



**HAL**  
open science

# Etude des effets des rayonnements ionisants sur la niche hématopoïétique et traitement du syndrome aigu d'irradiation par thérapie génique chez le macaque irradié à forte dose

Philippe Garrigou

► **To cite this version:**

Philippe Garrigou. Etude des effets des rayonnements ionisants sur la niche hématopoïétique et traitement du syndrome aigu d'irradiation par thérapie génique chez le macaque irradié à forte dose. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT: 2011GRENS016 . tel-00631339

**HAL Id: tel-00631339**

**<https://theses.hal.science/tel-00631339>**

Submitted on 12 Oct 2011

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

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

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### **DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE**

Spécialité : **Modèles, méthodes et algorithmes en biologie.**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Philippe GARRIGOU**

Thèse dirigée par **Mr Francis Hérodin** et  
codirigée par **Mr Michel Drouet**.

préparée au sein de l'**Institut de Recherches Biomédicales des Armées, Antenne du CRSSA de La Tronche.**  
dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement (EDISCE).**

### **Étude des effets des rayonnements ionisants sur la niche hématopoïétique et traitement du syndrome aigu d'irradiation par thérapie génique chez le macaque irradié à forte dose.**

Thèse soutenue publiquement le **07 Septembre 2011**,  
devant le jury composé de :

**Mme Marie-Jeanne RICHARD**

Praticien Hospitalier, Unité mixte de Thérapie Cellulaire-Institut Albert Bonniot,  
membre du jury

**Mr Jean-Marc BERTHO**

Docteur, chercheur au laboratoire de radiotoxicologie expérimentale (IRSN,  
Fontenay-aux-Roses), rapporteur

**Mr Nicolas FORAY**

Docteur, chercheur au Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon,  
rapporteur

**Mr Jean-Philippe VUILLEZ**

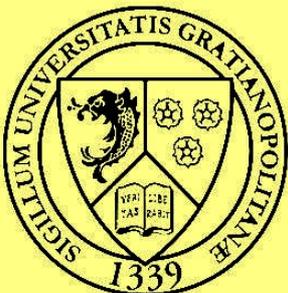
Professeur d'université à l'Université Joseph Fourier de Grenoble, praticien à  
l'hôpital André Michallon de Grenoble., membre du jury

**Mr Louis CASTEILLA**

Professeur, Directeur "STROMALab", Responsable équipe 1 "Plasticité des  
tissus adipeux"UMR UPS/CNRS/EFS 5273 Inserm U1031

**Mr Michel DROUET**

Médecin en Chef, Chef de l'Unité des Traitements Cellulaires de l'Irradiation,  
IRBA, antenne du CRSSA à La Tronche, membre du jury



---

## Résumé

La niche des cellules souches hématopoïétiques représente un compartiment complexe et radiosensible. Sa protection est nécessaire pour la restauration de l'hématopoïèse faisant suite à la myélosuppression due à l'exposition aux rayonnements ionisants. Nous avons dans un premier temps étudié l'effet des RI sur les progéniteurs endothéliaux et mésenchymateux de la niche par une étude de radiosensibilité et une étude d'évaluation de la mort cellulaire. Nous avons proposé par la suite une stratégie innovante de thérapie génique basée sur la sécrétion locale et à court terme du morphogène Sonic hedgehog visant à favoriser la réparation de niche vasculaire et de stimuler les cellules souches hématopoïétiques et les cellules progénitrices résiduelles. Nous avons étudié la réponse hématopoïétique des singes irradiés à 8 Gy gamma après une seule injection intra-osseuse de cellules souches mésenchymateuses xénogéniques, multipotentes et d'origine adipocytaire transfectées avec un plasmide pIRES2-eGFP codant la protéine Shh. La durée de thrombocytopénie et celle de neutropénie ont été significativement réduites chez les animaux greffés et les clonogènes sont normalisés à partir du 42<sup>e</sup> jour. Les aires sous la courbe des numérations des plaquettes et des neutrophiles entre 0 et 30 jours ont été significativement plus élevées chez les animaux traités que chez les témoins. La greffe d'explants de Matrigel™ colonisés ou non avec des ASC chez des souris immunodéprimées a démontré une activité pro-angiogénique notable des ASC transfectées avec le plasmide Shh. Le suivi à long terme (180 à 300 jours) a confirmé une reconstitution durable dans les quatre singes greffés. Globalement cette étude suggère que la greffe de cellules souches multipotentes Shh peut représenter une nouvelle stratégie pour la prise en charge des dommages radio-induits de la niche.

