready-to-use medium supplemented with 10 % serum. Cultures were maintained in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂. MSC were selected by plastic adherence and elimination of nonadherent cells 24 hours after cell seeding. When cultures reached 90% confluence, cells were detached with trypsin-EDTA solution (Lonza), and sub-cultured at 5×10^5 cells/cm² during ten passages. All experiments assessing the influence of passage number on the properties of MSC were done with 3 independent MSC preparations, at the exception of the secretion profile assays which were done with MSC from only 2 donors.

Human umbilical cord blood samples were obtained following full-term vaginal delivery. All samples were processed within 24 hours after delivery. Mononuclear cells were isolated by centrifugation over Ficoll-Paque™ Plus and washed in DPBS. CD34⁺ cells were purified using magnetic activated cell separation (MACS) CD34 isolation kits (Miltenyi Biotech, Gladbach, Germany). The purity of selected cells was always higher than 95%.

All material was acquired with informed consent and used according to the guidelines established by the Ethical Committee of the University of Liège.

Flow cytometric analysis of MSC preparations

The following antibodies were used for phenotypic characterization of MSC: anti-CD13, anti-CD14 and anti-CD36 conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-CD11b, anti-CD49a, anti-CD73, anti-CD90, anti-CD106, anti-CD146, anti-CD271, anti-SSEA4 conjugated to phycoerythrin (PE) (all from BD Biosciences, Erembodegem, Belgium), PE-anti-CD105 (Serotec, Düsseldorf, Germany), PE-anti-STRO1 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), anti-CD45 (BD Biosciences), and anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, England) conjugated to allophycocyanin (APC), and purified anti-GD2 (BD Biosciences). Cells were incubated with antibodies or isotype-matched control IgG for 30 minutes at 4°C in the dark. Cells were washed in DPBS and fixed in DPBS 1% formaldehyde (Vel, Leuven, Belgium). Data were acquired on a BD FACSCanto II flow cytometer and analyzed by using BD FACSDiVa™ software.

MSC differentiation assays

Fat, bone and cartilage differentiation assays were carried out as described by Pittenger *et al.*¹⁵ and revealed by staining with Oil Red O, Alizarin Red and Toluidine Blue, respectively.

MSC secretion profile assays

At each passage, at 90% confluence, the medium was changed and incubated for an additional 10 days. The MSC-conditioned medium was collected and frozen at -20°C for further analyzes. In some experiments, confluent MSC were stimulated with 10 ng/ml IL-1 α every other day during 10 days. To analyze the presence of BMP-4, BMP-7, Flt-3 Ligand, G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-15, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, LIF, L-selectin, SCF, SDF-1, TPO, VCAM-1, ICAM-1, MMP-2, MMP-3, MMP-10, MMP-13, TIMP-4 in conditioned medium, RayBio[®] human cytokine antibody arrays (RayBiotech, Inc, Boechout, Belgium) were used according to provided protocols. IL-6 and IL-8 concentration was measured with the use of cytometric bead array kits (BD Biosciences) according to the manufacturer's recommendations. Samples were analyzed in a BD FACSCanto II flow cytometer and analyzed by using BD FCAP Array software (BD Biosciences). Results are expressed as picograms per milliliter.

Long term cultures of CD34⁺ cells and MSC

Five thousand CD34⁺ cells were plated either in contact with confluent MSC or in transwells seeded with MSC. Cultures were maintained during 3 weeks. Thereafter, persistence of primitive progenitors was assessed by transferring cells in a semi-solid medium to allow development of secondary hematopoietic colonies. As control, uncultured CD34⁺ cells were directly transferred in semi-solid medium. Long term culture (LTC) medium consisted of α -MEM supplemented with 8% horse serum, 8% fetal bovine serum, 0.2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (all from Lonza), 0.2 mM inositol (Sigma-Aldrich), 0.1 mM 2-mercaptoethanol (Invitrogen, Merelbeke, Belgium). Cultures were maintained at 37°C in 5% CO₂ with weekly half medium changes. In some experiments, cultures were supplemented every other day with 1 μ g/ml function blocking antibodies anti-IL6 or anti-IL8 (R&D, Abingdon, UK). After 3 weeks, cultures were trypsinized. First, a third of the cell suspension was transferred in duplicate progenitor assays in a semi-solid medium consisting in MethoCult[®] GF+ H4435 (Stem Cell Technologies). After an additional 2-week incubation at 37°C secondary colony-forming cells were scored. The remaining two thirds of the cells were harvested for FACS analysis. Absolute numbers of CD34⁺, CD10⁺, CD19⁺, CD11b⁺ and CD33⁺ cells grown in cultures were determined using TruCount tubes (BD Biosciences). APC-conjugated anti-CD34, PE-Cy7-conjugated anti-CD10, APC-Cy7-conjugated anti-CD19, PE-conjugated anti-CD11b and PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD33 (all from BD Biosciences) were used. Cells were incubated with antibodies or isotype-matched control IgG for 30 minutes at 4°C in the dark. Cells were washed in DPBS and fixed in DPBS 1% formaldehyde. Data were acquired on a BD FACSCanto II flow cytometer and analyzed by using BD FACSDiVa[™] software.

Assessment of B cell maturation

The maturation stage of B cells generated after 3 weeks of co-culture in contact with MSC was assessed by flow cytometry analysis and RT-qPCR analysis of B-specific transcripts. For FACS analysis, the following antibodies

were used: FITC-conjugated anti-kappa, FITC-conjugated anti-IgM, PE-conjugated anti-lambda, PE-conjugated anti-CD79a (all from BD Biosciences). After cell fixation and permeabilization with BD Cytofix/Cytoperm[™] Fixation/Permeabilization kit, cells were incubated with antibodies or isotype-matched control IgG for 30 minutes at 4°C in the dark. Data were acquired on a BD FACSCanto II flow cytometer and analyzed by using BD FACSDiVa[™] software.

For RT-qPCR analysis, RNA was isolated with RNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, KJ Venlo, Netherlands). The RNA concentration and purity was estimated by OD measurement. To avoid genomic DNA contamination, RNA was treated with RNase-free DNaseI (Fementas GMBH, St.Leon-Rot, Germany) at 37°C for 30 minutes. cDNA synthesis were performed with RevertAid[™] H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). cDNA analysis were performed by real-time PCR. Amplification was performed using the ABI Prism 7700 sequence detection system (Applied Biosystems, Lennik, Belgium). A 20 μ L reaction mixture containing 10 μ L of Power SYBR[®] Green PCR master mix (Applied Biosystems) and cDNA template and forward and reverse primers was used. Target genes were EBF (forward primer: GATACGGCTCTGCCGCAAT, reverse primer: CAGCTGAGCCGTTGAGGAA), Pax-5 (forward primer: TGGAGGATCCAAACCAAAGG, reverse primer: GGCAAACATGGTGGGATTTT), RAG-1 (forward primer: CATCAAGCCAACCTTCGACAT, reverse primer: CAGGACCATGGACTGGATATCTC), TdT (forward primer: TTGCCCTGTTGGGATGGA, reverse primer: TCCGCTCATGTGTGGCAGATAG), VpreB (forward primer: GACATCGGTGTGTACAGCGTCTA, reverse primer: TGGCTCTTGTCTGATTGTGAGAA). The reference gene was β 2-microglobulin (forward primer: GAGTATGCCTGCCGTGTG, reverse primer: AATCCAAATGCGGCATCT). Relative quantitations of target genes were calculated using the relative standard curve method recommended by Applied Biosystems.

Transplantation of human cells into NOD/SCID mice

Two-month old NOD/SCID mice were sublethally irradiated with 300 cGy from a 137Cs source (GammaCell 40, Nordion, Ontario, Canada). Four hours before injection, 10 days and 21 days after engraftment, the mice received 20 μ L of anti asialo GM1 antiserum (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany) by intraperitoneal injection. The mice received 1.5 \times 10⁵ CD34⁺ uncultured cells or the expansion product of 1.5 \times 10⁵ CD34⁺ cells co-cultured for one week in contact with confluent MSC harvested at P1 to P10 in LTC medium. Other mice were transplanted with the expansion product of 1.5 \times 10⁵ CD34⁺ cells co-cultured for one week in transwells seeded with confluent MSC. For co-transplantation experiments, mice were infused with 1.5 \times 10⁵ uncultured CD34⁺ cells and 1.5 \times 10⁵ MSC harvested at P1 to P10. Cells were infused by intravenous tail injection. After 6 weeks, mice were killed by cervical dislocation and bone marrow cells were harvested from femurs and tibias by flushing the bones with IMDM (Lonza) with 10% FBS. Mononuclear low-density cells were isolated by centrifugation over Ficoll-Paque[™] Plus, washed and resuspended in IMDM

with 10% FBS. To assess engraftment, recipient mice BM cells were pelleted and incubated with various mouse anti-human monoclonals for 30 minutes at 4°C in the dark. APC-conjugated anti-human CD45, FITC-conjugated anti-human CD33 and PE-conjugated anti-human CD19 (all from BD Biosciences) were used. Cells were washed in DPBS and fixed in DPBS 1% formaldehyde. Data were acquired on a BD FACSCanto II flow cytometer and analyzed by using BD FACSDiVa™ software. Positive cells were identified by comparison with isotypic controls. All experiments were conducted in accordance with the recommendations of the Animal Ethics Committee of the University of Liège.

Homing of MSC

Two-month old NOD/SCID mice were sublethally irradiated with 300 cGy from a ¹³⁷Cs source. Four hours before injection, 10 days and 21 days after engraftment, the mice received 20 µl of anti-asialo GM1 antiserum by intraperitoneal injection. Mice received 2×10⁵ MSC from P3 or P7 by intravenous tail injection. After 24 hours and 5 weeks, mice were killed by cervical dislocation and blood, bone marrow, spleen, lung, liver, kidney and small intestines were harvested and frozen. Genomic DNA was isolated from mice tissues with a DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). The DNA concentration and purity was estimated by optical density (OD) measurement. DNA analyses were performed by real-time PCR. Amplification was performed using the ABI Prism 7700 sequence detection system. A 20 µl reaction mixture containing 10 µl of Power SYBR® Green PCR master mix and 100 ng of DNA template and forward and reverse primers was used. The target gene was human albumin, forward primer was TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTT, reverse primer was CTCTCCTTCTCAGAAAAGTGTGCATAT. The reference gene was murine β -actin, forward primer was CCTGTGGCATCCATGAAACTAC, reverse primer was CACTGT GTTGGCATAGAGGTCTTT. Relative quantitation of human albumin gene was calculated using the comparative Ct method. A validation experiment was carried out to confirm that efficiencies of target and reference were similar. The absolute value of the slope of log input amount versus Ct was <0.1 as recommended by the manufacturer.

Statistical analysis

Results are reported as mean \pm standard error of the mean (SEM). Comparisons were made using two tailed Student's t-tests, Mann-Whitney tests or Z-tests with SigmaPlot and SigmaStat softwares (SPSS, Richmond, CA, USA).

Results

MSC expansion and characterization of MSC preparations

MSC were purified by plastic adhesion and expanded in MSCGM. Cells were passaged every 10 days. The number of doublings was 2 to 3 at each passage (Figure 1 in *Online Supplementary Data*). Proliferation of MSC was maintained at least up to 10 passages. Cells were harvest-

ed at each passage and assayed for phenotype and differentiation potential.

As early as the second passage, cells display a characteristic mesenchymal phenotype. Cells were negative for CD11b, CD14, CD36 and CD45. Cells were weakly positive (mean channel fluorescence ratio, MCFR 1.5 to 3.5) for CD49a, CD105, CD106 and CD146 antigens. Cells were positive (MCFR 3.5 to 9) for CD13 and CD73, and strongly positive (MCFR > 25) for CD90 and GD2 antigens. Cells did not express antigens previously reported on MSC such as CD271, SSEA4 and STRO-1 antigens 16-18 (Figure 1 in *Online Supplementary Data*). There were no consistent changes in phenotype for at least 10 passages.

Differentiation into fat, bone and cartilage was assessed by transferring MSC into specific induction media 15. Lipid vacuoles, calcium deposits and chondrogenic differentiation were revealed with Oil Red O, Alizarin Red, and Toluidin Blue, respectively. The ability to differentiate into these three tissues was present in every MSC preparation tested, up to passage 10 (data not shown). All MSC preparations used to assess the hematopoiesis supportive ability as described below were confirmed to present the same phenotype and differentiation capacity.

Cytokine secretion profile

The presence of several hematopoietic cytokines, adhesion molecules and metalloproteases in MSC-conditioned medium was assayed at several passages by cytokine arrays (detection limit: 4-25 pg/mL). In baseline conditions IL-6, IL-8, SDF-1, VCAM-1, ICAM-1, MMP-2, MMP-3, MMP-13 and TIMP-4 were detected in MSC-conditioned medium. When MSC were stimulated with IL1- α , an additional secretion of GM-CSF, LIF and MMP-10 was observed. Baseline and IL1-stimulated secretion profile was maintained up to passage 10 without variations in the nature of molecules detected. Next, the expression of IL-6 and IL-8, the two most abundant secreted molecules, was quantitatively measured by flow cytometric bead arrays. We observed that IL-6 secretion was at 4.95 \pm 1.27 ng/mL after 1-3 passages and increased at 24.0 \pm 8.5 after 4-6 passages (p <0.001) and was maintained until passage 10. Conversely, IL-8 secretion decreased progressively from 8.1 \pm 3.6 ng/mL after up to 3 passages, to 4.7 \pm 1.4 ng/mL after 4-6 passages, 4.3 \pm 0.7 at P7-8 and 2.3 \pm 0.6 ng/mL after 9 or 10 passages (p <0.01 vs. P1-3; Figure 1 in *Online Supplementary Data 1*).

Hematopoiesis supportive ability of MSC in long term cultures

The hematopoiesis supportive ability in vitro was evaluated by establishing long-term cultures in contact and non contact conditions. In contact conditions, the output of secondary colony-forming cells (CFC) was higher after co-culture with P1 MSC and lower after co-culture with MSC harvested after \geq 4 passages, relative to uncultured cells (p <0.05; Figure 1A). In non contact conditions (Figure 1B) the number of secondary CFC was higher compared to contact conditions with all MSC preparations tested. A significant decline of hematopoiesis supportive ability with the number of passages was also noted in non contact conditions (p <0.05). The phenotype of hematopoietic cells grown in cultures with MSC was established. The

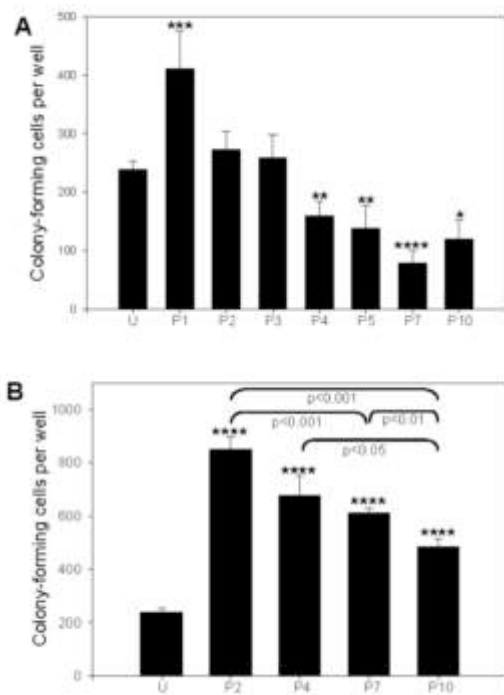


Figure 1. Supportive activity of MSC in contact and non contact conditions. (A) Absolute number of colony-forming cells after 3 weeks of co-culture initiated with 5000 CB CD34⁺ cells in contact with MSC harvested at indicated passage (P) or in 5000 uncultured CD34⁺ cells (U). (B) Cultures were done in non contact conditions. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$ versus uncultured CD34⁺ cells, $n = 4$.

expression of CD34, CD33, CD11b, CD19 and CD10 was tested on cells harvested after 3 weeks in contact and non contact conditions. Flow cytometric analysis was carried out in tubes containing a defined number of latex beads, in order to measure absolute numbers of cells with a given phenotype (Figure 2A). In contact conditions (Figure 2B), an expansion of CD34⁺ cells was noted after culture with P2 MSC. CD34⁺ cell expansion was less important after culture in contact with MSC harvested after 4 passages or more ($p > 0.05$). Myeloid cells expressing CD33 and/or CD11b also increased substantially after culture with P2 MSC, and much less with MSC of further passages ($p < 0.05$). In contrast, lymphoid cells expressing CD19 and/or CD10 were maintained or expanded with P2 MSC as well as with P4 and P7 MSC. In non contact conditions (Figure 2C), CD34⁺ cells persisted after culture with P2, P4 or P7 MSC without net proliferation. Mature myeloid cells virtually disappeared after culture with P7 MSC ($p < 0.05$), while lymphoid cell numbers were higher after culture with P7 MSC, as compared to P2 or P4 MSC ($p < 0.05$). Thus, in contact and non contact conditions, MSC support for myeloid progenitors decreased with the number of passages while B lymphoid support was maintained or even increased in late passage MSC. *In vitro* B cell maturation of human CD34⁺ cells has been reported previously to be dependent on coculture with specific

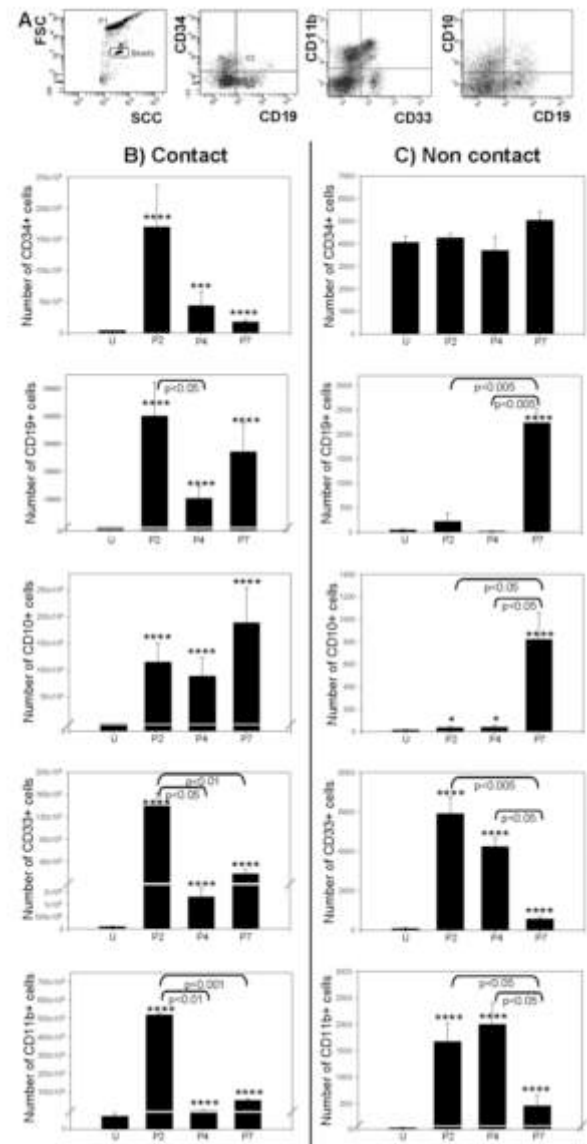


Figure 2. Support of myeloid and lymphoid progenitors by MSC. Absolute numbers of CD34⁺, CD19⁺, CD10⁺, CD33⁺ and CD11b⁺ cells grown after 3 weeks in long-term cultures with MSC harvested at indicated passage (P) or uncultured CD34⁺ cells (U), $n = 3$. (A) Representative data of flow cytometric analysis. (B) Cultures were done in contact with MSC. (C) Cultures were done in non contact conditions. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$ versus uncultured CD34⁺ cells.

murine stromal cell lines, such as MS-5 and S17.^{19,20} This prompted us to investigate whether recapitulation of B cell ontogeny could be obtained with human MSC. To define the maturation stage of outgrown B cells, a phenotypical and molecular analysis was carried out. FACS analysis of cultured CD34⁺ cells showed the expression of cCD79a, cytoplasmic κ and λ light chains as well as cytoplasmic μ heavy chain on $> 30\%$ of the cells. In comparison, $< 4\%$ of uncultured CD34⁺ expressed the same B cell markers (Figure 3A). Membrane expression of κ and λ light chains as well as complete IgM was demon-

strated on cultured CD34⁺ cells but not in native CD34⁺ cells (Figure 3B). By RT-qPCR, the expression of B cell specific transcripts such as TdT, RAG, Vpreb, EBF and Pax-5 was detected in cells harvested after 3 weeks of co-culture with MSC, but not in uncultured CD34⁺ cells (Figure 3C). This indicates the induction of B cell transcriptional program in contact with MSC. Thus, CD34⁺ cells undergo B cell differentiation up to the stage of immature IgM⁺ B cell, in contact with human MSC, similarly to previous reported models using murine stromal cell lines.