**Mots clés :** irradiation, ASC, Sonic Hedgehog, hématopoïèse, thérapie génique, niche

## Abstract

The hematopoietic stem cell niche represents a complex radiosensitive compartment whose protection is required for recovery from radiation-induced myelosuppression. We initially studied RI effects on endothelial and mesenchymal progenitors by evaluating radiosensitivity and cell death. Then, we have proposed a new gene therapy strategy based on local and short term secretion of Sonic hedgehog morphogene to favour vascular niche repair and to stimulate residual hematopoietic stem and progenitor cells. We investigated the hematopoietic response of 8-Gy gamma irradiated monkeys to a single intra-osseous injection of xenogeneic multipotent mesenchymal stem cells transduced with a Shh pIRES2 plasmid. Thrombocytopenia and neutropenia duration were significantly reduced in grafted animals and clonogenics normalized from day 42. Areas under the curve of PLTs and ANCs between day 0 and day 30 were significantly higher in treated animals than in controls. Grafting Matrigel™ colonized or not with ASC in immunocompromized mice demonstrated a notable pro-angiogenic activity for Shh-ASC. Long term follow up (180-300 days) confirmed a durable recovery in the four grafted monkeys. Globally this study suggests that grafting Shh-multipotent stem cells may represent a new strategy to cure radiation-induced niche damage.

Keywords : irradiation, ASC, Sonic Hedgehog, hematopoiesis, gene therapy, niche

---

*À mes parents,  
à Charlotte,*

---

## Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu le docteur Francis Hérodin, pour avoir dirigé mes travaux au sein du CRSSA ainsi que le docteur Michel Drouet, pour m'avoir permis de travailler sur ce sujet passionnant et avoir fait en sorte que ce travail prenne corps.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres des équipes de Radio-Hématologie Experimentale et l'Unité des Traitements Cellulaires de l'Irradiation pour leur participation à l'accomplissement de ce travail :

Particulièrement à Christophe Delaunay, pour m'avoir souvent soutenu aussi bien sur le plan technique que sur le plan moral par sa motivation et son amitié et Jean-François Mayol, dont l'aide m'a permis d'acquérir une meilleure compréhension de la démarche scientifique, pour son enthousiasme et sa disponibilité.

À Diane Agay et Fabien Forcheron pour le précieux soutien qu'il m'ont apporté au niveau des expérimentations mais aussi de la discussion scientifique lors de la rédaction du manuscrit.

À Mylène Vivier pour sa précieuse complicité, à Nancy Grenier, pour son aide et pour m'avoir longtemps supporté en tant que voisin de bureau et Bruno Ballester, pour ses qualités techniques et son implication dans le travail.

Je remercie tous les membres du personnel du Département des Effets Biologiques des Rayonnements qui ont tous participé à leur manière à la réalisation de cette étude.

À Patrick Martigne pour la patience dont il a fait preuve pour la relecture du manuscrit et son amitié.

À Florent Raffin et Stéphane Baugé dont le soutien ne s'est pas arrêté aux limites du bureau.

Aux membres du Pôle de Génomique, sans qui la réalisation de l'outil de thérapie génique n'aurait pas été possible, André Peinnequin pour m'avoir guidé dans cette partie de l'étude, Pascal Pugnière et Catherine Mouret, pour leur aide et Thomas Poyot, pour ses conseils et ses traits d'esprits.

À Michel Diserbo, William Fauquette, Sandrine Richard pour leur sympathie et leur gentillesse ainsi qu'à tous les autres membres du personnel du département.

Je remercie également les membres du personnel du Laboratoire d'Analyse Biologiques et particulièrement Josiane Denis pour l'aide précieuse qu'elle m'a fournie aux moments où j'en avais besoin.

Je remercie tous les personnels du CRSSA ayant participé à la réalisation de cette étude et sans qui les équipes de recherche ne pourraient fonctionner et spécialement le service informatique et le service de Biologie Appliquée avec qui j'ai partagé un peu plus que le travail. À Sébastien, Jérôme, Philippe, Patrick, Frank, les trois David, Alexandre, Stéphane et Hervé.

Enfin, merci à toutes les personnes qui m'ont soutenues par leur sympathie, leur gentillesse et leur amitié. À Virginie, Eugénie, Richard, Loubna, Jean-Baptiste, Chloé, Aurore, Céline, Aurélie, Renaud, Kevin, Karine, Daniel, Marc, Seb, Julien, Ju, Florian, Ouamar, BAM et Charlotte avec qui j'ai partagé les coups durs et les bons moments.

---

## Abréviations

### AB

ANC	Absolute Neutrophil Count
APC	Allophycocyanine
ASC	Cellule souche adipocytaire
BMP	Bone Morphogenic Protein
BFUe	Burst Forming Unit erythroïd
BFU-MK	BFU-Megakaryocytic

### C

CD	Classe de différenciation
CDM	Chondrogenic Differentiation Medium
CFU-endothélial	Colony Forming Unit-endothélial
CFU-F	Colony Forming Unit-fibroblast
Ci	Cubitus interruptus
CKAU	Cytokinothérapie antiapoptotique d'urgence
CRSSA	Centre de recherches du service de santé des armées
CS	Cellule souche
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CSM	Cellule souche mésenchymateuse
CSPH	Cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques

### D

D <sub>0</sub>	Dose létale 63%
DL50	Dose létale 50%
DMEM	Dubelcco's Minimum Essential Medium

### E

EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
EI	Engin Explosif Improvisé
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
EGM	Endothelial Growth Medium

---

EPC	Endothelial Progenitor Cell
<b>F</b>	
FITC	Fluorescein Isothyocyanate
FLT-3	FMS-like tyrosine kinase 3
Fu	Fused
<b>G</b>	
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GFP	Green fluorescent protein
GM-CSF	Granulocyte-monocyte colony stimulating factor
GVHD	Réaction du greffon contre l'hôte ( <i>Graft Versus Host Disease</i> )
Gy	Gray
<b>H</b>	
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HPP-ECFC	High Proliferating Potential-Endothelial Colony Forming Cell
hTERT	Human Telomerase Reverse Transcriptase
<b>I</b>	
ICAM-1	Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
ICT	Irradiation corporelle totale
Ihh	Indian Hedgehog
Il-3	Interleukine-3
iPSC	induced Pluripotent Stem Cell
IRBA	Institut de Recherche Biomédicale des Armées
<b>J-O</b>	
MCS	Site multiple de clonage
MEM	Minimum essential medium
NOD-SCID	Non-obese diabetic severe combined immunodeficient

---

OIS Oncogene-Induced Senescence

## **P**

PBS Tampon phosphate  
PCR Réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction*)  
PE Phycoérythrine  
PKA Protéine Kinase A  
PLT Plaquettes  
PTC Patched

## **QR**

RI Rayonnement Ionisant  
ROS Espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*)

## **S**

SAI Syndrome aigu d'irradiation  
SCF Stem Cell Factor  
SDF-1 Stromal cell-derived factor-1  
SFT3 Combinaison de référence du Stem Cell Factor + FLT-3 ligand + thrombopoïétine + interleukine-3 (SFT3; 50 ng/mL)  
Shh Sonic Hedgehog  
Smo Smoothened  
SuFu Suppresseur de Fusion  
SVF Sérum de Veau Fœtal.