Maintenance of SCID repopulating cells in co-culture with MSC

Two-month old NOD/SCID mice sublethally irradiated with 300 cGy were used in these experiments. Cells were transplanted by intravenous tail injection. After 6 weeks mice were killed and bone marrow cells were harvested from femurs and tibias. Human chimerism was analyzed by flow cytometry (Figure 4A). Mice were considered

positive when at least 10 cells coexpressing hCD45 and either hCD19 or hCD33 were detected in 100×10⁶ mouse BM cells (detection limit: 0.01%).

First, mice received 1.5×10⁵CD34⁺ uncultured cells or the expansion product of 1.5×10³ CD34⁺ cells co-cultured for one week with confluent MSC harvested at P1 to P10 (Figure 4C, Table 1). Human CD45⁺/CD19⁺ or CD33⁺ cells were detected in the bone marrow of 50% of mice transplanted with uncultured CD34⁺ cells, with an average chimerism of 1.38±0.53 %. After co-culture with early passage MSC the percentage of positive mice was higher than 50% (P1-P2: 70%, P3-P4: 68%, *p*>0.05). However, there was no significant difference in the percentage of engrafted human cells between mice transplanted with uncultured CD34⁺ cells and mice receiving CD34⁺ cells co-cultured with early passage MSC (up to P4). After co-culture with late passage MSC (P5 to P10) only 10% of mice with reconstituted cells were detected and the percentage of engrafted human cells was very low, at 0.02%

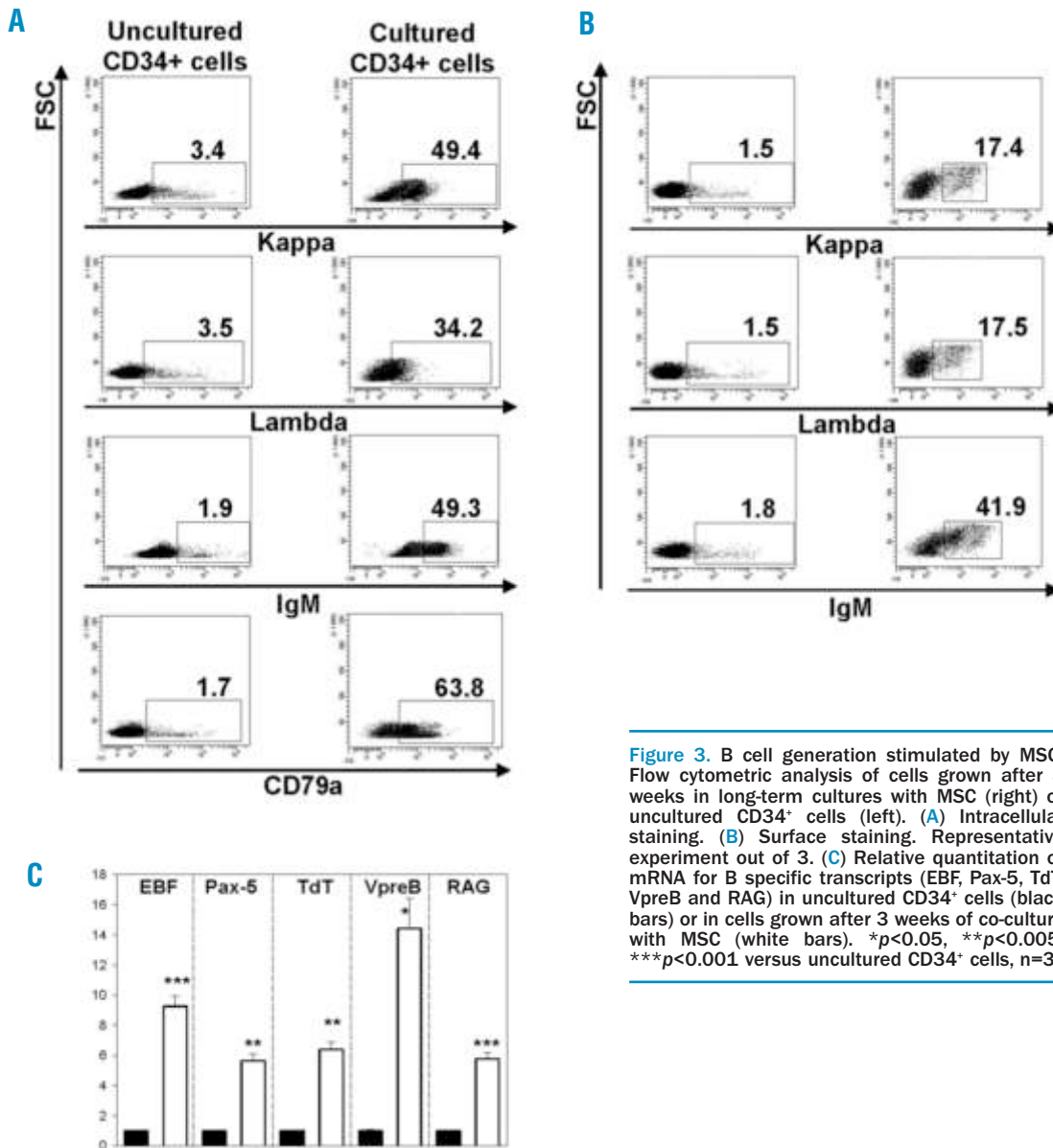


Figure 3. B cell generation stimulated by MSC. Flow cytometric analysis of cells grown after 3 weeks in long-term cultures with MSC (right) or uncultured CD34⁺ cells (left). (A) Intracellular staining. (B) Surface staining. Representative experiment out of 3. (C) Relative quantitation of mRNA for B specific transcripts (EBF, Pax-5, TdT, VpreB and RAG) in uncultured CD34⁺ cells (black bars) or in cells grown after 3 weeks of co-culture with MSC (white bars). **p*<0.05, ***p*<0.005, ****p*<0.001 versus uncultured CD34⁺ cells, n=3.

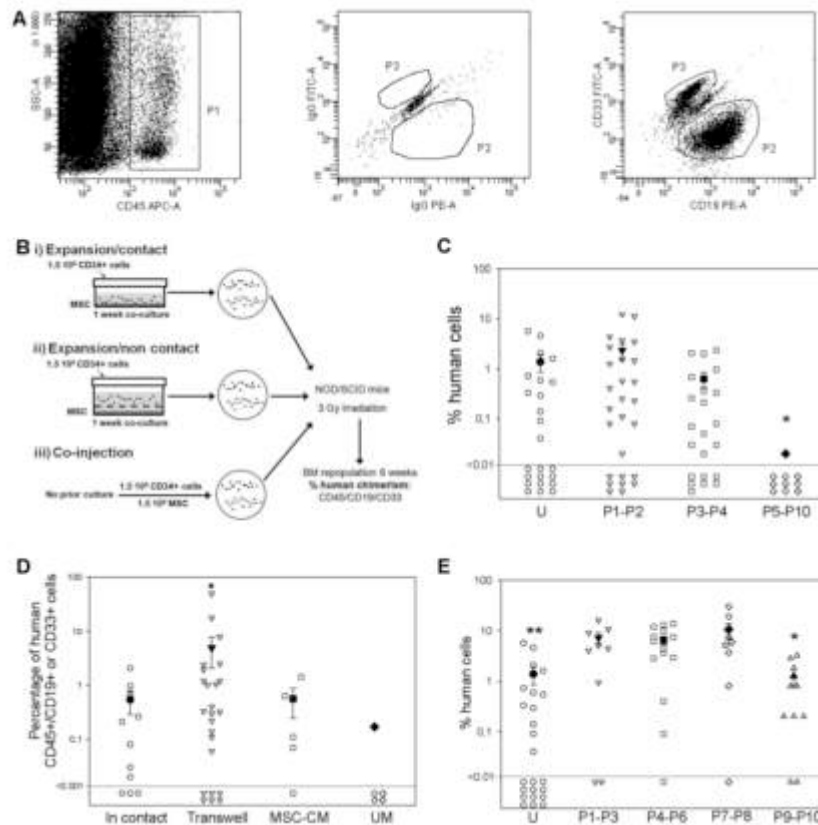


Figure 4. Human repopulating cells in NOD/SCID mice. (A) Representative flow cytometric analysis of recipient mice BM mononuclear cells. (B) Experimental design. (C) Mice received uncultured CD34⁺ cells (U) or the expansion product of CD34⁺ cells co-cultured for one week in contact with confluent MSC harvested at P1 to P10. * $p < 0.05$ versus other passages. Each open symbol represents one mouse. Solid symbols are the mean \pm SEM. (D) Mice received the expansion product of CD34⁺ cells co-cultured in contact with P4 MSC, in non contact conditions in transwell seeded with P4 MSC, in P4 MSC-conditioned medium (MSC-CM) or in unconditioned medium (UM). * $p < 0.05$ versus UM (E) Uncultured CD34⁺ cells were injected alone (U) or co-injected with MSC harvested at P1 to P10 without prior culture. * $p < 0.01$ versus other passages; ** $p < 0.01$ versus co-injection with MSC of passages P1-3, P4-6 and P7-8. Detection limit of human cell engraftment was set at 0.01% of recipient mice BM mononuclear cells.

($p < 0.005$ compared to co-culture with P1-P4 MSC). Thus maintenance of repopulating cells was higher in contact with early passage MSC compared to late passage MSC.

We next asked whether prolonged co-culture of CD34⁺ cells in contact with MSC could increase the repopulating activity. Mice were injected with the product of 1.5×10^5 CD34⁺ cells co-cultured with confluent P2 MSC for 2 weeks and 3 weeks. After 2-week culture, no BM repopulation was observed (human chimerism $< 0.01\%$ in 5/5 recipients). After 3-week culture, human engraftment was $0.09 \pm 0.04\%$ ($n=5$) and consisted exclusively of CD19⁺ B cells without myeloid engraftment. Thus, co-culture of CD34⁺ cells in contact with MSC allows maintenance but not expansion of repopulating cells.

Next, mice were transplanted with the expansion product of 1.5×10^5 CD34⁺ cells co-cultured for one week in non contact conditions, in transwells seeded with confluent P4 MSC. An additional group of mice was injected with CD34⁺ cells simply incubated for one week in P4 MSC-conditioned medium and the last group was transplanted with CD34⁺ cells kept for one week in unconditioned medium (Figure 4D, Table 1). The percentage of positive mice was similar when transplanted with CD34⁺ cells cultured in non contact conditions (72%) and in conditioned medium (80%), as compared to contact conditions (68%). There was no significant difference in the percentage of chimeric human cells between mice transplanted with CD34⁺ cells cultured in contact with MSC (P3-P4: $0.63 \pm 0.21\%$) and with MSC conditioned medium

(0.56 ± 0.32). The percentage of human cells was slightly higher after transplantation of the expansion product of CD34⁺ cells co-cultured in transwell ($4.66 \pm 2.68\%$) but the difference did not reach statistical significance. Transplantation of mice with CD34⁺ cells cultured in unconditioned medium yielded only one positive mouse out of five, with 0.17% human chimerism. Next, we investigated the potential activity of MSC in improving bone marrow engraftment of uncultured CD34⁺ cells. To that effect, 1.5×10^5 fresh cord blood CD34⁺ cells were directly co-injected with 1.5×10^5 MSC harvested after passages 1 to 10 (Figure 4E, Table 1). In this setting, more than 50% of mice showed human hematopoietic reconstitution. Compared to infusion of CD34⁺ cells only, the percentage of engrafted human cells was dramatically increased after co-injection with MSC harvested at P1 to P8 ($p < 0.006$). Conversely, MSC harvested at P9 and 10 were ineffective in providing enhanced engraftment of uncultured CD34⁺ cells ($p < 0.05$).

Regulation of the hematopoiesis-supportive activity of MSC by IL-6 and IL-8

We attempted to define critical cytokines contributing to the pro-hematopoietic activity of MSC. CD34⁺ cells were cultured in contact with MSC in medium supplemented with neutralizing antibodies anti-IL6 or IL-8, or with control IgG. First long-term cultures were established with P2 or P7 MSC as feeder cells. A decrease of CD34⁺ ($p < 0.05$, Figure 5A), CD33⁺ ($p < 0.05$, Figure 5B) and

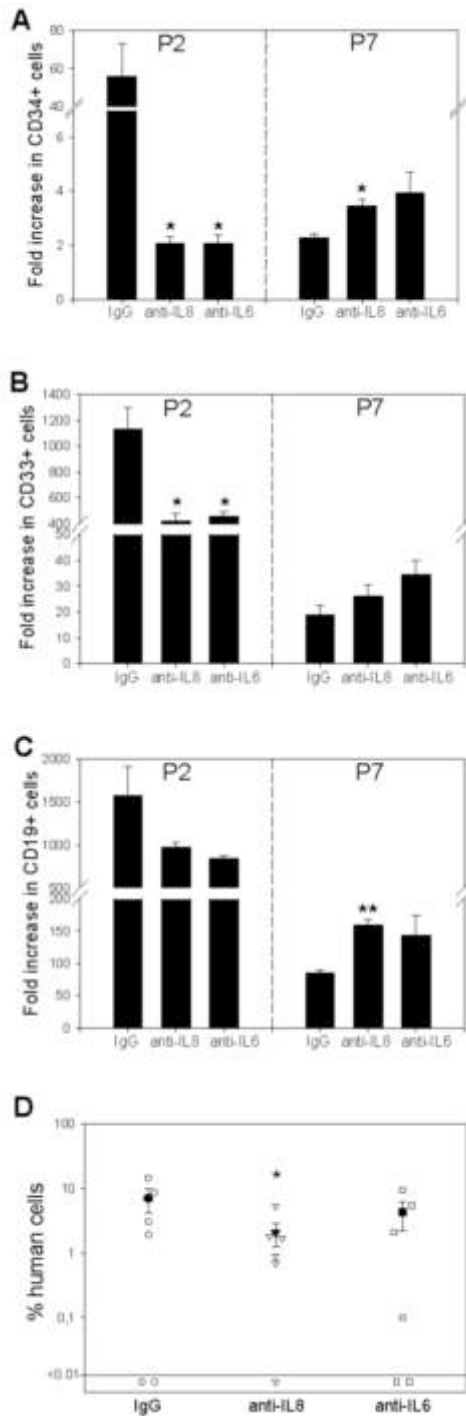


Figure 5. Regulation of MSC supportive activity by IL-6 and IL-8. Outgrowth of CD34+ (A), CD33+ (B) and CD19+ (C) cells after 3 weeks in long-term cultures supplemented with anti-human IL-8, anti-human IL-6 or control IgG, n=3. Results are expressed as fold increase relative to input cells. *p<0.05, **p<0.005 versus cultures supplemented with control IgG. (D) Analysis of human cells in the BM of recipient NOD/SCID mice that received the expansion product of CD34+ cells co-cultured for one week with confluent P2 MSC. Cultures were supplemented with anti-human IL-6, anti-human IL-8 or control IgG. Each open symbol represents one mouse, closed symbols are mean \pm SEM. *p<0.05 versus IgG control.

Table 1. Recovery of repopulating cells after co-culture or co-injection with MSC.

Type of cells in transplant	Passage number of MSC used positive	Number of mice/total number of injected mice (%)	Percent human cells in recipient BM (mean \pm SEM)
Uncultured CD34+ cells only	–	12/24 (50)	1.38 \pm 0.5
CD34+ cells cultured in contact with MSC	P1-P2	19/27 (70)	2.34 \pm 0.83 ¹
	P3-P4	15/22 (68)	0.63 \pm 0.21 ¹
	P5-P10	1/10 (10)	0.02 \pm 0.00
CD34+ cells cultured w/o contact (transwell) with MSC	P4	18/25 (72)	4.66 \pm 2.68 ²
CD34+ cells cultured with MSC-conditioned medium	P4	4/5 (80)	0.56 \pm 0.32
CD34+ cells cultured with unconditioned medium	–	1/5 (20)	0.17 \pm 0.00
Uncultured CD34+ cells co-injected with MSC	P1-P3	7/9 (78)	7.21 \pm 1.94 ⁴
	P4-P6	14/15 (93) 5	6.51 \pm 1.18 ⁴
	P7-P8	8/9 (89)	10.48 \pm 3.46 ⁴
	P9-P10	8/10 (80)	1.25 \pm 0.43

NOD/SCID mice were transplanted with 1.5×10^5 uncultured CD34+ cells, the expansion equivalent of 1.5×10^5 CD34+ cells cultured in the indicated conditions or uncultured 1.5×10^5 CD34+ cells co-injected with MSC. MSC preparations of defined passages were used as indicated. The proportion of positive mice and the mean % human cells in positive mice is given for each condition, at 6 weeks posttransplantation. MSC: mesenchymal stem cells; BM: bone marrow; P: passage. ¹p<0.05 versus P5-P10, Mann-Whitney tests. ²p<0.05 versus cultured with unconditioned medium, Mann-Whitney tests. ³p<0.01 versus P9-P10, Mann-Whitney tests; ⁴p<0.01 versus uncultured CD34+ cells only, Mann-Whitney tests. ⁵p<0.05 versus uncultured CD34+ cells only, Z-tests.