## **T-Z**

TBS Tris Buffered Saline  
TCA Thérapie Cellulaire Autologue  
TPO Thrombopoïétine  
VEGF Vascular Endothelial Growth Factor  
VEGFR Vascular Endothelial Growth Factor Receptor  
VLA-4 Very Late Antigen-4

## Table des matières

<b>Table des matières.....</b>	<b>8</b>
<i>PREMIÈRE PARTIE.....</i>	<i>12</i>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>	<b>13</b>
<b><u>I.</u> Multiplicité des risques d'exposition à des doses élevées de radiations ionisantes.....</b>	<b>15</b>
<u>I.1</u> Risque d'origine civile.....	15
<u>I.2</u> Risque d'origine terroriste.....	16
<b><u>II.</u> Les dommages de l'irradiation sur le corps humain dépendent de la dose reçue.....</b>	<b>16</b>
<b><u>III.</u> Le syndrome hématopoïétique est la composante majeure du SAI et doit être toujours pris en charge quelles que soient les pathologies associées.....</b>	<b>22</b>
<u>III.1</u> L'hématopoïèse humaine.....	23
<u>III.2</u> Les traitements existants du syndrome hématologique visent principalement à stimuler les CSH résiduelles par cytokinothérapie ou à effectuer une greffe thérapeutique.....	26
<b><u>IV.</u> Les différents acteurs de la niche hématopoïétique sont indispensables à sa fonctionnalité.....</b>	<b>28</b>
<u>IV.1</u> Une reconstitution hématopoïétique à long terme ne peut se produire sans une reconstruction de la niche.....	28
<u>IV.1.1</u> La niche endostéale.....	29
<u>IV.1.2</u> La niche vasculaire.....	31
<u>IV.1.3</u> Action de facteurs sécrétés.....	32
<u>IV.2</u> Les CSH, les cellules souches mésenchymateuses et les progéniteurs endothéliaux sont les cellules à partir desquelles tous les éléments de la niche hématopoïétique sont produits.....	33
<u>IV.2.1</u> La notion de cellule souche.....	34
<u>IV.2.2</u> Les cellules souches mésenchymateuses.....	39
<u>IV.2.3</u> Les progéniteurs endothéliaux.....	42
<u>IV.2.4</u> Les cellules souches hématopoïétiques.....	43
<u>IV.2.4.1</u> Les sources des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques (CSPH) adultes.....	44
<u>IV.2.4.2</u> Tests de clonogénicité.....	45
<b><u>V.</u> Ces types cellulaires, soumis à l'irradiation subissent différents types de mort cellulaire.....</b>	<b>47</b>
<u>V.1</u> La nécrose.....	47
<u>V.2</u> L'apoptose.....	48