CD19+ ($p>0.05$, Figure 5C) outgrown cells was observed after IL-6 or IL-8 neutralization in 3 weeks culture in contact with P2 MSC. Conversely, when cultures were set on P7 MSC, no effect of IL-6 neutralization was observed while increases of CD34+ and CD19+ cell outgrowth were noted after IL-8 inhibition (Figure 5A, B and C for CD34+ cells, CD33+ cells and CD19+ cells, respectively).

Next, NOD/SCID mice were transplanted with CD34+ cells cultured for one week with P2 MSC, in medium supplemented with IL-6 or IL-8 function blocking antibodies. A slight but statistically significant decrease in repopulating activity was noted after IL-8 neutralization, while IL-6 neutralization had no effect (Figure 5D). Thus, in contact with early passage (P2) MSC, both IL-6 and IL-8 contribute to *in vitro* differentiation of myeloid and lymphoid cells, while only IL-8 is involved in the maintenance of repopulating cells. Neither IL-6 nor IL-8 mediate hematopoietic support in contact with late passage (P7) MSC.

Homing of MSC

Finally, the homing capacity of MSC in several tissues was tested after passages 3 and 7. NOD/SCID mice sublethally irradiated with 300 cGy received 2×10^5 MSC from P3 or P7 by intravenous tail injection. After 24 hours and 5 weeks, mice were killed and blood, bone marrow, spleen, lung, liver, kidney and small intestine were harvested for DNA analysis by real-time PCR of human albumin. Twenty-four hours after injection of P3 MSC bone

marrow, small intestine, liver and lung tested positive for human albumin in at least one mouse per group of 4 (Table 1 in *Online Supplementary Data*). Spleen and kidney were negative in all mice. All mice tested positive in the lungs and at least 10-fold more MSC were detected in the lungs as compared to other tissues. After 5 weeks bone marrow was positive in all mice. Other organs were all negative. Late (P7) passage MSC had similar tissue distribution. Overall, these results suggest that MSC, irrespective of passage number, were first trapped in the lungs before reaching other organs such as small intestine or bone marrow. Only in the BM could MSC survive up to 5 weeks.

Discussion

Recent clinical trials indicate that MSC might be useful to prevent and/or treat graft-versus-host disease and promote donor cell engraftment after hematopoietic stem cell transplantation.^{21,22} Procedures used to prepare MSC for clinical applications are based on enrichment of MSC present in BM MNC by plastic adherence, followed by *ex vivo* expansion in selected serum-containing medium.²³ The duration of the *ex vivo* expansion step is highly variable and depends on the ratio between the number of MSC in the initial BM inoculum and the target number of MSC to infuse to the patient, i.e., on the number of doublings. It has been described that the capacity of MSC to engraft in recipient BM declines with increasing passage number.¹³ Whether the hematopoiesis-supportive activity of MSC is modified with culture duration had not been studied before.

In the present study, cultures of CB CD34⁺ cells were set up in contact with feeder cells consisting of MSC harvested after 2 to 10 passages. Cells were plated in the absence of exogenous cytokines which might otherwise blunt changes in hemato-supportive properties of MSC. Our main results indicate a progressive decline in output of CFC by CD34⁺ cells cultured with MSC of increasing passage. Likewise, the outgrowth of differentiated myeloid CD33⁺ and CD11b⁺ cells was reduced when MSC of late passages were used. In addition, maintenance of SRC *ex vivo* was reduced when MSC had executed more than 5 passages previously, which represents approximately 10 to 12 doublings. In contrast, MSC support of lymphoid CD19⁺ and CD10⁺ cell outgrowth was not dependent on the number of passages. When the engraftment-promoting activity of MSC was assayed by co-transplantation with uncultured CD34⁺ cells, it was also observed that late passage MSC (>9 passages or 25 doublings) were inferior compared to early passage MSC.

A detailed characterization of MSC preparations revealed only minor changes with passage number. The phenotype of MSC preparations was stable up until P10, as was the rate of doublings. Differentiation into fat, bone and cartilage was also conserved. The types of cytokines, adhesion molecules and matrix proteases detected in MSC-conditioned medium were similar in all tested passages. However, quantitative measurements of the two most abundant cytokines produced by MSC, i.e. IL-6 and IL-8, revealed a progressive decline of IL-8 secretion dur-

ing culture while IL-6 secretion was increased. Inhibition experiments showed that both cytokines contributed to the outgrowth of CD34⁺, CD19⁺ and CD33⁺ cells in cultures supported by low passage MSC, but not by late passage MSC. Interestingly, IL-8 inhibition, but not of IL-6, was also associated with decreased SRC maintenance in cultures with P2 MSC. This suggests that measurement of IL-8 may represent a surrogate marker of the hemato-supportive activity of MSC, while high levels of IL-6, as observed in medium conditioned with late passage MSC, do not contribute to better support of hematopoietic cells. The mechanism by which IL-8 promotes recovery of SRC from *in vitro* cultures remains to be determined. IL-8 has been reported to stimulate metastasis and angiogenesis in various tumor models²⁴. Likewise, our hypothesis is that IL-8 enhances engraftment of repopulating cells by increasing expression of metalloprotease MMP-2 and consequently migration and infiltration within the BM²⁵.

Our data also indicate the influence of direct contact between MSC and CD34⁺ cells in co-cultures. Cultures of CD34⁺ cells and MSC separated in transwells by a semi-permeable filter did not reduce the output of CFC and SRC, in comparison with contact cultures. In contrast, outgrowth of differentiated myeloid and lymphoid cells was massively reduced in non contact conditions. Thus, direct contact with MSC appears to be important for proliferation, late commitment and differentiation of hematopoietic cells but at the expense of a depletion of the progenitor cell compartment. From a practical standpoint for the clinical use of CD34⁺ cells/MSC co-cultures, non contact conditions might allow for effective CFC expansion while limiting generation of mature cells.

Our study also reveals the strong pro-lymphopoietic activity of MSC. *In vitro* B cell generation was previously reported to depend on specific murine stromal cell lines.²⁰ In our study and as recently reported by Ichii *et al.*,⁴ MSC were able to support the production of B cell progenitors and immature IgM⁺ B cells, in serum-containing medium, in the absence of exogenous cytokines. We extend these findings by showing by qPCR analysis the expression of TdT, RAG-1, VpreB, Pax-5 and EBF in outgrown B cells, but not in input CD34⁺ cells. Thus this coculture system recapitulate B cell ontogeny up to immature B cells and could be further used to delineate extrinsic signals implicated in human B cell development. The pro-lymphopoietic activity of MSC is not affected by prolonged *ex vivo* culture, up to 30 doublings. Generation of B cells by coculture of CD34⁺ cells and MSC opens up new therapeutic possibilities. Whether MSC co-transplantation in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation can be used to hasten B cell regeneration could be studied in future clinical trials. Enhancement of *in vitro* maturation of CD34⁺ cells to B lymphocytes by MSC could also have implications in the design of adoptive immunotherapy procedures.²⁶

In conclusion, our study shows that prolonged *ex vivo* culture of BM MSC is associated with decreased supportive activity toward repopulating stem cells and myeloid progenitors, while the supportive activity toward B lymphoid progenitors is maintained. These changes are not accompanied by alterations in the phenotype or the dif-

ferentiation capacity of MSC. An important implication is that current quality control procedures used in clinical cell therapy laboratories and based on phenotype analysis do not accurately reflect the biological properties of MSC preparations. Our data also implies that MSC prepared for clinical trials should be passaged as little as necessary.

Authorship and Disclosures

AG was the principal investigator and takes primary responsibility for the paper. AB, SD, SB and MD collected the data. AB and AG analyzed the data and wrote the paper. YB provided study materials. AG and YB coordinated the research. The authors reported no conflict of interest.

References

- 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;107:1878-87.
- 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* 2007;35:314-25.
- 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;16:579-85.
- Ichii M, Oritani K, Yokota T, Nishida M, Takahashi I, Shirogane T, et al. Regulation of human B lymphopoiesis by the transforming growth factor- β superfamily in a newly established coculture system using human mesenchymal stem cells as a supportive microenvironment. *Exp Hematol* 2008;36:587-97.
- da Silva CL, Goncalves R, Crapnell KB, Cabral JMS, 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;33:828-35.
- 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;9:338-47.
- Chan SL, Choi M, Wnendt S, Kraus M, Teng E, Leong HF, et al. Enhanced in vivo homing of uncultured and selectively amplified cord blood CD34+ cells by cotransplantation with cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. *Stem Cells* 2007;25:529-36.
- Van Overstraeten-Schlogel N, Beguin Y, Gothot A. Role of stromal-derived factor-1 in the hematopoiesis-supporting activity of human mesenchymal stem cells. *Eur J Haematol* 2006;76:488-93.
- Angelopoulou M, Novelli E, Grove JE, Rinder HM, Civin C, Cheng L, et al. Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 2003;31:413-20.
- 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;30:870-8.
- 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;31:881-9.
- Shi M, Li J, Liao L, Chen B, Li B, Chen L, et al. Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice. *Haematologica* 2007;92:897-904.
- Kyriakou C, Rabin N, Pizzey A, Nathwani A, Yong K. Factors that influence short-term homing of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a xenogeneic animal model. *Haematologica* 2008;93:1457-65.
- Izadpanah R, Kaushal D, Kriedt C, Tsien F, Patel B, Dufour J, et al. Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 2008;68:4229-38.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
- Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RC. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* 2007;109:1743-51.
- Jones EA, English A, Kinsey SE, Straszynski L, Emery P, Ponchel F, et al. Optimization of a flow cytometry-based protocol for detection and phenotypic characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Cytometry B Clin Cytom* 2006;70:391-9.
- Gronthos S, Zannettino ACW, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, et al. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 2003;116:1827-35.
- Berardi AC, Meffre E, Pflumio F, Katz A, Vainchenker W, Schiff C, et al. Individual CD34+CD38lowCD19-CD10- progenitor cells from human cord blood generate B lymphocytes and granulocytes. *Blood* 1997;89:3554-64.
- Fluckiger AC, Sanz E, Garcia-Lloret M, Su T, Hao QL, Kato R, et al. In Vitro Reconstitution of Human B-Cell Ontogeny: From CD34(+) Multipotent Progenitors to Ig-Secreting Cells. *Blood* 1998;92:4509-20.
- Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008;371:1579-86.
- Koc 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;18:307-16.
- 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;8:315-7.
- Li A, Varney ML, Valasek J, Godfrey M, Dave BJ, Singh RK. Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP-2 production and angiogenesis. *Angiogenesis* 2005;8:63-71.
- Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:6735-41.
- Luo XM, Maarschalk E, O'Connell RM, Wang P, Yang L, Baltimore D. Engineering human hematopoietic stem/progenitor cells to produce a broadly neutralizing anti-HIV antibody after in vitro maturation to human B lymphocytes. *Blood* 2009;113:1422-31.

Human Bone Marrow Adipocytes Block Granulopoiesis Through Neuropilin-1-Induced Granulocyte Colony-Stimulating Factor Inhibition

ZAKIA BELAID-CHOUCAIR,^{a,b,c} YVES LEPELLETIER,^c GÉRALDINE PONCIN,^{a,b} ALBERT THIRY,^{a,b} CHANTAL HUMBLET,^{a,b} MUSTAPHA MAACHI,^d AUREORE BEAULIEU,^{a,b} ELKE SCHNEIDER,^c ALEXANDRA BRIQUET,^e PIERRE MINEUR,^f CHARLES LAMBERT,^f DANIELLA MENDES-DA-CRUZ,^c MARIE LOUISE AHUI,^c VAHID ASNAFI,^g MICHEL DY,^c JACQUES BONIVER,^{a,b} BETTY V. NUSGENS,^f OLIVIER HERMINE,^{c,i} MARIE PAULE DEFRESNE^{a,b}

Departments of ^aCytology and Histology and ^bPathological Anatomy (Groupe Interdisciplinaire de Génoprotéomique Appliquée-Recherche), University of Liege, Belgium; ^cCentre National de la Recherche Scientifique-Unité Mixte de Recherche, Université Paris V. René Descartes, ^gLaboratory of Hematology, Université Paris V. René Descartes, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, and ⁱDepartment of Clinical Hematology, Université Paris V. René Descartes, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker, Paris, France; ^dService de Biochimie et Hormonologie, Hôpital Tenon, Paris, France; Laboratories of ^eHematobiology and Immunohematology (Groupe Interdisciplinaire de Génoprotéomique Appliquée-Recherche) and ^fConnective Tissue Biology (Groupe Interdisciplinaire de Génoprotéomique Appliquée-Recherche), University of Liege, Liège, Belgium

Key Words. Adult human bone marrow • Granulopoiesis • Stem cell-microenvironment interactions • Bone marrow stromal cells • In vitro differentiation • Bone marrow adipocytes • Neuropilin-1 • Macrophages

ABSTRACT

Adipocytes are part of hematopoietic microenvironment, even though up to now in humans, their role in hematopoiesis is still questioned. We have previously shown that accumulation of fat cells in femoral bone marrow (BM) coincides with increased expression of neuropilin-1 (NP-1), while it is weakly expressed in hematopoietic iliac crest BM. Starting from this observation, we postulated that adipocytes might exert a negative effect on hematopoiesis mediated through NP-1. To test this hypothesis, we set up BM adipocytes differentiated into fibroblast-like fat cells (FLFC), which share the major characteristics of primitive unilocular fat cells, as an experimental model. As expected, FLFCs constitutively produced macrophage colony stimulating factor and induced CD34⁺ differenti-

ation into macrophages independently of cell-to-cell contact. By contrast, granulopoiesis was hampered by cell-to-cell contact but could be restored in transwell culture conditions, together with granulocyte colony stimulating factor production. Both functions were also recovered when FLFCs cultured in contact with CD34⁺ cells were treated with an antibody neutralizing NP-1, which proved its critical implication in contact inhibition. An inflammatory cytokine such as interleukin-1 β or dexamethasone modulates FLFC properties to restore granulopoiesis. Our data provide the first evidence that primary adipocytes exert regulatory functions during hematopoiesis that might be implicated in some pathological processes. *STEM CELLS* 2008;26:1556–1564

Disclosure of potential conflicts of interest is found at the end of this article.

INTRODUCTION

The bone marrow (BM) microenvironment plays a critical role in regulating proliferation and differentiation of hematopoietic cells (HC) [1, 2]. This process depends on complex interactions

between both compartments that involve growth factors and cytokines [3, 4], as well as direct cell-to-cell contacts through surface molecules [5–8]. In femoral, so-called fatty BM, the microenvironment of residual HCs, which include quiescent stem cells and macrophages (Mo), is composed mainly of adipocytes. Several nonhematopoietic functions of adipocytes have

Author contributions: Z.B.-C. and Y.L.: collection and assembly of data, conception and design, data analysis and interpretation, manuscript writing; G.P.: collection and assembly of data, data analysis and interpretation; A.T. and A.Br.: provision of study material or patients; C.H.: data analysis and interpretation, administrative support; M.M. and M.L.A.: data analysis and interpretation; A.Be., P.M., C.L., D.M.-D.-C., and V.A.: collection and assembly of data; E.S.: manuscript writing; M.D. and J.B.: final approval of manuscript; B.V.N., O.H., and M.P.D.: conception and design, data analysis and interpretation, manuscript writing, financial support.

Correspondence: Marie Paule Defresne, M.D., Ph.D., Department of Cytology and Histology (Groupe Interdisciplinaire de Génoprotéomique Appliquée-Recherche), University of Liege, CHU-B23, 4000 Liège, Belgium. Telephone: 32-4-366-29-19; Fax: 32-4-366-29-19; e-mail: mp.defresne@ulg.ac.be; or Olivier Hermine, M.D., Ph.D., Centre National de la Recherche Scientifique-Unité Mixte de Recherche 8147, Université Paris V. René Descartes, Hôpital Necker, 161 rue de Sèvres, 75015 Paris, France. Telephone: 0033144490675; Fax: 0033144490676; e-mail: hermine@necker.fr Received January 22, 2008; accepted for publication March 24, 2008; first published online in *STEM CELLS EXPRESS* April 3, 2008. ©AlphaMed Press 1066-5099/2008/\$30.00/0 doi: 10.1634/stemcells.2008-0068

been reported, such as a contribution to systemic lipid metabolism, supply of organ-specific energy, and promotion of osteogenesis [9, 10]. Furthermore, adipocytes are regarded as part of an endocrine organ [11, 12], since they produce hormones such as leptin [13]. In contrast, up to now, in humans, their role in hematopoiesis has been questioned. The participation of adipocytes in the regulation of hematopoiesis is plausible because of their capacity to produce a number of molecules required in this process, including vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) [14, 15], cytokines such as stem cell factor (SCF), macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), and interleukin (IL)-6 [16, 17], and the nonclassical VEGF receptor known as neuropilin-1 (NP-1) [18].

NP-1 can bind two types of ligands, semaphorin of class-3 [19] and VEGF [20], both of which take part in regulating complex cell-to-cell interactions, including neuronal guidance [21], angiogenesis [22], and regulation of central and peripheral immunity [23, 24]. Neuropilin-1 has also been described as a functional cell-surface receptor in the murine MS5 stromal cell line and is involved in the overexpression of thrombospondin and fms-like tyrosine kinase-3 ligand, both of which regulate early events in hematopoiesis [25]. However, nothing is known about the involvement of NP-1 in late stages of differentiation.

We reported in a previous study that NP-1 expression was higher in femoral than in iliac crest BM and that it was associated mainly with adipocytes [18], raising the question of its physiologic relevance in hematopoiesis. To address this issue, we collected adipocytes from human femoral BM that acquired fibroblast-like fat cell (FLFC) morphology *in vitro* but conserved the typical features of freshly isolated bone marrow adipocytes, including expression of specific surface molecules such as leptin and preadipocyte factor-1 (Pref-1)/ δ -like protein-1 (dlk-1).

Using FLFCs as a model of primary adipocytes, we examined the effects of FLFCs (or adipocytes) on CD34⁺ progenitor cell differentiation and the putative involvement of NP-1 in this process. We provide evidence that adipocytes participate in hematopoiesis by hampering granulopoiesis through inhibition of the production of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), a cytokine required in polynuclear neutrophil (PNN) differentiation [26–28]. We show that this negative regulation occurs through cell-to-cell contact in which NP-1 plays a major role. We discuss the possible implication of these findings in pathological conditions.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and Culture of Adipocytes and Bone Marrow-Derived Stromal Cells

Femoral BM and iliac crest BM samples were obtained from patients undergoing hip surgery at the Department of Orthopedic Surgery of the University Hospital of Liege, Belgium. The ethical committee approved this study, and the donors were informed in accordance with the Helsinki convention. Cells from femoral biopsies were isolated by digestion with type II collagenase solution (3 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Quentin le Fallavier, France, <http://www.sigmaaldrich.com>) for 1 hour 30 minutes at 37°C. Floating adipocyte were separated by centrifugation for 10 minutes at 700 rpm and then filtered on a 200- μ m membrane. Adipocytes were cultured using the ceiling method as previously described [29, 30] and amplified using a long-term culture medium (α -minimal essential medium, 12.5% horse serum, 12.5% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 0.2 M inositol, and 100 M β -mercaptoethanol). Marrow-derived stromal cells (MDSCs) were obtained from iliac crest

BM after Ficoll gradient (GE Healthcare, Uppsala, Sweden, <http://www.gehealthcare.com>) and seeding in a flask.

RNA Extraction and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Analysis

Total RNA was purified from cell suspensions using the High Pure RNA Isolation kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, <http://www.roche-applied-science.com>). The amount of purified RNA was quantified by fluorimetry using the RiboGreen RNA Quantification kit (Molecular Probes, Eugene, OR, <http://probes.invitrogen.com>). The following specific primers were used to amplify the following mRNA: endogens 28S, 3'-GTTACCCACTAATAGGGAACGTGA and 5'-GATTCTGACTTAGAGGCGTTCAGT; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), 5'-CCTGGCCAAGGTCATCCATGACA and 3'-GGGATGACCTTGCCCACAGCCTT; glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH), 5'-GTTATTGGAGGAGGAGCAACAGGA and 3'-CTAGCAGGTTGGCACGCTCATGA; adipocyte fatty acid-binding protein (aP2), 5'-GGTACCTGGAACTGTCTCCAGT and 3'-TCCTGTCATGTCAGTGACTTCCGT; lipoprotein lipase (LPL), 5'-GACTGTTCTCAGATGCCCTACAA and 3'-CCACCAGTCTGAC-CAGCTAAAGTA; peroxisome proliferator-activated receptor 2 (PPAR γ 2), 5'-CAGTGGGGATGTCTCATAATGCCA and 3'-TGTTCTTCTGTCAAGATCGCCCT; G-CSF, 5'-AGCTTCTGCTCAAGTGCTTAGAG and 3'-TTCTTCCATCTGCTGCCAGATGGT; granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), 5'-GTCTCTGAACCTGAGTAGAGACA and 3'-AAGGGGATGACAAGCAGAAAGTCC.

Reactions were performed in an automated thermal cycler (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, <http://www.perkinelmer.com>) using the geneAmp ThermoStable rTth Reverse Transcriptase RNA polymerase chain reaction (PCR) kit (PerkinElmer), specific pairs of primers (Eurogentec, Seraing, Belgium, <http://www.eurogentec.be>), and 10 ng of RNA per 25 μ l of reaction mixture. Known copy number of the internal standard (synthetic standard RNA) was used for GAPDH and 28S mRNA amplification.

Cocultures of CD34⁺ Progenitors with FLFCs or MDSCs

FLFCs and MDSCs were cultured in 6- or 24-well plates or in transwell chambers at 150×10^3 cells or 30×10^3 cells, respectively. After cell layer formation, 5×10^3 (6-well plates) or 2×10^3 (24-well plates) CD34⁺ cells enriched by magnetic bead separation kit according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany, <http://www.miltenyibiotec.com>) were added. Cocultures were stopped after 1–5 weeks for analysis. Conditioned media were collected and conserved at -80°C until analysis of leptin, G-CSF, and IL-1 by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (R&D Systems Inc., Lille, France, <http://www.rndsystems.com>). Cytospins were realized for May-Grünwald-Giemsa (MGG) staining. Flow cytometry analysis was performed on a FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company, Lille, France, <http://www.bd.com>) after cell staining with a goat polyclonal anti-NP-1 antibody followed by a fluorescein isothiocyanate-rabbit anti-goat IgG antibody.

FLFC and CD34⁺ Transplantation in NOD/SCID Mice

FLFCs (1×10^6 cells) alone or added to 5×10^3 CD34⁺ cells were grafted into the kidney capsule of 8-week-old NOD/SCID mice as previously described [31]. Fifteen days after transplantation, kidneys were collected, embedded in Tissue-Tek (Sakura Finetek, Europe B.V., Zoeterwoude, The Netherlands, <http://www.sakura.com>), and frozen at -80°C . Five-micrometer sections were cut and stained with hematoxylin and eosin or stained with anti-adiponectin (R&D Systems) and anti-Mac-387 (Dako N.V., Heverlee, France, <http://www.dako.com>). Staining was detected by horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody and the liquid Diaminobenzidine (DAB) system (Dako). Granulopoiesis was analyzed by chloroacetate esterase activity detection. Human BM specimen was used as a positive control.

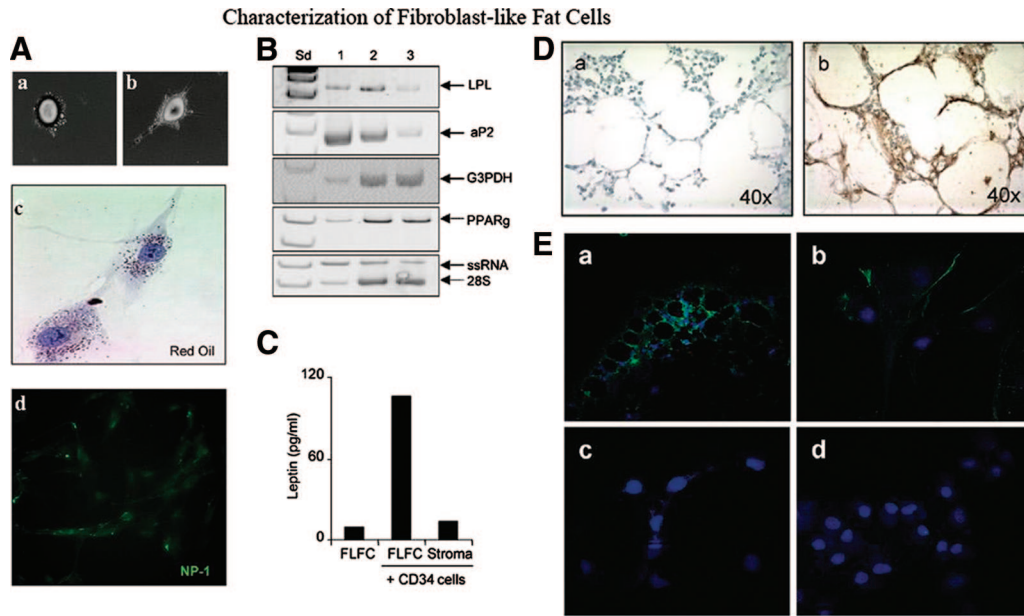


Figure 1. Characterization of FLFCs. (A): Adipocytes in culture acquired an FLFC morphology (Aa–Ac) but still contained Oil Red O-positive droplets (Ac) and were stained with anti-NP-1 antibody (Ad). (B): Reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR) was used to analyze the presence of adipogenic markers (LPL, aP2, G3PDH, PPAR γ) in freshly isolated adipocytes (lane 1), FLFC/CD34⁺ cocultures (lane 2), and FLFCs (lane 3). Internal ssRNA and 28S oligos were used to verify RT-PCR efficiency and to standardize PCR product. (C): Leptin production assessed by enzyme-linked immunosorbent assay in FLFC–CD34⁺ cocultures and in cocultures of marrow stroma and CD34⁺. (D): Immunohistochemistry detected preadipocyte factor-1 (Pref-1)/ δ -like protein-1 (dlk-1)-positive adipocytes in the bone marrow (Da), and the specificity was tested using blocking peptide (Db). (E): Freshly isolated marrow adipocytes (Ea) and FLFCs (Eb) expressed Pref-1/dlk-1; HS5 (human stromal cell line) (Ec), and mesenchymal stem cells (Ed) were negative. Nuclei were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole. Data are representative of one of three independent experiments. Abbreviations: aP2, adipocyte fatty acid-binding protein; FLFC, fibroblast-like fat cells; G3PDH, glycerol-3-phosphate dehydrogenase; LPL, lipoprotein lipase; NP-1, neuropilin-1; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor γ ; ssRNA, synthetic standard RNA.

Immunohistochemical Studies of Pref-1/dlk-1 and G-CSF Expression

The expression of Pref-1/dlk-1 was analyzed in paraffin-embedded human bone marrow, in human bone marrow-isolated adipocytes, and in cultured cells (FLFCs, mesenchymal stem cells [MSC], and HS5) using a goat anti-human antibody, DLK (N18) (1:5). The specificity of the staining was assessed by incubating the antibody with blocking peptide DLK (N-18)-P (1/1) (all from Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, <http://www.scbt.com>). For tissue sections, dlk-1/Pref-1 was detected by using horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-goat IgG as secondary antibody revealed with liquid DAB system. For bone marrow-isolated adipocytes and cultured cells, we used a biotinylated rabbit anti-goat IgG as a secondary antibody (1:200) revealed with streptavidin-Alexa488 (1:500) (Invitrogen, Liège, Belgium, <http://www.invitrogen.com>). Tissue sections were deparaffined by xylene and hydrated by an ethanol gradient (100% to 20% vol/vol). The hydrated sections were incubated in 3% H₂O₂ to quench endogenous peroxidase activity. Slides were incubated with an unmasking EDTA solution (1 mM) (PROSAN; Dako), and nonspecific sites were blocked with 3% horse serum, 1% bovine serum albumin before being incubated with primary and secondary antibodies. Bone marrow adipocytes and cultured cells were first fixed with cold acetone for 5 minutes and treated for immunostaining as described above. For the G-CSF expression analysis by immunostaining in FLFCs/CD34⁺ and MDSCs/CD34⁺ in cell-cell contact and in transwell chambers cocultures, adherent macrophages alone or with FLFCs were fixed with cold acetone for 5 minutes, and endogenous peroxidases were blocked with H₂O₂ for 30 minutes. Cells were then stained by a goat anti-G-CSF (R&D Systems) in saponin buffer (1/50) for 1 hour at room temperature. A positive staining was detected by biotinylated rabbit anti-goat IgG as a secondary antibody (1:200) and

revealed by streptavidin-HRP (1/100) and liquid DAB system (all from Dako N.V.).

Cocultures of Granulocyte Precursors with FLFCs and/or Monocytes

CD34⁺ were seeded at 5×10^5 cells in 1 ml with SCF (50 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml), GM-CSF (5 ng/ml), and G-CSF (10 ng/ml). At day 5, granulocyte precursors (PreGra) were enriched using the CD36⁺ and CD14⁺ monocyte depletion kit (Miltenyi Biotec). Polynuclear neutrophil maturation was analyzed after culture of 10⁴ PreGra with either 10⁴ monocytes or 25×10^3 FLFCs. The cocultures were done in cell-cell contact or using 0.4- μ m transwell chambers. Cocultures were stopped after 16 days and analyzed by MGG staining. The absolute number of mature granulocytes was evaluated as a mean of mature segmented PNN in a field of 100 cells of immature PreGra and mature segmented PNN excluding monocytes/macrophages and FLFCs.

Neutralization of Neuropilin-1

We used a neutralizing antibody (endotoxin-free polyclonal goat anti-NP-1 antibody) (a generous gift from A. Kolodkin, Johns Hopkins University) well reported by our group [23] and others [32, 33]. Zero to 20 μ g/ml was added in FLFC and CD34⁺ cocultures for 5 weeks. This anti-NP-1 antibody was also added for 2 weeks in PreGra, macrophage, and FLFC coculture at 20 μ g/ml.

Statistical Analysis

The results were analyzed by independent samples in two-tailed and unpaired Student's *t* tests and are presented as mean \pm SE deviation.

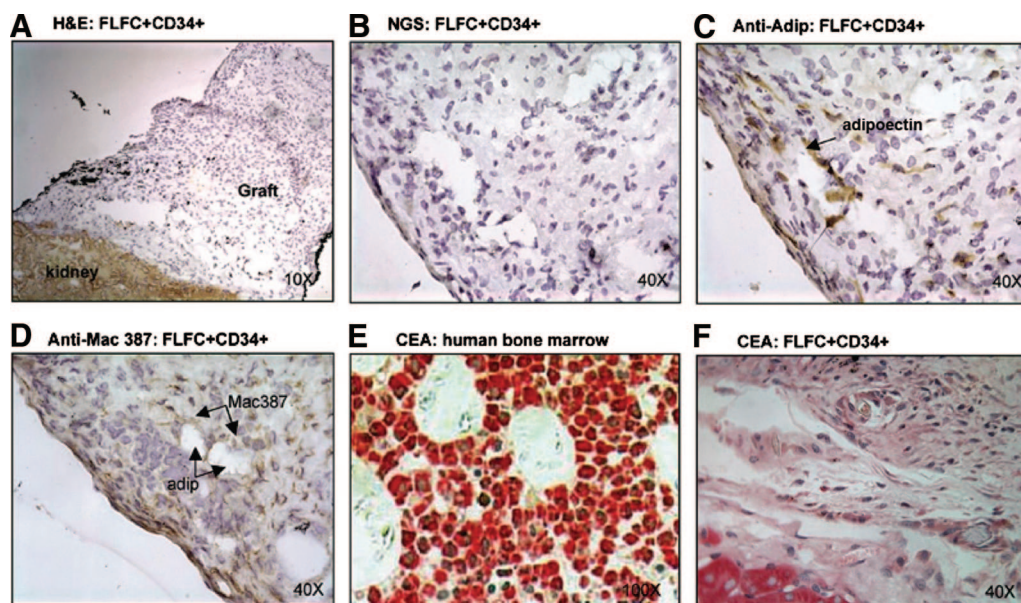


Figure 2. Histological analysis of a graft of FLFC and CD34⁺ under the kidney capsule of NOD/SCID mice shows the differentiation of CD34⁺ into macrophages. **(A):** Hematoxylin and eosin stain showed the morphology of the graft (magnification, $\times 10$). **(C):** A goat monoclonal anti-human adip antibody identified human adipocytes ($\times 40$). **(B):** Negative control with NGS ($\times 40$). **(D):** Human macrophages were revealed with a monoclonal anti-human Mac-387 antibody ($\times 40$). **(E):** CEA identified granulopoiesis in human bone marrow ($\times 100$). **(F):** The absence of CEA in the graft excluded the presence of granulopoiesis ($\times 40$). Results are representative of three independent experiments. Abbreviations: adip, adiponectin; CEA, chloroacetate esterase activity; FLFC, fibroblast-like fat cells; NGS, normal goat serum.

RESULTS

Fibroblast-Like Fat Cells as an Experimental Model to Investigate Adipocyte-Myelo-Monocytic Interactions in Femoral Bone Marrow

It was previously shown that relative to iliac crest BM, the femoral counterpart is enriched in adipocytes, and the incidence of hematopoietic cells is accordingly decreased. This observation raised the question of whether adipocytes exerted a negative control on differentiation from CD34⁺ progenitors. To address this issue, we used adipocytes isolated from femoral BM using the ceiling method [29, 30]. The cells obtained in these conditions exhibited cytological features of fibroblasts (Fig. 1Aa–1Ac). They had lost their big oil droplet but still contained small lipid droplets stained by Oil Red O (Fig. 1Ac) and could return to the unilocular stage in adipogenic medium (data not shown). To further investigate the similarity between FLFCs and freshly isolated adipocytes, we compared the expression profile of typical lineage-specific genes in both cell types, in the absence of exogenous factors, either alone or together with CD34⁺ cells, which are normally present in the microenvironment. The phenotype of FLFCs closely resembled that of mature BM fat cells. They expressed CD36 but lacked common hematopoietic markers, such as CD34, CD14, CD45, CD68, CD3, and CD8 (data not shown). Furthermore, transcripts encoding typical adipocyte markers, such as early LPL, intermediate PP(AR γ 2), late aP2, and G3PDH, were easily detected by reverse transcription (RT)-PCR (Fig. 1B). Leptin, a very late marker of adipocyte differentiation, was present in culture supernatants, as assessed by ELISA (Fig. 1C). LPL and aP2 expression, as well as leptin production, were increased in FLFC/CD34⁺ cocultures relative to FLFCs alone (Fig. 1B, 1C). To further investigate the relationship between FLFCs and primary adi-

pocytes, we analyzed the expression of Pref-1/dlk, a membrane protein regarded as a preadipocyte marker, because it has been shown to be downregulated during *in vitro* terminal differentiation [34].

In contrast to *in vitro*-differentiated adipocyte cell lines [34], BM adipocytes *in situ* (Fig. 1D), freshly isolated BM adipocytes (Fig. 1Ea), and FLFCs were positive for Pref-1/dlk1 (Fig. 1Eb), whereas mesenchymal stem cells and the human BM stromal cell line HS5 were negative (Fig. 1Ec, 1Ed). Finally, FLFCs were also positive for NP-1, as were bone marrow adipocytes [18] (Fig. 1Ad).

To confirm that FLFCs and primary adipocytes were similar in terms of their potential role in hematopoiesis, we cotransplanted FLFCs and CD34⁺ progenitors under the kidney capsules of 16 NOD/SCID mice. In these conditions, FLFCs recovered their adipocyte morphology (Fig. 2A) and were stained positively with anti-human adiponectin antibody (Fig. 2C), whereas cells derived from CD34⁺ progenitors were positive for Mac-387 (a specific human macrophage marker) (Fig. 2D) and negative for chloroacetate esterase activity (Fig. 2F). These morphological features were similar to those observed in human femoral BM. Taken together, these findings establish FLFCs as a reliable model for investigating the effect of adipocytes on myelo-monocytic differentiation, as well as their mechanism of action.