<a href="#">V.3</a> La sénescence.....	49
<a href="#">V.4</a> Cinétique de mort cellulaire.....	51
<b>VI. L'optimisation de la prise en charge des irradiés accidentels nécessite l'utilisation de modèles animaux.....</b>	<b>52</b>
<b>VII. Hypothèse de travail : Utilisation d'un vecteur cellulaire pour délivrer une protéine active sur la restructuration de la niche.....</b>	<b>54</b>
<a href="#">VII.1</a> Les cellules souches adipeuses (ASC).....	54
<a href="#">VII.1.1</a> Caractérisation.....	55
<a href="#">VII.1.2</a> Activité paracrine.....	57
<a href="#">VII.1.3</a> Régénération tissulaire.....	59
<a href="#">VII.1.4</a> Perspectives de thérapie cellulaire.....	60
<a href="#">VII.2</a> La protéine choisie a été le morphogène Sonic Hedhehog.....	61
<a href="#">VII.2.1</a> Description.....	61
<a href="#">VII.2.2</a> Signalisation.....	62
<a href="#">VII.2.3</a> Activités biologiques ayant conduit au choix de cette protéine.....	63
<b>OBJECTIFS.....</b>	<b>65</b>
<i>DEUXIÈME PARTIE.....</i>	<i>67</i>
<b>I. Matériel et méthodes.....</b>	<b>68</b>
<a href="#">I.1</a> Évolution des composants cellulaires de la niche irradiée in vitro.....	68
<a href="#">I.1.1</a> Culture cellulaire.....	68
<a href="#">I.1.2</a> Étude de radiosensibilité.....	69
<a href="#">I.1.2.1</a> CFU-F.....	69
<a href="#">I.1.2.2</a> CFU-endothéliales.....	69
<a href="#">I.1.3</a> Évaluation de la mort cellulaire post irradiation in vitro.....	70
<a href="#">I.1.3.1</a> Évaluation de l'apoptose.....	70
<a href="#">I.1.3.2</a> Évaluation de la sénescence.....	70
<a href="#">I.2</a> Élaboration de l'outil de thérapie génique : ASC manipulées pour sécréter la protéine Sonic Hedhehog.....	70
<a href="#">I.2.1</a> Insert codant la protéine recombinante Shh.....	70
<a href="#">I.2.2</a> Réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR).....	71
<a href="#">I.2.3</a> Plasmides.....	72
<a href="#">I.2.4</a> Digestions enzymatiques et réactions de ligation.....	74
<a href="#">I.2.5</a> Transformation des plasmides dans les bactéries compétentes.....	75
<a href="#">I.2.6</a> Electrophorèse.....	75
<a href="#">I.2.7</a> Minipreps et extraction des acides nucléiques.....	75
<a href="#">I.2.8</a> Protocole de séparation des ASC.....	78
<a href="#">I.2.9</a> Vérification du phénotype des ASCs.....	79
<a href="#">I.2.9.1</a> Cytométrie en flux.....	79
<a href="#">I.2.9.2</a> Différenciation adipogénique.....	79
<a href="#">I.2.9.3</a> Différenciation ostéogénique.....	80
<a href="#">I.2.9.4</a> Différenciation chondrogénique.....	80

<u>I.2.10</u> Transfection des ASC.....	81
<u>I.2.11</u> Efficacité de transfection et vérification de l'expression du plasmide.....	81
<u>I.2.11.1</u> Cytométrie en flux.....	82
<u>I.2.11.2</u> Microscopie à épifluorescence.....	82
<u>I.2.11.3</u> Western Blot.....	82
<u>I.3</u> Contrôles de l'activité biologique de l'outil de thérapie génique ASC-Shh in vitro et in vivo.....	83
<u>I.3.1</u> Action des ASC transfectées sur des CSH irradiées à 2,5Gy.....	83
<u>I.3.1.1</u> Cocultures.....	83
<u>I.3.1.2</u> Cytométrie en flux.....	83
<u>I.3.2</u> Quantification de l'hémoglobine dans des explants de Matrigel <sup>TM</sup> implantés à des souris NOD-SCID.....	84
<u>I.3.2.1</u> Animaux.....	84
<u>I.3.2.2</u> Composition des implants.....	84
<u>I.3.2.3</u> Traitement des implants.....	84
<u>I.3.2.4</u> Spectrophotométrie.....	85
<u>I.3.3</u> Vérification de la capacité de homing des ASCs par greffe de cellules infectées avec un lentivirus codant un gène rapporteur.....	85
<u>I.3.3.1</u> Prétraitement des animaux.....	85
<u>I.3.3.2</u> Infection virale.....	85
<u>I.3.3.3</u> Suivi ex vivo.....	85
<u>I.4</u> Utilisation des ASC transfectées pour l'amélioration de la reconstitution hématopoïétique post-ICT.....	86
<u>I.4.1</u> Modèle de primate non humain.....	86
<u>I.4.2</u> Greffe des ASC-Shh.....	87
<u>I.4.3</u> Suivi des taux sanguins des différents éléments figurés.....	88
<u>I.4.4</u> Analyse des CFU-hématopoïétiques.....	88
<u>I.4.5</u> Suivi clinique des animaux.....	88
<u>I.5</u> Analyses statistiques.....	89
<b><u>II. Résultats et discussion.....</u></b>	<b>89</b>
<u>II.1</u> Évolution de la niche irradiée in vitro.....	89
<u>II.1.1</u> Études de radiosensibilité.....	89
<u>II.1.1.1</u> Cellules endothéliales.....	89
<u>II.1.1.2</u> CSM.....	91
<u>II.1.2</u> Évaluation de la mort cellulaire.....	93
<u>II.1.2.1</u> Évaluation de l'apoptose.....	93
<u>II.1.2.2</u> Évaluation de la sénescence.....	94
<u>II.1.2.3</u> Cycle cellulaire.....	94
<u>II.2</u> Élaboration de l'outil de thérapie génique.....	96
<u>II.2.1</u> Morphologie et marqueurs de surface.....	96
<u>II.2.1.1</u> Cytométrie.....	96
<u>II.2.1.2</u> Étude de la différenciation.....	97
<u>II.2.2</u> Transfection et culture.....	98
<u>II.2.3</u> Activité sécrétoire des cellules transfectées.....	99
<u>II.3</u> Activité biologique de l'outil de thérapie génique.....	99