Cell-to-Cell Contact Impairs Granulopoiesis Through Suppression of G-CSF Production

FLFCs, as expected, induced the differentiation of CD34⁺ cells into macrophages in cell-to-cell contact and in transwell culture conditions, whereas terminal granulocytic differentiation failed to occur in cell-to-cell contact conditions wherein MGG staining revealed the presence of immature pregranulocytes in addition to macrophages (Fig. 3A). Contrasting with positive controls (skin fibroblasts and MDSCs), G-CSF was detected neither on transcriptional nor on protein levels, whether FLFCs were cultured alone or together with CD34⁺ cells (Fig. 3B, 3C), whereas

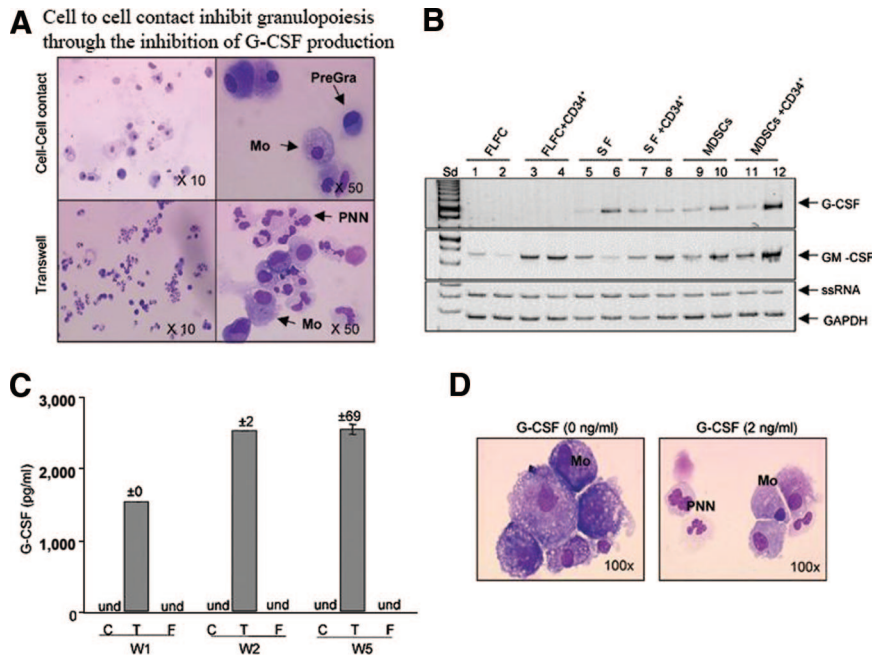


Figure 3. Cell-to-cell contact impaired granulopoiesis through the inhibition of G-CSF production. (A): Mo, PreGra, and segmented PNN were identified by May-Grünwald-Giemsa (MGG) FLFC/CD34⁺ C and T (magnification, ×10 and ×50). (B): G-CSF and GM-CSF mRNA expression was analyzed by reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR) in FLFC, SF, and MDSC cultured alone for 1 W (lanes 1, 5, and 9, respectively) and 5 W (lanes 2, 6, and 10, respectively) or cocultured with CD34⁺ for 1 W (lanes 3, 7, and 11, respectively) and 5 W (lanes 4, 8, and 12, respectively). GAPDH (housekeeping gene) and ssRNA were used to validate the RT-PCR. (C): The presence of G-CSF in the supernatant of FLFC/CD34⁺ in T, C, and F was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay after 1, 3, and 5 W of culture. (D): Mo and PNN were identified by MGG staining of FLFC/CD34⁺ C with or without G-CSF (magnification, ×100). Data shown in each panel are representative of three independent experiments. Abbreviations: C, cocultures in cell-to-cell contact conditions; F, cultures of fibroblast-like fat cells alone; FLFC, fibroblast-like fat cells; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; G-CSF, granulocyte-colony stimulating factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; MDSC, marrow-derived stromal cells; Mo, macrophages; PNN, polynuclear neutrophil; PreGra, granulocyte precursors; Sd, standard deviation; SF, skin fibroblasts; ssRNA, synthetic standard RNA; T, cocultures in transwell; und, undetectable; W, week.

GM-CSF mRNAs were present in all the culture conditions. In transwell assays, CD34⁺ cells differentiated into mature PNN and G-CSF was produced (Fig. 3A, 3C), suggesting that the cell-to-cell contact inhibited full PNN maturation through an inhibition of G-CSF production. This conclusion was confirmed by setting up cell-to-cell contact cultures in the presence of exogenous G-CSF, which led to the differentiation of PNN (Fig. 3D).

FLFCs Inhibit G-CSF Production by Macrophages That Sustain PNN Maturation

Immunostaining with anti-G-CSF monoclonal antibody (mAb) in transwell cocultures revealed that the producer cells were macrophages (Fig. 4A), which did indeed support the maturation of PreGra into PNN on their own (Fig. 4Bb), whereas granulopoiesis was inhibited when FLFCs were added (Fig. 4Bc). The absolute number of segmented PNN among 100 cells counted per field decreased significantly in FLFC/Mo/PreGra cocultures versus Mo/PreGra cocultures (13 ± 5 and 39 ± 7 , respectively; $p < .05$; $n = 3$) (Fig. 4C). As expected, the addition of FLFCs to Mo and PreGra in transwell cultures did not impair granulopoiesis (data not shown). This observation was consistent with the conclusion that FLFCs could inhibit G-CSF production only when they were in contact with Mo (Fig. 4D).

Expression of NP-1 Is Increased in FLFC/CD34⁺ Cocultures, and Its Neutralization Restores G-CSF Production and PNN Differentiation

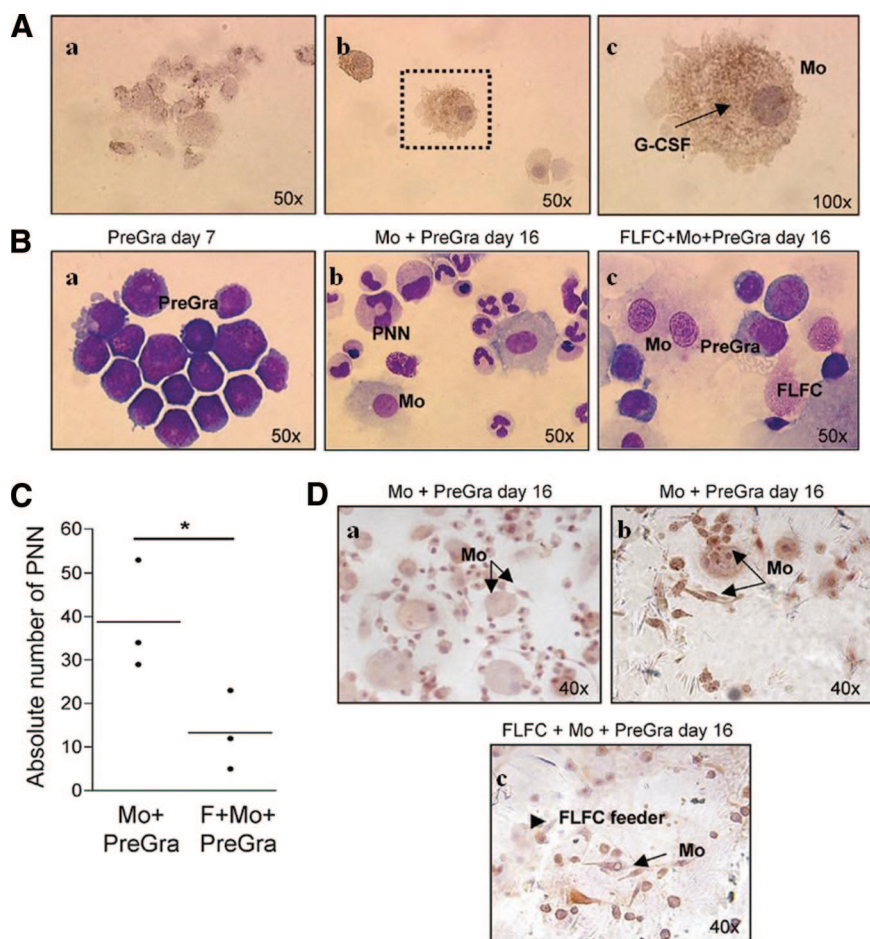
The high expression of NP-1 in fatty bone marrow [18], together with its putative role in hematopoietic-stromal cell interactions

[25], led us to investigate the effect of neutralizing NP-1 mAb on granulocytic differentiation. Using RT-PCR analysis, we established that FLFCs alone expressed detectable amounts of NP-1 mRNA (0.177 ± 0.001 arbitrary units [A.U.]), which were significantly increased (0.308 ± 0.029 A.U.; $p < .05$) in FLFC/CD34⁺ cocultures (Fig. 5A). These results were confirmed on protein levels (Fig. 5B). Addition of neutralizing anti-NP-1 mAb at concentrations ranging from 10 to 20 $\mu\text{g/ml}$, which inhibit axon guidance in neuronal cells, restored PNN differentiation in cocultures with cell-to-cell contact (Fig. 5C). G-CSF production was likewise restored in these conditions and increased dose-dependently (Fig. 5D).

Similar results were obtained when neutralizing anti-NP-1 mAb was added to Mo/PreGra/FLFC cocultures (Fig. 5E), with a significant increase in segmented PNN cell counts versus controls (21 ± 6 and 11 ± 1 , respectively; $p = 0.0017$; $n = 3$) (Fig. 5F) and G-CSF production (Fig. 5G). NP-1 inhibitory antibodies had no effect on granulocytic differentiation either in FLFC/PreGra cocultures (no restoration of granulocytic differentiation) or in Mo/PreGra cocultures (no further increase of granulocytic differentiation) (data not shown). Taken together, these experiments show that the inhibitory effect of FLFCs on granulopoiesis induced by Mo is specifically mediated through NP-1.

IL-1 β and Dexamethasone Modulate FLFC Properties to Restore Granulopoiesis

In some inflammatory conditions and during corticosteroid treatment, the number of circulating PNNs is increased in peripheral blood. We set out to investigate the mechanisms of this process, which remain largely unknown, by evaluating whether



elevated levels of inflammatory cytokines such as IL-1 β and corticosteroids can modulate the properties of adipocytes, namely their capacity to inhibit granulopoiesis. In the first set of experiments, we found that IL-1 β stimulated FLFCs to produce G-CSF on both transcriptional and protein levels (Fig. 6Aa, 6Ab). A full PNN maturation occurred when CD34⁺ cells and FLFCs were cocultured with IL-1 β in conditions allowing cell-to-cell contact (Fig. 6Ac). Nevertheless, the recovery of G-CSF production in transwell chamber assays did not depend on IL-1 β , which was detected in neither FLFC nor FLFC/CD34⁺ cocultures (Fig. 6Ad). In the second set of experiments, we used dexamethasone, which increased intracellular G-CSF expression and downregulated NP-1 expression in FLFC and Mo cocultures (Fig. 6B). These experiments support the notion that BM adipocytes may contribute to the control of granulopoiesis in pathological situations, suggesting that increased PNN counts after corticosteroid therapy may be, at least in part, the consequence of NP-1 downregulation.

DISCUSSION

In femoral fatty BM, the stroma is composed mainly of adipocytes [35–37], whereas HCs are poorly represented, except for CD68⁺ Mos, which surround fat cells. The predominance of Mo in this tissue could be the consequence of their recruitment as mature cells, as described in other adipose tissues^{38–40} and/or of the differentiation of hematopoietic progenitors under the influence of cytokines produced by adipocytes [16]. We hypothesized that

these two populations could interact to decrease granulopoiesis, and herein, we provide evidence in support of this hypothesis.

Before setting out on this study based on the use of FLFCs derived from adipocytes isolated from the bone marrow, we made sure of their physiological relevance according to phenotypic and functional criteria. First, we established that FLFCs express the majority of intermediate, late, and very late markers of adipogenic differentiation [41, 42], such as LPL [43, 44], PPAR γ 2 [45–47], G3PDH [48], aP2 [49], CD36 [50, 51], adiponectin [52], and leptin [53, 54]. Second, we assessed the expression of Pref-1/dlk-1 by FLFCs, a marker shared with primary adipocytes, which is not displayed by in vitro-differentiated adipocytes from 3T3 cells [34], and other stromal cell lines, including MSC and HS5. Third, we confirmed that FLFCs expressed NP-1, as previously reported for femoral BM adipocytes [18]. Finally and most importantly, we found that FLFCs adopted the morphology of adipocytes in vivo and supported the differentiation of CD34⁺ progenitor cells into Mos. For all these reasons, we consider FLFCs a relevant model allowing the investigation of the influence of adipocytes on hematopoietic cell differentiation in vitro.

Cocultures of CD34⁺ progenitor cells and FLFCs set up in cell-to-cell contact or transwell conditions gave rise to Mos. FLFCs constitutively produced cytokines involved in Mo differentiation, such as GM-CSF and M-CSF (data not shown). This pattern of cytokine production is a general property of adipocytes regardless of their location, since it has also been described in adipocytes from mammary tissue [52, 55] and in BM-MSK [56].

Figure 4. FLFCs impaired the production of G-CSF by Mo and inhibited pregranulocyte differentiation induced by Mo by a mechanism dependent on cell-to-cell contact. **(A):** G-CSF was detected by immunostaining of FLFCs/CD34⁺ cocultures in transwell conditions (**Ab, Ac**) (original magnification, $\times 100$); negative control used only the second-step antiserum (**Aa**) (original magnification, $\times 50$). **(B):** PNN differentiation was evaluated morphologically on cytopins stained with May-Grünwald-Giemsa. **(Ba):** Immature granulocyte precursors obtained by stimulation of CD34⁺ progenitors with stem cell factor (50 ng/ml), interleukin-3 (10 ng/ml), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (5 ng/ml), and G-CSF (10 ng/ml) for 7 days. **(Bb):** Coculture of immature granulocyte precursors with Mo after 9 days (day 16 from the beginning of experiments) in the absence of exogenous cytokines. **(Bc):** Coculture of immature granulocytes precursors with Mo and FLFC after 9 days. **(C):** The absolute number of PNN was evaluated in pregranulocyte/Mo cocultures in the absence or in the presence of FLFC. (Results are expressed as mean \pm SD from three independent experiments; $p < .05$.) **(D):** G-CSF expression detected by immunostaining of adherent cell from Mo and pregranulocyte cocultures with or without FLFCs. **(Da):** Negative control. **(Db, Dc):** Positive staining on cocultures of Mo and pregranulocytes without **(Db)** and with **(Dc)** FLFCs (original magnification, $\times 40$). Abbreviations: F, cultures of fibroblast-like fat cells alone, FLFC, fibroblast-like fat cells; G-CSF, granulocyte-colony stimulating factor; Mo, macrophages; PNN, polynuclear neutrophils; PreGra, granulocyte precursors.

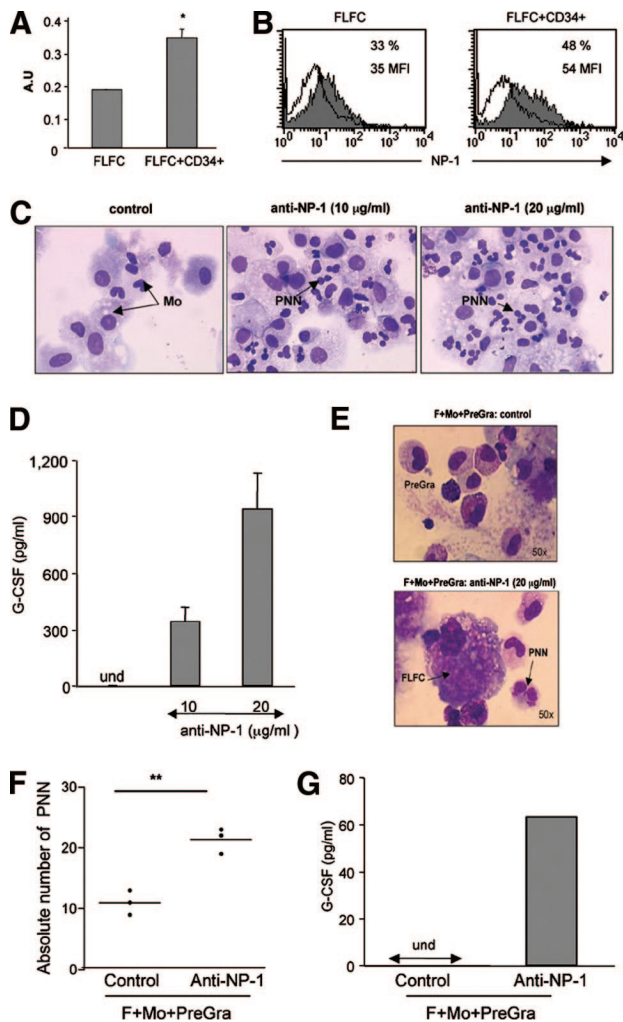


Figure 5. Neutralization of NP-1 induced G-CSF production in FLFC/CD34⁺ and FLFC/Mo cocultures and induced PNN differentiation in FLFC/CD34⁺ and FLFC/PreGra cocultures. (A): NP-1 mRNA expression increased in FLFC/CD34⁺ cocultures. mRNA levels are expressed in A.U. as a ratio between NP-1 polymerase chain reaction product intensity and 28S housekeeping gene after revelation on polyacrylamide gel and quantification by PhosphorImager (GE Healthcare, Little Chalfont, U.K., <http://www.gehealthcare.com>) and Molecular Analyst software (Bio-Rad, Hercules, CA, <http://www.bio-rad.com>). (B): NP-1 expression was analyzed by flow cytometry after immunostaining in FLFC cultured alone or with CD34⁺ cells. Values represent the mean percentage of all assessed cells positively stained and the MFI. (C): Mo and PNN were identified by May-Grünwald-Giemsa (MGG) staining of FLFCs/CD34⁺ cocultures in the absence (control) and in the presence of neutralizing NP-1 antibody. (D): The production of G-CSF was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the same culture conditions (the results are expressed as mean \pm SD from three independent experiments). (E): Mo, PreGra, and PNN were identified by MGG staining in cocultures of FLFCs, Mo, and PreGra without (control) or with anti-NP-1 neutralizing antibody (magnification, $\times 50$). (F): The absolute number of PNN was evaluated in the same culture conditions (results are expressed as mean from three independent experiments; $p < .05$). (G): The production of G-CSF was assessed by ELISA in the same culture conditions. Abbreviations: A.U., arbitrary units; F, cultures of fibroblast-like fat cells alone, FLFC, fibroblast-like fat cells; G-CSF, granulocyte-colony stimulating factor; MFI, mean fluorescence intensity; Mo, macrophages; NP-1, neuropilin-1; PNN, polynuclear neutrophil; PreGra, granulocyte precursors; und, undetectable.

Transwell chamber experiments showed that contact between FLFCs and CD34⁺ was not critical for Mo differentiation but prevented the generation of mature granulocytes and the

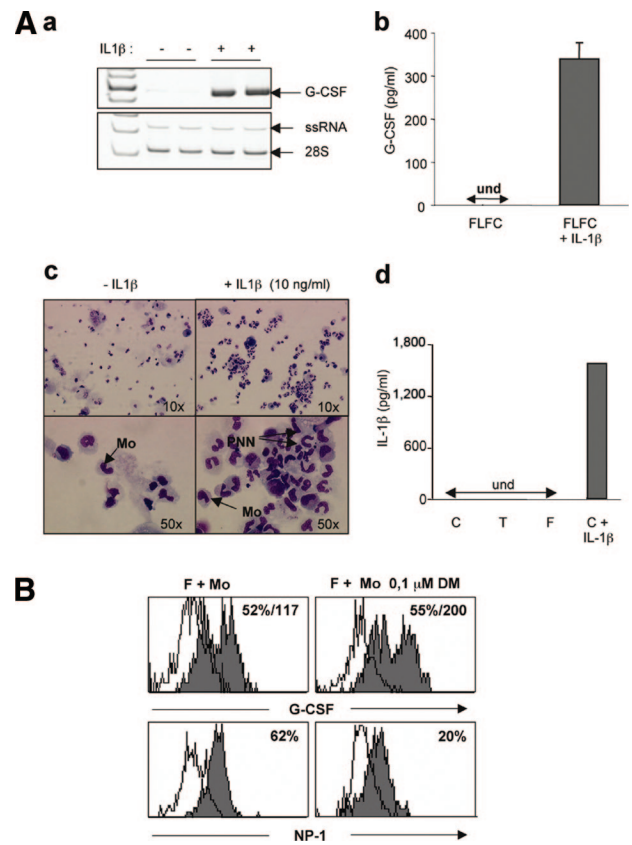


Figure 6. IL-1 β and DM modulate FLFC properties. (Aa): G-CSF expression analyzed by reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR) in FLFCs stimulated (+) or not (-) by IL-1 β . Samples were analyzed in duplicate. 28S (housekeeping gene) and ssRNA were used to validate the RT-PCR. (Ab): G-CSF production was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the same culture conditions (results are expressed as mean \pm SD of three samples). (Ac): Mo and PNN were identified by May-Grünwald-Giemsa in cell-to-cell contact conditions in the absence and in the presence of IL-1 β (magnification, $\times 10$ and $\times 50$, as indicated). (Ad): IL-1 β production was assessed by ELISA in FLFC/CD34⁺ C, T, and F alone; C + IL-1 β represents a positive control (IL-1 β was added in an FLFC/CD34⁺ coculture). (B): Intracellular G-CSF and NP-1 expression was analyzed by flow cytometry after immunostaining of FLFC/Mo cocultures treated with 0.1 μ M DM. Values represent the mean percentage of all assessed cells positively stained and the mean fluorescence intensity. Abbreviations: C, cocultures in cell-to-cell contact conditions; DM, dexamethasone; F, cultures of fibroblast-like fat cells alone, FLFC, fibroblast-like fat cells; G-CSF, granulocyte-colony stimulating factor; IL, interleukin; Mo, macrophages; NP-1, neuropilin-1; PNN, polynuclear neutrophil; T, cocultures in transwell; und, undetectable.

production G-CSF. This observation was in agreement with our previous data on the MS5 cell line, which lost its capacity to sustain granulopoiesis after differentiation into adipocytes [31]. GM-CSF was constitutively expressed by FLFCs but increased in cocultures with CD34⁺ progenitors, which is probably the reason why a few immature granulocytes differentiate in culture [57, 58]. This growth factor has also been demonstrated in freshly isolated BM adipocytes (data not shown), as well as in BM preadipocytes [59]. By contrast, G-CSF was not detected in cocultures with cell-to-cell contact, but it restored granulopoiesis when added exogenously. It has been reported previously that adipocytes differentiated in vitro either from bone marrow MSC [60] or from subcutaneous adipose tissue stroma-vascular fraction cells (SVF) [61] support the generation of mature granulocytes from immature precursors, even though G-CSF production

was assessed only in SVF cultures. According to another study, G-CSF production by MSC was downregulated after adipocyte differentiation [56]. These apparent discrepancies may be explained by the distinct cellular origins [62] and/or culture conditions in which adipocytes are differentiated.

To our knowledge, this is the first study using primary BM adipocytes in coculture with CD34⁺ to assess the effect of adipocytes on hematopoiesis and the inhibition of G-CSF production through cell-to-cell contact. We postulated that NP-1 could be implicated in this inhibition because (a) NP-1 is differentially expressed in hematopoietic iliac crest BM (rich in HCs and NP-1^{low}) and femoral BM (poor in HCs and NP-1^{high}) [18]; (b) the expression of NP-1 increased in FLFCs and CD34⁺ cocultures; (c) the role of NP-1 in the modulation of cytokine production, including TPO and Flt-3 ligand, by stromal cells has been reported before [25]; and (d) NP-1 plays a role in various cell-to-cell contact conditions [23].

Blocking NP1 by its specific antibody could indeed restore G-CSF production and granulopoiesis. Interestingly, mature PNNs counts were not increased in either Mo/PreGra or in FLFCs/PreGra cocultures after NP-1 inhibition (data not shown).

This observation led us to conclude that NP-1 is involved in interactions between macrophages and FLFCs. It has already been reported that NP-1 participated in the interactions between the murine MS5 cell line and primitive hematopoietic cells [25]. However, the mechanisms accounting for the inhibition of G-CSF production by Mos by NP1 in the presence of FLFCs remained obscure. The lack of expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1) and VEGFR2 in FLFCs and Mo in this system of culture argues against a role of VEGF (data not shown). Sema 3A, another ligand of NP-1, was expressed in all culture conditions (FLFCs and MDSCs alone or cocultured with CD34⁺), ruling out its implication in the inhibition of G-CSF production. Therefore, as suggested by other investigators, NP-1 may target other signaling receptors or establish homotypic interactions [63–65].

CONCLUSION

Our results support the notion that adipocytes are active members of the BM microenvironment playing a critical role in the regulation of hematopoiesis. It is tempting to speculate that they regulate the balance between the production of Mo and granulocytes, facilitating increased production of granulocytes in pathological conditions. Therefore, a deregulation of adipocytes functions and/or numbers may result in hematological, inflammatory, or immunological disorders. In agreement with this

hypothesis, IL-1, a proinflammatory cytokine, induces G-CSF production and PNN maturation in cocultures between CD34⁺ progenitors and FLFCs in cell-to-cell contact conditions. Thus, the increased granulocyte counts in some inflammatory diseases could be explained by an effect of IL-1 on the adipocyte function. Furthermore, dexamethasone, a corticosteroid known to induce increased polynuclear neutrophil numbers, downregulates NP-1 in FLFC/Mo cocultures similarly to what has already been reported in MS5 cell line, and this downregulation could account for the elevated PNN numbers in patients treated with dexamethasone.

Targeting BM adipocytes could be useful in some BM failure syndromes in which adipocytes should no longer be viewed as cells occupying the space left empty by hematopoietic cells but as active elements in the physiopathological process. Further work, however, is necessary to understand the molecular mechanisms involved in NP-1-induced inhibition of G-CSF production by Mo, which may help to define new therapeutic strategies in some neutropenia of undetermined origin.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Fond de la Recherche Scientifique-Fonds National de la Recherche Scientifique (FRS-FNRS), the Fédération Belge Contre le Cancer, Cancéropole, la Ligue Nationale contre le Cancer, Association pour la Recherche sur le Cancer, Institut National du Cancer, la Fondation pour la Recherche Médicale, la Fondation de France, and the Commissariat Général aux Relations Internationales (Tournesol). Z.B.-C., G.P., and A.Be. are Télévie (FNRS) fellows. Y.L. is supported by a grant from la Ligue Nationale contre le Cancer. Excellent technical assistance was provided by M.J. Nix, D. Delneuve, A. Heyeres, and E. Frantzen. We thank Dr. A. Rodrigues and P. Gillet for performing the surgery and providing biopsies. We thank also J. Cadranet, C.M. Lapière, Dr. A. Colige, Dr. A. Kolodkin, and Dr. D. Ginty (Johns Hopkins University) for gifts and expertise. Z.B.-C. and Y.L. contributed equally to this work. M.P.D., O.H., and B.V.N. codirected this work.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors indicate no potential conflicts of interest.

REFERENCES

- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S et al. Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology, and potential applications. *STEM CELLS* 2001; 19:180–192.
- Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993;81:2844–2853.
- Heyworth CM, Whetton AD, Nicholls S et al. Stem cell factor directly stimulates the development of enriched granulocyte-macrophage colony-forming cells and promotes the effects of other colony-stimulating factors. *Blood* 1992;80:2230–2236.
- Aglietta M, Pasquino P, Sanavio F et al. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin 3: Target cells and kinetics of response in vivo. *STEM CELLS* 1993;11(suppl 2):83–87.
- Jacobsen K, Kravitz J, Kincade PW et al. Adhesion receptors on bone marrow stromal cells: In vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and gamma-irradiated mice. *Blood* 1996;87:73–82.
- Metcalfe D. The molecular control of proliferation and differentiation in hemopoietic cells. *C R Acad Sci III* 1993;316:860–870.
- Nakamura K, Kosaka M, Mizuguchi T et al. Effect of erythroid differentiation factor on maintenance of human hematopoietic cells in cocultures with allogenic stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;194:1103–1110.
- Raffi S, Avezilla S, Shmelkov S et al. Angiogenic factors reconstitute hematopoiesis by recruiting stem cells from bone marrow microenvironment. *Ann N Y Acad Sci* 2003;996:49–60.
- Kume K, Satomura K, Nishisho S et al. Potential role of leptin in endochondral ossification. *J Histochem Cytochem* 2002;50:159–169.
- Hattori H, Ishihara M, Fukuda T et al. Establishment of a novel method for enriching osteoblast progenitors from adipose tissues using a difference in cell adhesive properties. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343:1118–1123.
- Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2548–2556.
- Gregoire FM. Adipocyte differentiation: From fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med* (Maywood) 2001;226:997–1002.

- 13 Baratta M. Leptin—From a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues. *Med Sci Monit* 2002;8:RA282–RA292.
- 14 Fukumura D, Ushiyama A, Duda DG et al. Paracrine regulation of angiogenesis and adipocyte differentiation during in vivo adipogenesis. *Circ Res* 2003;93:e88–e97.
- 15 Hattori K, Sumi T, Yasui T et al. VEGF mRNA in adipocytes increase with rebound weight-gain after diet-restriction. *Int J Mol Med* 2004;13:395–399.
- 16 Frühbeck G, Gomez-Ambrosi J. Modulation of the leptin-induced white adipose tissue lipolysis by nitric oxide. *Cell Signal* 2001;13:827–833.
- 17 Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α , in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:4196–4200.
- 18 Belaid Z, Hubint F, Humblet C et al. Differential expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic and fatty bone marrow: Evidence that neuropilin-1 is produced by fat cells. *Haematologica* 2005;90:400–401.
- 19 He Z, Tessier-Lavigne M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 1997;90:739–751.
- 20 Soker S, Takashima S, Miao HQ et al. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998;92:735–745.
- 21 Kolodkin AL, Levengood DV, Rowe EG et al. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 1997;90:753–762.
- 22 Neufeld G, Cohen T, Shraga N et al. The neuropilins: Multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2002;12:13–19.
- 23 Tordjman R, Lepelletier Y, Lemarchandel V et al. A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat Immunol* 2002;3:477–482.
- 24 Lepelletier Y, Smaniotto S, Hadj-Slimane R et al. Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:5545–5550.
- 25 Tordjman R, Ortega N, Coulombel L et al. Neuropilin-1 is expressed on bone marrow stromal cells: A novel interaction with hematopoietic cells? *Blood* 1999;94:2301–2309.
- 26 Lieschke GJ, Graill D, Hodgson G et al. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* 1994;84:1737–1746.
- 27 Liu F, Wu HY, Wesselschmidt R et al. Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. *Immunity* 1996;5:491–501.
- 28 Nicola NA, Metcalf D, Johnson GR et al. Separation of functionally distinct human granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* 1979;54:614–627.
- 29 Sugihara H, Yonemitsu N, Miyabara S et al. Proliferation of unilocular fat cells in the primary culture. *J Lipid Res* 1987;28:1038–1045.
- 30 Sugihara H, Yonemitsu N, Miyabara S et al. Primary cultures of unilocular fat cells: Characteristics of growth in vitro and changes in differentiation properties. *Differentiation* 1986;31:42–49.
- 31 Hubin F, Humblet C, Belaid Z et al. Murine bone marrow stromal cells sustain in vivo the survival of hematopoietic stem cells and the granulopoietic differentiation of more mature progenitors. *STEM CELLS* 2005;23:1626–1633.
- 32 Oh H, Takagi H, Otani A et al. Selective induction of neuropilin-1 by vascular endothelial growth factor (VEGF): A mechanism contributing to VEGF-induced angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:383–388.
- 33 Matthies AM, Low QE, Lingen MW et al. Neuropilin-1 participates in wound angiogenesis. *Am J Pathol* 2002;160:289–296.
- 34 Smas CM, Sul HS. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* 1993;73:725–734.
- 35 Gimble JM, Robinson CE, Wu X et al. The function of adipocytes in the bone marrow stroma: An update. *Bone* 1996;19:421–428.
- 36 Tavassoli M, Crosby WH. Bone marrow histogenesis: A comparison of fatty and red marrow. *Science* 1970;169:291–293.
- 37 Tavassoli M. Fatty involution of marrow and the role of adipose tissue in hemopoiesis. In: Tavassoli M, ed. *Handbook of the Hemopoietic Microenvironment*. Clifton, NJ: Humana Press, 1989;157–187.
- 38 Cancellor R, Henegar C, Viguerie N et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 2005;54:2277–2286.
- 39 Kanda H, Tateya S, Tamori Y et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 2006;116:1494–1505.
- 40 Bornstein SR, Abu-Asab M, Glasow A et al. Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes* 2000;49:532–538.
- 41 Urs S, Smith C, Campbell B et al. Gene expression profiling in human preadipocytes and adipocytes by microarray analysis. *J Nutr* 2004;134:762–770.
- 42 Hung SC, Chang CF, Ma HL et al. Gene expression profiles of early adipogenesis in human mesenchymal stem cells. *Gene* 2004;340:141–150.
- 43 Ruge T, Sukonina V, Myrnas T et al. Lipoprotein lipase activity/mass ratio is higher in omental than in subcutaneous adipose tissue. *Eur J Clin Invest* 2006;36:16–21.
- 44 Schilling T, Noth U, Klein-Hitpass L et al. Plasticity in adipogenesis and osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol* 2007;271:1–17.
- 45 Spiegelman BM, Hu E, Kim JB et al. PPAR gamma and the control of adipogenesis. *Biochimie* 1997;79:111–112.
- 46 Gurnell M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the regulation of adipocyte function: Lessons from human genetic studies. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005;19:501–523.
- 47 Hummasti S, Tontonoz P. The peroxisome proliferator-activated receptor N-terminal domain controls isotype-selective gene expression and adipogenesis. *Mol Endocrinol* 2006;20:1261–1275.
- 48 MacDougald OA, Lane MD. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Ann Rev Biochem* 1995;64:345–373.
- 49 Mackay DL, Tesar PJ, Liang LN et al. Characterizing medullary and human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *J Cell Physiol* 2006;207:722–728.
- 50 Ibrahim A, Abumrad NA. Role of CD36 in membrane transport of long-chain fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5:139–145.
- 51 Rodrigue-Way A, Demers A, Ong H et al. A growth hormone-releasing peptide promotes mitochondrial biogenesis and a fat burning-like phenotype through scavenger receptor CD36 in white adipocytes. *Endocrinology* 2007;148:1009–1018.
- 52 Sell H, Dietze-Schroeder D, Eckardt K et al. Cytokine secretion by human adipocytes is differentially regulated by adiponectin, AICAR, and troglitazone. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;343:700–706.
- 53 Hwang CS, Loftus TM, Mandrup S, et al. Adipocyte differentiation and leptin expression. *Annual review of cell and developmental biology*. 1997;13:231–259.
- 54 Zhang F, Chen Y, Heiman M et al. Leptin: Structure, function and biology. *Vitam Horm* 2005;71:345–372.
- 55 Levine JA, Jensen MD, Eberhardt NL et al. Adipocyte macrophage colony-stimulating factor is a mediator of adipose tissue growth. *J Clin Invest* 1998;101:1557–1564.
- 56 Kim DH, Yoo KH, Choi KS et al. Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell. *Cytokine* 2005;31:119–126.
- 57 Bonnier S, Campos L, Froehlich C et al. Modification of in vitro hematopoiesis induced by addition of GM-CSF in long term normal human bone marrow cultures [in French]. *Pathol Biol (Paris)* 1991;39:271–276.
- 58 Lee MY, Fukunaga R, Lee TJ et al. Bone modulation in sustained hematopoietic stimulation in mice. *Blood* 1991;77:2135–2141.
- 59 Aoki S, Toda S, Ando T et al. Bone marrow stromal cells, preadipocytes, and dermal fibroblasts promote epidermal regeneration in their distinctive fashions. *Mol Biol Cell* 2004;15:4647–4657.
- 60 Corre J, Planat-Benard V, Corberand JX et al. Human bone marrow adipocytes support complete myeloid and lymphoid differentiation from human CD34 cells. *Br J Haematol* 2004;127:344–347.
- 61 Corre J, Barreau C, Cousin B et al. Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors. *J Cell Physiol* 2006;208:282–288.
- 62 Zhou X, Li D, Yin J et al. CLA differentially regulates adipogenesis in stromal vascular cells from porcine subcutaneous adipose and skeletal muscle. *J Lipid Res*. 2007;48:1701–1709.
- 63 Bachelder RE, Crago A, Chung J et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res* 2001;61:5736–5740.
- 64 Bachelder RE, Lipscomb EA, Lin X et al. Competing autocrine pathways involving alternative neuropilin-1 ligands regulate chemotaxis of carcinoma cells. *Cancer Res* 2003;63:5230–5233.
- 65 Murga M, Fernandez-Capetillo O, Tosato G. Neuropilin-1 regulates attachment in human endothelial cells independently of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Blood* 2005;105:1992–1999.

**Human Bone Marrow Adipocytes Block Granulopoiesis Through
Neuropilin-1-Induced Granulocyte Colony-Stimulating Factor Inhibition**

Zakia Belaid-Choucair, Yves Lepelletier, Géraldine Poncin, Albert Thiry, Chantal Humblet, Mustapha Maachi, Aurore Beaulieu, Elke Schneider, Alexandra Briquet, Pierre Mineur, Charles Lambert, Daniella Mendes-Da-Cruz, Marie Louise Ahui, Vahid Asnafi, Michel Dy, Jacques Boniver, Betty V. Nusgens, Olivier Hermine and Marie Paule Defresne

Stem Cells 2008;26;1556-1564; originally published online Apr 3, 2008;
DOI: 10.1634/stemcells.2008-0068

This information is current as of August 8, 2008

**Updated Information
& Services**

including high-resolution figures, can be found at:
<http://www.StemCells.com/cgi/content/full/26/6/1556>

 **AlphaMed Press**

Hedgehog signaling pathway is inactive in colorectal cancer cell lines

Guillaume Chatel, Corine Ganef, Naima Boussif, Laurence Delacroix, Alexandra Briquet, Gregory Nolens and Rosita Winkler*

Molecular Oncology Laboratory, Experimental Cancer Research Center, Center of Biomedical Integrative Genoproteomics, University of Liège, Liège, Belgium

The Hedgehog (Hh) signaling pathway plays an important role in human development. Abnormal activation of this pathway has been observed in several types of human cancers, such as the upper gastro-intestinal tract cancers. However, activation of the Hh pathway in colorectal cancers is controversial. We analyzed the expression of the main key members of the Hh pathway in 7 colon cancer cell lines in order to discover whether the pathway is constitutively active in these cells. We estimated the expression of *SHH*, *IHH*, *PTCH*, *SMO*, *GLI1*, *GLI2*, *GLI3*, *SUFU* and *HHIP* genes by RT-PCR. Moreover, Hh ligand, Gli3 and Sufu protein levels were quantified by western blotting. None of the cell lines expressed the complete set of Hh pathway members. The ligands were absent from Colo320 and HCT116 cells, Smo from Colo205, HT29 and WiDr. *GLI1* gene was not expressed in SW480 cells nor were *GLI2/GLI3* in Colo205 or Caco-2 cells. Furthermore the repressive form of Gli3, characteristic of an inactive pathway, was detected in SW480 and Colo320 cells. Finally treatment of colon cancer cells with cyclopamine, a specific inhibitor of the Hh pathway, did not downregulate *PTCH* and *GLI1* genes expression in the colorectal cells, whereas it did so in PANC1 control cells. Taken together, these results indicate that the aberrant activation of the Hh signaling pathway is not common in colorectal cancer cell lines.