<a href="#">II.3.1</a> « Homing » des ASC.....	100
<a href="#">II.3.2</a> Radiosensibilité des ASC manipulées.....	102
<a href="#">II.3.3</a> Étude de l'effet de Sonic Hedgehog sur la prolifération et la différenciation des CSH in vitro.....	103
<a href="#">II.3.4</a> Étude ex vivo de la néovascularisation induite par la sécrétion de SHH par des ASCs transfectées dans un modèle murin.....	106
<a href="#">II.4</a> Modèle clinique de traitement du syndrome hématopoïétique chez le primate non humain.....	108
<a href="#">II.4.1</a> Réponse biologique des animaux contrôles.....	108
<a href="#">II.4.2</a> Effet de la greffe des ASC manipulées sur la reconstitution hématopoïétique.....	108
<a href="#">II.4.2.1</a> Évolution des numérations et formules sanguines.....	108
<a href="#">II.4.2.2</a> Évolution des CFU hématopoïétiques.....	112
<i>TROISIÈME PARTIE</i> .....	116
<b>I. Conclusion</b> .....	<b>117</b>
<a href="#">1.1</a> Élaboration du vecteur.....	118
<a href="#">1.2</a> Tests fonctionnels.....	119
<a href="#">1.3</a> Étude de thérapie génique.....	120
<b>II. Perspectives</b> .....	<b>122</b>
<b>Valorisation du travail</b> .....	<b>124</b>
<b>Index des illustrations</b> .....	<b>125</b>
<b>Index des tables</b> .....	<b>126</b>
<i>BIBLIOGRAPHIE</i> .....	128
<b>Bibliographie</b> .....	<b>129</b>