© 2007 Wiley-Liss, Inc.

Key words: colon cancer; hedgehog; cyclopamine

The Hedgehog (Hh) signaling pathway is involved in the patterning of various tissues in many species.¹ The details of Hh pathway regulation are still being unravelled. Briefly, 3 vertebrate genes code for Hh ligands, Sonic- (*SHH*), Indian- (*IHH*), and Desert- (*DHH*) Hh. The ligands are processed and secreted and bind the Patched (Ptch) transmembrane receptor at the surface of responding cells. Ligand binding overcomes the repressive action of Ptch on the Smoothened (Smo) receptor and triggers the activation and nuclear translocation of Gli zinc finger transcription factors. Vertebrate cells contain 3 *GLI* genes, *GLI-1*, *-2* and *-3*. Gli2 and Gli3 proteins possess transcription activation and repression domains, while Gli1 has only an activation domain. In unstimulated cells Gli2 and Gli3 are cleaved to give rise to a repressive N-terminal form. Hh pathway activation inhibits Gli2 and Gli3 cleavage and stabilizes the full-length transcription factors that activate transcription.^{2,3} It seems likely that Gli2 and Gli3 are the initial transducers of the Hh signal, necessary for the induction of *GLI1* expression.^{4–7} Gli1 activates transcription of most of the Hh pathway target genes.^{8–10} The transmembrane protein Hhip (Hh interacting protein) binds Hh ligands and attenuates the signal.^{11,12} Recently, Sufu (suppressor of fused) was identified as the main repressor of the mammalian Hh signaling pathway.¹³ Sufu inhibits the Hh signal by binding Gli factors in the cytoplasm and the nucleus.¹⁴

The *GLI1*, *PTCH* and *HHIP* genes are pathway members and target genes, their expression being upregulated when the signal is triggered.^{11,15,16}

The Hh pathway is involved in gastro-intestinal tract development, as documented by the phenotype of mice where genes coding for Hh pathway members have been inactivated. Indeed, colon malformations have been observed in *Shh*^{-/-}, *Ihh*^{-/-}, *Gli2*^{-/-} and *Gli3*^{-/-} mice.¹⁷ Organization in crypts has been shown to be lost in the colonic epithelium of *Ihh*^{-/-} mice.^{18,19} Moreover, in a rat model, *Ihh* has been shown to restrict the activity of the WNT/

β-catenin pathway to cells located at the base of the crypts and thus maintain the differentiation of colonocytes at the tip of the crypts.¹⁹

The Hh pathway is constitutively activated in some types of human cancers.²⁰ Loss of function mutations of *PTCH* or *SUFU* genes, and gain of function mutations of *SMO* gene have been shown to be responsible for ligand independent activation of the pathway in basal cell carcinoma, medulloblastoma, or rhabdomyosarcoma. In most other tumor types the pathway has been shown to be activated by ligand overexpression.²¹

Several studies have aimed at understanding the role of the Hh pathway in colon cancer, but their results have been conflicting. Rare mutations of *PTCH* and *SMO* genes have been detected in this cancer type but they do not seem to affect the activity of the proteins.^{22,23} The expression of a limited number of Hh pathway members, as well as the response of colon cancer cells to treatment with the Smo inhibitor cyclopamine, did not allow to lead to a conclusion concerning the activation of the pathway in this tumor type.^{17,24}

Our first goal was thus to find out whether a thorough analysis of the expression of the members of the Hh pathway in colon cancer cells could help in coming to a conclusion on the ligand dependent activation of the pathway in colorectal cancer cell lines. So, we estimated the expression of *Shh*, *Ihh*, *Ptch*, *Smo*, *Gli1*, *Gli2* and *Gli3*, which transmit the signal. We also analysed the expression of the negative regulators *Sufu* and *Hhip*.

Seven colon cancer cell lines were included in our study. None of our cell lines expressed all the key members of the Hh pathway. We then verified whether cyclopamine modulated the expression of *PTCH* and *GLI1* genes. *Ptch* and *Gli1* transcripts levels were not significantly altered in cyclopamine treated colon cancer cells, in contrast with the cyclopamine responsive PANC cells. Our results thus suggest that Hh pathway activation is not a common event in colon cancer cell lines.

Material and methods

Cell culture

Colo205, Colo320, HT29 cell lines were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA). WiDr, Caco-2, SW480, HCT116, and 293T cells were provided by Dr V. Bours (University of Liège, Belgium). PANC-1 cells were a gift from Dr. Kiss (University of Brussels, Belgium). Colo205, Colo320 cells were grown in RPMI1640, HT29 and HCT116 in McCoy's 5A, WiDr in EMEM, SW480 in Leibovitz L-15, PANC1, and 293T in DMEM media. Culture media were supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, 1 μg/ml penicillin/streptomycin.

Grant sponsors: Fonds National pour la Recherche Scientifique, Fédération contre le cancer, Centre Anticancéreux près l'Université de Liège, FRIA (FNRS), Televie, Fondation Leon Fredericq.

*Correspondence to: Laboratory of Molecular Oncology, GIGA Research Department, University of Liège, GIGA Tower—B34, 1 Avenue de l'Hôpital, 4000 Liège, Belgium. Fax: +32-43662502.
E-mail: rwinkler@ulg.ac.be

Received 3 August 2006; Accepted after revision 12 June 2007

DOI 10.1002/ijc.22998

Published online 7 August 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

TABLE I – SEQUENCES OF THE PRIMERS USED IN THIS STUDY. THE PRIMERS WITHOUT A REFERENCE WERE DESIGNED IN THE LABORATORY

5 Gene name	Forward primer	Reverse primer	Reference
Ihh	CGGCTGACAATCACACGGAGC	GAAGCTGCCCTCTTCTAGCAG	
Shh	GACGACGGCGCCAAGAAGGT	ATGAGAATGGTGCCCTGGGC	
Ptch	CATCAACTGGAACGAGGACA	AGGGGCTTGTA AACAGCAG	
Smo	CTGGTGTGGTTGGTTGTG	TGGTCTCGTTGATCTTGCTG	
Gli1	CGGGTCTCAAACGCCCAGCTT	GGCTGGGTCCTGGCCCTC	25
Gli2	CTAGCATCAGCGAGAACGTG	AAAGCCTAACTGGCATCCTC	
Gli3	CAGATGTGACGGAGAAAGCC	GATGATAGTATTCTGTGGG	
Sufu	CCAATCAACCCTCAGCGGCAGAATG	GTAGGTGAGAAAGAGGGCTGTC	26
Hhip	AAAACAGATCATCAGCCAGAA	TAAATGCCCATTTGGAATAGAAT	
Cph	TCTCCTTTGAGCTGTTTGACAG	AAACTTAACTCTGCAATCCAGC	

Caco-2 cells were grown in EMEM supplemented with 20% FBS, 2 mM glutamine, 1 µg/ml penicillin/streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, 1.5 g/l sodium bicarbonate and 0.1 mM nonessential amino acids (Cambrex, Verviers, Belgium).

RNA extraction and semi-quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted using the Tripure reagent (Roche) according to the manufacturer's instructions. To avoid genomic DNA contamination, RNA (20 µg) was treated with 20 U RNase-free DNaseI (Roche) at 37°C for 30 min, phenol-chloroform extracted and ethanol precipitated.

Semi-quantitative RT-PCR was performed in 2 steps. First, 2 µg of total RNA were reverse transcribed (RT) with 10 U of reverse transcriptase (AMV-RT, Promega, Madison WI), 0.8 µM specific primer, 0.4 mM dNTPs (Roche), 2 U RNase inhibitor (Promega) for 1 hr at 48°C. Next, PCR amplification was performed on 1/25th of the RT reaction with 2.5 U of AmpliTaq DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, Ca), 0.2 µM of each primer, and 0.4 mM of dNTPs in a thermocycler (Perkin Elmer). Sequences of the primers used in this study are presented in Table I. Each RT-PCR product (10 µl) was analyzed by electrophoresis through a 1% agarose gel. PCR amplification signals were quantified by densitometric scanning using Quantity One (Bio-Rad).

Western blot analysis and antibodies

Cells cultured in 58 cm² Petri dishes were washed twice, collected in 1 ml of PBS and centrifuged. The cellular pellet was suspended in 400 µl of Buffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT and 0.5 mM PMSF) and incubated 15 min on ice. Cytoplasmic and nuclear proteins were extracted from cells lysed with NP40 (1% final concentration). After centrifugation, the supernatant containing mainly cytoplasmic proteins was collected. Nuclei from the pellet were lysed with Buffer C (20 mM HEPES pH7.9, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT and 1 mM PMSF). Total proteins were extracted from cells lysed with 0.5% SDS. Protein concentrations were measured using the BCA protein assay method (Pierce, Rockford, IL). Either thirty micrograms of cytoplasmic and nuclear proteins or 50 µg of total cellular proteins were analyzed by SDS-PAGE.

Secreted proteins were precipitated from conditioned media of 80% confluent cells grown in serum-free medium for 5 days. Proteins from 7 ml of conditioned media were acetone precipitated (final concentration 75%) and collected by centrifugation at 9000g for 15 min. The pellet was dissolved in 100 µl of SB buffer (SDS 0.33% (w/v), β-mercaptoethanol 0.83% (v/v), Tris 11.25 mM pH6.8, glycerol 1.66% (w/v) and bromophenol blue). Forty microliters were analysed by SDS-PAGE.

Proteins extracted from cells and conditioned media were separated on a 6% (Gli3) or 12% (Hh and Sufu) SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA). Membranes were blocked overnight in TBST buffer (Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, Tween20 0.1%) containing 5% low fat milk. They were then incubated for 2 hr with the following pri-

mary antibodies diluted in TBST buffer/5% low fat milk: 1/500 rabbit anti-Hh antibody (H-160, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca), 1/500 rabbit anti-Gli3 (H-280, Santa Cruz), 1/500 goat anti-Sufu (C-15, Santa Cruz) 1/10,000 mouse anti-actin (MP biomedical, Irvine, CA), 1/1,000 goat anti-Ku70 (Santa Cruz). Membranes were washed and incubated for 1 hr with the following secondary antibodies diluted in TBST buffer containing 5% milk: 1/2,000 goat anti-rabbit (Shh, Gli3), 1/2,000 goat anti-mouse and 1/1,000 (Sufu) or 1/4,000 (Ku70) rabbit anti-goat (DAKO, Carpinteria, CA). Signals were revealed with enhance chemiluminescence reagent (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK).

Transfection experiments

Gli3 cDNA was a kind gift from Dr B. Vogelstein. The Gli3 cDNA extracted with XbaI/SalI restriction enzymes was inserted in the XhoI/NheI sites of the pREP4 expression vector (Invitrogen, Paisley UK). Approximately 2 × 10⁶ cells were seeded in 58 cm² Petri dishes 24 hr before transfection. PREP4-Gli3 expression vector (3 µg) was transfected with Fugene6 reagent (Roche) according to the manufacturer's recommendation. Nuclear proteins were extracted 24 hr later and analyzed as described above.

Cyclopamine and tomatidine treatment

Cyclopamine and tomatidine (Toronto Research Chemicals, North York, Ontario, CA) were dissolved in DMSO. About 1 to 2 × 10⁶ cells were seeded in 21 cm² Petri dishes in medium supplemented with 10% FBS. Twenty four hours later the medium was replaced by media containing 10 µM of cyclopamine, tomatidine or DMSO in 0.5% serum. After 24 hr the culture media were changed and the cells were harvested a further 24 hr later. Total RNA was extracted as described above. RT-PCR was performed as described above except that RT priming was performed with random hexamers (3 µg).

Results

The Hh pathway is not activated ligand dependently in colon cancer cells

Firstly, we analyzed the levels of the cellular and the secreted Hh protein by western blotting. Hh proteins are synthesized as 45 kDa precursors that are cleaved to give rise to the secreted 20 kDa factor. High levels of the 20 kDa processed Hh protein were detected in the cytoplasm (Fig. 1a) and the conditioned media (Fig. 1b) of HT29, WiDr and Caco-2 cells. Low levels of the ligand were detected in the cytoplasm and the conditioned media of Colo205 and SW480 cells (Figs. 1a and 1b). No Hh proteins were detected in Colo320 and HCT116 cells (Figs. 1a and 1b). The antibody does not discriminate between the different Hh ligands. To know which factor is expressed in the colon cancer cells we identified the Hh transcripts by specific RT-PCR. We focused our interest on Ihh and Shh, which seem to be the only Hh ligands expressed in the colon. Shh mRNA was present in all the cell lines, while Ihh transcripts were only detected in HT-29, WiDr and Caco-2 cells (Fig. 1c). Interestingly, the Ihh mRNA was present in cells expressing high protein levels.

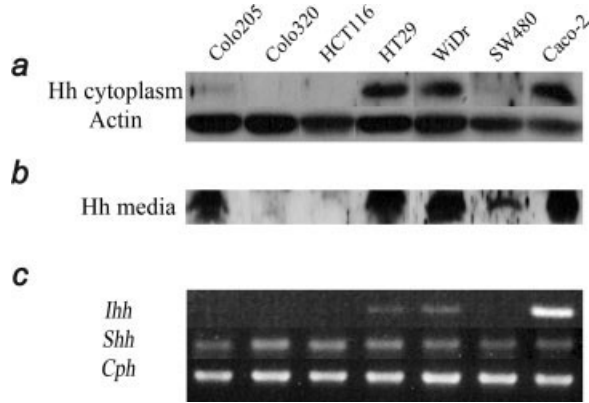


FIGURE 1 – Hh protein and mRNA levels in colorectal cancer cell lines. (a) Detection by western blotting of the 20 kDa mature Hh form in 30 μ g of cytoplasmic protein extracts. Actin was used as loading control. (b) Detection of the mature Hh proteins in conditioned media with an antibody recognizing the 3 Hh forms. (c) Detection of Ihh and Shh transcripts by RT-PCR in the colon cancer cells using primer pairs that discriminate between these Hh transcripts. Cyclophilin (Cph) mRNA was amplified as control.

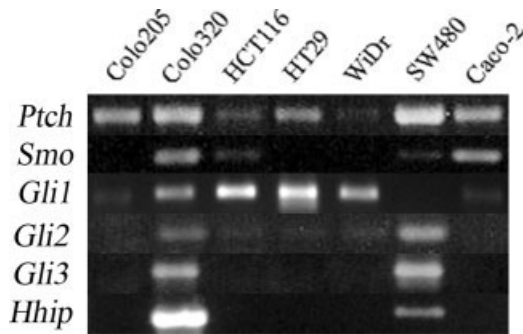


FIGURE 2 – Ptch, Smo, Gli1, Gli2, Gli3 and Hhip mRNA levels in the colorectal cancer cell lines. Two micrograms of total RNA were analyzed by RT-PCR.

According to these results the Hh pathway could be activated through an autocrine mechanism in HT29, WiDr, Caco-2, Colo205 and SW480 cells.

To find out whether the colon carcinoma cells are able to respond to the Hh factors they produce, we evaluated the expression levels of Ptch and Smo receptors, and the 3 Gli transcription factors. Ptch transcripts were detected in every cell line, while Smo mRNA was present in Colo320, HCT116, SW480 and Caco-2 cells. The pattern of the expression of the 3 Gli transcription factors varied according to the cell line. Colo320 was the only cell line expressing all 3 Gli transcription factors. A strong signal corresponding to Gli1 mRNA and a weak Gli2 signal was detected in HCT116, HT29 and WiDr cells. Both Gli2 and Gli3 were present in SW480 cells, which in contrast did not express Gli1. Finally Caco2 and Colo205 cells expressed only very low levels of Gli1 (Fig. 2).

The Hh pathway regulates differentially the activity of the 3 Gli transcription factors. Hh stimulates *GLII* gene transcription, while it inhibits the cleavage of Gli2 and Gli3 proteins. We analysed by western blotting the Gli3 protein present in our colorectal cancer cells. 293T cells transfected with a Gli3 expression vector served as positive control for this experiment. Nuclear proteins extracted from these cells were loaded on the same gel as the proteins extracted from the colon cancer cells, in order to distinguish the full length (Gli3FL) and the processed (Gli3R) Gli3. The Gli3 spe-

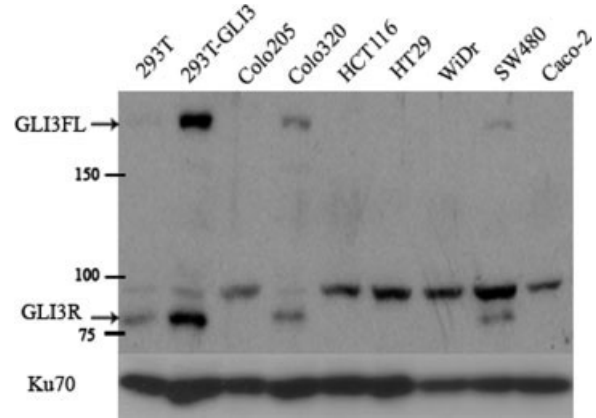


FIGURE 3 – Gli3 protein levels and cleavage status in colorectal cancer cells. Nuclear proteins (40 μ g) extracted from the colorectal cancer cells, and from parental 293T cells and 293T cells transfected with a Gli3 expression vector (293T-Gli3) were analyzed by western blotting with an antibody recognizing the N-terminal part of the protein. The antibody reveals both the 190 kDa full-length protein (Gli3FL) and the 83 kDa cleaved repressor protein (Gli3R). Arrows indicate positions of Gli3FL and Gli3R proteins. Ku70 was used as a loading control.

cific antibody revealed 3 bands of 190, 95 and 83 kDa in nuclear proteins from the parental 293T cells (Fig. 3). Only the intensity of the 190-kDa and the 83-kDa bands was greatly increased in Gli3 overexpressing 293T cells, indicating that these bands correspond respectively to Gli3FL and Gli3R. Both Gli3FL and Gli3R were detected in SW480 and Colo320 nuclear proteins, while Gli3 was not detected in the other cell lines, in agreement with the RT-PCR results.

Finally, we detected Hhip mRNA in Colo320 and SW480 cells, the only cells that also express the *GLI3* gene (Fig. 2).

These results thus suggest that no ligand dependent activation of the Hh pathway occurred in the colon cancer cells we study. Indeed, in the absence of ligands, the pathway cannot be activated in HCT116 and Colo320 cells. The absence of Smo does not allow the activation of the pathway in Colo205, HT29 and WiDr cells. The low level of Gli1 added to the absence of Gli2 and Gli3 in Caco2 cells and the absence of Gli1 from SW480 cells is a further indication that, in these cells, the pathway is probably also inactive. However, the Hh pathway could be activated downstream of the ligand, by mutations of Ptch, Smo or Sufu or by Smo activation through endogenous molecules. We tested the possibility of ligand independent activation of the Hh pathway in our colon cancer cell lines by Sufu mutation and by Smo activation.

The Hh pathway is not activated by ligand independent mechanisms in colon cancer cells

We first identified Sufu transcripts and protein in our colon cancer cells. Indeed, the absence of the protein or the production of truncated proteins due to *SUFU* gene mutations has been shown to be responsible for the pathway activation in some cancers.^{22,23,27,28} We detected Sufu transcripts in the 7 colon cancer cell lines we analysed (Fig. 4). Moreover, the 54 kDa Sufu protein was present in 6 out of 7 cell lines. In Colo205 a shorter 50 kDa protein was detected. Next, we measured the modulation of the expression of Hh target genes in cyclopamine treated cells. Cyclopamine, an alkaloid from *Veratrum californicum*, binds and inactivates Smo and inhibits the pathway.²⁹ As positive control, we used PANC1 cyclopamine responsive pancreas cancer cells.³⁰ These cells express Shh, Ptch, Smo, Gli1, Gli2, Hhip and Sufu transcripts (Fig. 5a). As a negative control the cells were treated either with tomatidine, an alkaloid structurally close to cyclo-

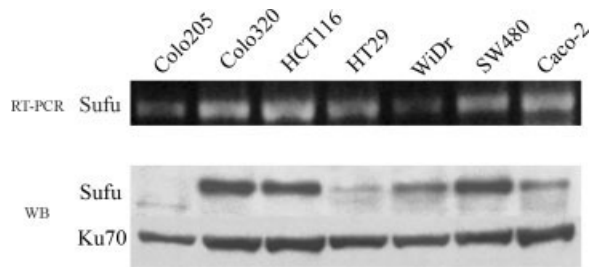


FIGURE 4 – Sufu mRNA and protein expression in colorectal cancer cell lines. Sufu transcripts were amplified by RT-PCR performed on 2 μ g of total RNA. Sufu protein was detected in 50 μ g of total protein extracts with an antibody recognizing the 54 kDa Sufu variant. Ku70 was used as a control.

pamine but inactive on the Hh pathway, or with the solvent (DMSO).

Cyclopamine downregulated *Ptch* transcript levels in PANC cells, in comparison with the expression in tomatidine treated cells (Fig. 5b). In contrast, no significant modifications of the *Ptch* mRNA level were observed in the 7 colorectal cancer cells after cyclopamine treatment. Cyclopamine induced a sharp decrease in the *Gli1* mRNA level in PANC cells (Fig. 5c). However, *Gli1* mRNA levels were not significantly modified in cyclopamine treated colon cancer cells in comparison with control cells. Surprisingly, tomatidine upregulated *Gli1* expression in Colo320 cells (Fig. 5c). Cyclopamine did not affect *Hhip* mRNA levels in any of the cells we tested, including the PANC cell line (data not shown).

Our results thus suggest that in the colon cancer cells we examined the Hh pathway is not activated by Sufu mutation or by aberrant activation of Smo.

Taken together, our results suggest that the constitutive activation of the Hh signalling pathway is not common in colon cancer cell lines.

Discussion

The published results on Hh pathway activation in colon cancer, based on the expression of some Hh target genes and on the response to cyclopamine treatment or the activity of a Gli responsive reporter vector, are conflicting. We wanted to discover whether a thorough analysis of the expression of the main key members of the Hh signaling pathway could help in understanding the activation status in colon cancer cell lines. Indeed, we think that it is important to define a reliable marker or combination of markers for Hh signal activity. This could then be applied in the identification of the human cancers that would benefit from a therapy targeting this pathway. To this end, we estimated the levels of *Shh*, *Ihh*, *Ptch*, *Smo*, *Gli1*, *Gli2*, *Gli3*, *Sufu* and *Hhip* transcripts and Hh, *Gli3* and Sufu proteins in 7 cell lines derived from different grade colon cancers. None of the cell lines expressed all the key members required for the pathway's activation. Moreover, cyclopamine did not modulate the expression levels of *PTCH* and *GLI1* genes, further suggesting that the Hh pathway is not activated in the colon cancer cell lines we analyzed.

The cell lines we used have been tested in other studies for the expression of some Hh pathway members.^{23,30,31} Concordant results were obtained for the expression of some pathway members and differences were noticed for others. In our opinion these discrepancies might be the consequences of epigenetic modifications to gene expression. Indeed, *Ihh* expression has been shown to be induced in HT29 cells by sodium butyrate, a HDAC inhibitor.¹⁹ Moreover, Smo has been shown to be re-expressed upon treatment of colon cancer cells with a DNA methylation and a HDAC inhibitor.²³ Discrepancies were observed between our results and some published data for *PTCH* and *GLI1* genes expres-

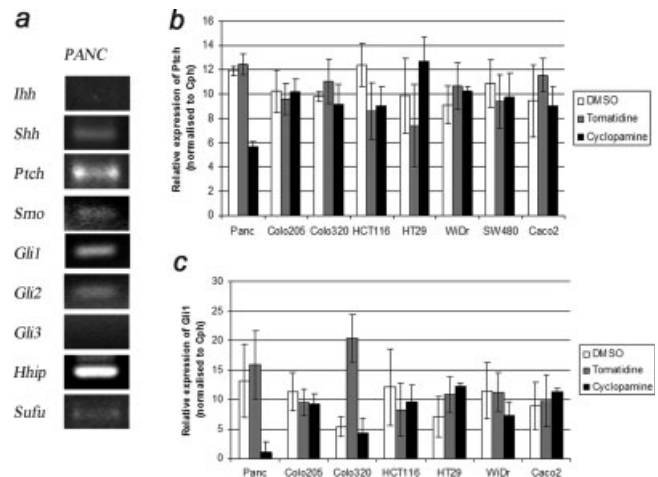


FIGURE 5 – Effect of cyclopamine on the expression of *PTCH* and *GLI1* genes in colorectal cancer cell lines. (a) Expression of Hedgehog pathway members in PANC cell line. (b and c) *Ptch* (b) and *Gli1* (c) transcripts levels in response to DMSO, tomatidine (10 μ M) or cyclopamine (10 μ M) treatments. Expression of *Ptch* and *Gli1* was analyzed by semi-quantitative RT-PCR. PCR signals were quantified by densitometry. Values were normalized to those of the Cph signal. Values represent mean \pm S.D. of 3 independent experiments.

sion in colon cancer cell lines. They are important since the expression of these genes is used as marker of Hh pathway activation. However, *PTCH* expression is not controlled only by the Hh signal. *PTCH* gene contains at least 3 alternative 5' exons,³² each with its own promoter, but only 1 contains a Gli binding site and responds to Hh pathway activation.³³ Moreover, Berman *et al.*³⁰ detected the *Gli1* transcript in some colon cancer cells, although the transcription factor did not activate a Gli dependent reporter vector.

HHIP gene expression is increased in Hh stimulated cells. *HHIP* was expressed in 2 of our cell lines, Colo205 and SW480. However, the case of *Hhip* is complex, because besides being a target gene it is a powerful inhibitor of the pathway as shown in transgenic mice³⁴ and in cell lines.¹² *Hhip* downregulation has been shown to increase the Hh signal in some pancreatic cancer cell lines.³⁵ *HHIP* expression has been shown to be reduced in 8/10 primary human colon cancers, when compared with the normal tissue from the same patient.¹² The contribution of *Hhip* to the inhibition of the Hh pathway in colon cancer cells will have to be assessed experimentally.

The presence of the full-length *Gli2* and *Gli3* proteins, but not the transcript or total protein levels indicates the activation of the pathway. The absence of *Gli2* probably impairs the transmission of the signal in Caco2 and Colo205 cells. We cannot propose a role for *Gli2* in cells where the transcript was present since we could not examine the cleavage status of the protein. In contrast, we were able to show the presence of the repressive *Gli3R* in 2 cell lines. To our knowledge this is the first report of the presence of this repressor in colon cancer cells. Interestingly, mice engineered to express a C-terminally truncated *Gli3* protein have been shown to present gastro-intestinal abnormalities similar to those of *Shh*^{-/-} or *Ihh*^{-/-} animals.³⁶ The role of these transcription factors in colon cancer should be studied further.

Our expression results do not rule out the possibility of ligand independent activation of the Hh pathway in some cell lines. We examined the possibility of ligand independent aberrant activation of the Hh pathway due to the absence of *SUFU* or the expression of truncated *SUFU* protein as well as by constitutive Smo activation.

Sufu transcripts were present in every colon cancer cell line we tested. More importantly, the full-length protein was present in 6

of the 7 cell lines. The mechanism responsible for the shorter protein production in Colo205 cells will have to be determined. Sufu has been shown to inhibit the activity of all 3 Gli transcription factors. Sufu mutations lead to increased Gli activity and target genes expression in different cancer types.^{28,37} Although most mutations observed in cancer cells give rise to shorter proteins, we cannot rule out the presence mutations which would modify the activity of the protein. Further work is thus needed to ascertain the role of Sufu in colon cancer cell lines.

Smo can be activated independently of Hh by mutation and by endogenous metabolites.³⁸ Cyclopamine inhibits Smo activated by these mechanisms. We did not detect significant differences in the expression of the *PTCH* and *GLII* genes between cyclopamine and tomatidine treated colon cancer cells. In contrast, both Ptc and Gli1 transcript levels were downregulated in cyclopamine but not in tomatidine treated PANC cells used as positive control. Our results agree with those of Berman *et al.* who did not observe a modulation of *PTCH* expression in cyclopamine treated HCT116 cells, and the drug did not increase the apoptosis of these cells in comparison with tomatidine.³⁰ In contrast, cyclopamine increases apoptosis rate of colon cancer cells according to Qualtrough *et al.*³¹ However, these authors did not use tomatidine to control for possible non specific effects of cyclopamine.

Cell lines might not be good models for the assessment of Hh pathway activity.²¹ However, the published results on primary human colon cancers are also confusing. Some authors,^{39,40} but not others²² detected increased levels of Hh pathway members

during colon cancer progression. Moreover, the expression of Ihh and Gli1 were shown to be decreased during colon cancer progression in recent publications.^{19,41}

Hh pathway activity might be involved in the progression of colon cancer *in vivo* by mediating the cross-talk between the cancerous epithelial cells and the cells from the tumor environment. Also, we cannot exclude that the Hh pathway is activated in a cellular subpopulation, for instance in cancer stem cells. It would be interesting to re-examine this in the recently identified colon cancer stem cells.^{42,43}

Our results and the data from the literature rise the question of what is a reliable marker of Hh pathway status in cells where the pathway is not manipulated. Identification of post-transcriptional modifications, such as processing, sub-cellular localization or phosphorylation of some Hh pathway members might predict more accurately the Hh pathway activity than expression levels. Clearly more work is needed to understand the possible involvement of this pathway in colon cancer before it can be considered as a suitable therapeutic target.

Acknowledgements

We thank Dr. B. Vogelstein for providing Gli3 cDNA, and Drs. E. Dejardin and R. Patient for critical reading of the manuscript. This study was supported by grants from the Belgian "GC is a recipient of FRIA (FNRS), Televie and "Fondation Leon Fredericq" grants. RW is senior research associate of FNRS.

References

- Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 2001;15:3059–87.
- Pan Y, Bai CB, Joyner AL, Wang B. Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol Cell Biol* 2006;26:3365–77.
- Osterlund T, Kogerman P. Hedgehog signalling: how to get from Smo to Ci and Gli. *Trends Cell Biol* 2006;16:176–80.
- Park HL, Bai C, Platt KA, Matisse MP, Beeghly A, Hui CC, Nakashima M, Joyner AL. Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development* 2000;127:1593–605.
- Bai CB, Auerbach W, Lee JS, Stephen D, Joyner AL. Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development* 2002;129:4753–61.
- Roessler E, Du YZ, Mullor JL, Casas E, Allen WP, Gillissen-Kaesbach G, Roeder ER, Ming JE, Altaba A, Muenke M. Loss-of-function mutations in the human GLI2 gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:13424–9.
- Ikram MS, Neill GW, Regl G, Eichberger T, Frischauf AM, Aberger F, Quinn A, Philpott M. GLI2 is expressed in normal human epidermis and BCC and induces GLI1 expression by binding to its promoter. *J Invest Dermatol* 2004;122:1503–9.
- Sasaki H, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H. A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh *in vitro*. *Development* 1997;124:1313–22.
- Hynes M, Stone DM, Dowd M, Pitts-Meek S, Goddard A, Gurney A, Rosenthal A. Control of cell pattern in the neural tube by the zinc finger transcription factor and oncogene Gli-1. *Neuron* 1997;19:15–26.
- Altaba A. Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development* 1999;126:3205–16.
- Chuang PT, McMahon AP. Vertebrate Hedgehog signaling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* 1999;397:617–21.
- Olsen CL, Hsu PP, Glienke J, Rubanyi GM, Brooks AR. Hedgehog-interacting protein is highly expressed in endothelial cells but down-regulated during angiogenesis and in several human tumors. *BMC Cancer* 2004;4:43.
- Svard J, Heby-Henricson K, Persson-Lek M, Rozell B, Lauth M, Bergstrom A, Ericson J, Toftgard R, Teglund S. Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway. *Dev Cell* 2006;10:187–97.
- Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog signaling. *J Cell Sci* 2007;120:3–6.
- Lee J, Platt KA, Censullo P, Altaba A. Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* 1997;124:2537–52.
- Marigo V, Tabin CJ. Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9346–51.
- Lees C, Howie S, Sartor RB, Satsangi J. The hedgehog signalling pathway in the gastrointestinal tract: implications for development, homeostasis, and disease. *Gastroenterology* 2005;129:1696–710.
- Ramalho-Santos M, Melton DA, McMahon AP. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development* 2000;127:2763–72.
- van den Brink GR, Bleuming SA, Hardwick JC, Schepman BL, Offerhaus GJ, Keller JJ, Nielsen C, Gaffield W, van Deventer SJ, Roberts DJ, Peppelenbosch MP. Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. *Nat Genet* 2004;36:277–82.
- Pasca di MM, Hebrok M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer* 2003;3:903–11.
- Evangelista M, Tian H, de Sauvage FJ. The hedgehog signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:5924–8.
- Hu Z, Bonifas JM, Aragon G, Kopelovich L, Liang Y, Ohta S, Israel MA, Bickers DR, Aszterbaum M, Epstein EH, Jr. Evidence for lack of enhanced hedgehog target gene expression in common extracutaneous tumors. *Cancer Res* 2003;63:923–8.
- Zhu Y, James RM, Peter A, Lomas C, Cheung F, Harrison DJ, Bader SA. Functional Smoothed is required for expression of GLI3 in colorectal carcinoma cells. *Cancer Lett* 2004;207:205–14.
- Wang WS, Chen PM, Su Y. Colorectal carcinoma: from tumorigenesis to treatment. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:663–71.
- Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K, Ling LE, Karanu FN, Bhatia M. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells *via* BMP regulation. *Nat Immunol* 2001;2:172–80.
- Stone DM, Murone M, Luoh S, Ye W, Armanini MP, Gurney A, Phillips H, Brush J, Goddard A, de Sauvage FJ, Rosenthal A. Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli J Cell Sci 1999;112:4437–48.
- Taylor MD, Liu L, Raffel C, Hui CC, Mainprize TG, Zhang X, Agatep R, Chiappa S, Gao L, Lowrance A, Hao A, Goldstein AM, et al. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat Genet* 2002;31:306–10.
- Sheng T, Li C, Zhang X, Chi S, He N, Chen K, McCormick F, Gatalica Z, Xie J. Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer. *Mol Cancer* 2004;3:29.
- Taipale J, Chen JK, Cooper MK, Wang B, Mann RK, Milenkovic L, Scott MP, Beachy PA. Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* 2000;406:1005–9.

30. Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De OR, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN, Beachy PA. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* 2003;425:846–51.
31. Qualtrough D, Buda A, Gaffield W, Williams AC, Paraskeva C. Hedgehog signalling in colorectal tumour cells: induction of apoptosis with cyclopamine treatment. *Int J Cancer* 2004;110:831–7.
32. Kogerman P, Krause D, Rahnama F, Kogerman L, Uden AB, Zaphiropoulos PG, Toftgard R. Alternative first exons of PTCH1 are differentially regulated *in vivo* and may confer different functions to the PTCH1 protein. *Oncogene* 2002;21:6007–16.
33. Agren M, Kogerman P, Kleman MI, Wessling M, Toftgard R. Expression of the PTCH1 tumor suppressor gene is regulated by alternative promoters and a single functional Gli-binding site. *Gene* 2004;330:101–14.
34. Madison BB, Braunstein K, Kuison E, Portman K, Qiao XT, Gumucio DL. Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development* 2005;132:279–89.
35. Martin ST, Sato N, Dhara S, Chang R, Hustinx SR, Abe T, Maitra A, Goggins M. Aberrant methylation of the Human Hedgehog interacting protein (HHIP) gene in pancreatic neoplasms. *Cancer Biol Ther* 2005;4:728–33.
36. Bose J, Grotewold L, Ruther U. Pallister-Hall syndrome phenotype in mice mutant for Gli3. *Hum Mol Genet* 2002;11:1129–35.
37. Taylor MD, Zhang X, Liu L, Hui CC, Mainprize TG, Scherer SW, Wainwright B, Hogg D, Rutka JT. Failure of a medulloblastoma-derived mutant of SUFU to suppress WNT signaling. *Oncogene* 2004;23:4577–83.
38. Dwyer JR, Sever N, Carlson M, Nelson SF, Beachy PA, Parhami F. Oxysterols are novel activators of the hedgehog signaling pathway in pluripotent mesenchymal cells. *J Biol Chem* 2007;282:8959–68.
39. Oniscu A, James RM, Morris RG, Bader S, Malcomson RD, Harrison DJ. Expression of Sonic hedgehog pathway genes is altered in colonic neoplasia. *J Pathol* 2004;203:909–17.
40. Douard R, Moutereau S, Pernet P, Chimingqi M, Allory Y, Manivet P, Conti M, Vaubourdolle M, Cugnenc PH, Loric S. Sonic Hedgehog-dependent proliferation in a series of patients with colorectal cancer. *Surgery* 2006;139:665–70.
41. Akiyoshi T, Nakamura M, Koga K, Nakashima H, Yao T, Tsuneyoshi M, Tanaka M, Katano M. Gli1, downregulated in colorectal cancers, inhibits proliferation of colon cancer cells involving Wnt signalling activation. *Gut* 2006;55:991–9.
42. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007;445:106–10.
43. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De MR. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007;445:111–5.