# **P**remière Partie



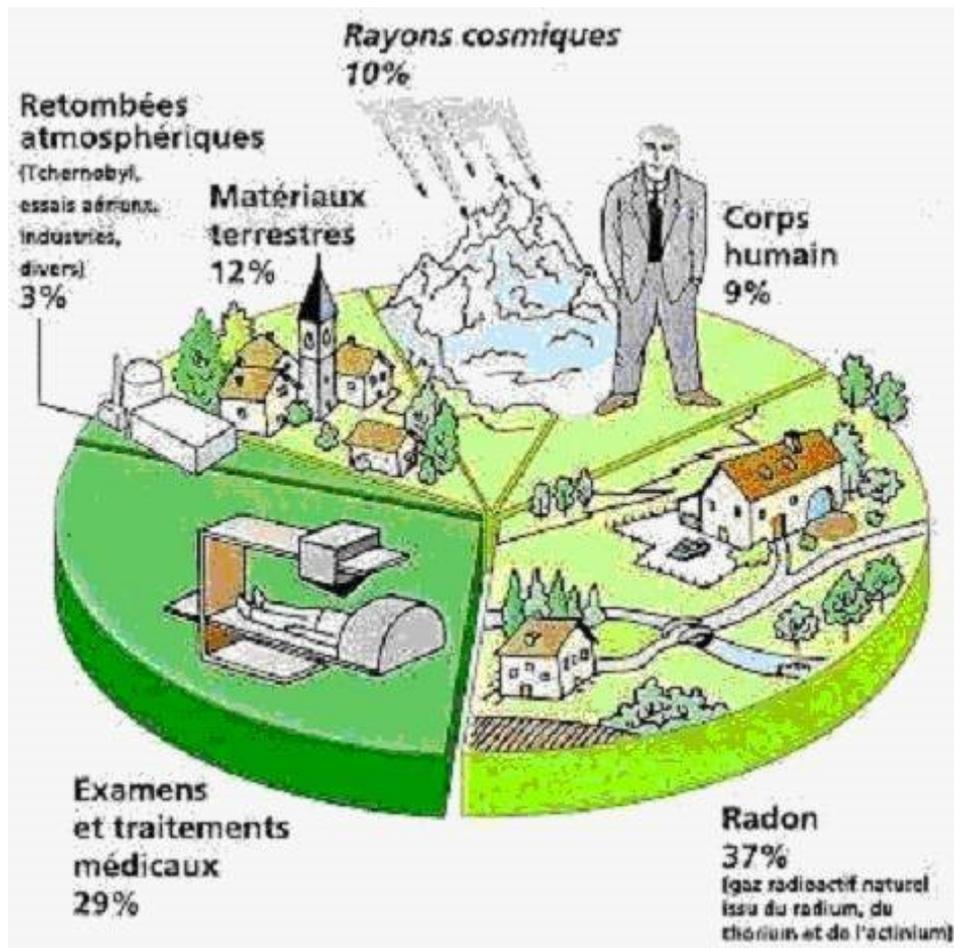
---

## **Rappels bibliographiques**

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le phénomène de radioactivité a été découvert pour la première fois en 1896 par Henri Becquerel sur l'uranium. Quarante ans plus tard, les premiers effets biologiques de ce phénomène physique furent décrits sur le génome par le généticien américain Hermann Joseph Muller. Ses travaux, récompensés par le prix Nobel de médecine en 1946, ont ouvert la voie à l'étude plus approfondie de ces effets sur les organismes vivants.

Nous sommes perpétuellement exposés dans notre vie quotidienne aux radiations ionisantes. L'exposition purement naturelle est due à quatre phénomènes distincts. Le premier est le fait que l'air ambiant contient du radon, un élément radioactif issu de la désintégration de l'uranium présent dans le sous-sol, le second, le rayonnement cosmique, bien que très largement atténué par l'atmosphère terrestre, affecte les organismes vivants ; le troisième est la désintégration des éléments radioactifs de l'écorce terrestre qui produit également des rayonnements ionisants ; enfin, l'ingestion de différents éléments radioactifs présents naturellement dans la nourriture et les boissons entraîne leur fixation dans l'organisme (principalement le potassium 40) (**Illustration 1**).



**Illustration 1:** Part des différentes sources de radiations ionisantes naturelles et artificielles dans l'irradiation moyenne annuelle d'un individu. (source : <http://installationsclassees.ecologie.gouv.fr>).

Les sources non naturelles d'exposition aux radiations ionisantes comptent pour un tiers de la dose annuelle moyenne reçue par un être humain. Celle-ci provient principalement des examens médicaux tels que les tomodensitométries (scanners aux rayons X) et les radiographies mais aussi des retombées radioactives issues de l'industrie.

En France, l'exposition moyenne toutes origines confondues d'un individu est de 4 mSv par an dont 2,4 mSv dus à la radioactivité naturelle. Cette dose très faible est inférieure à celle nécessaire à l'apparition de pathologies déterministes dues aux rayonnements ionisants, cependant, les sources industrielles et médicales participent au risque radiologique et peuvent être à l'origine d'irradiations accidentelles en cas de dysfonctionnement ou de mauvaise manipulation.

## **I. Multiplicité des risques d'exposition à des doses élevées de radiations ionisantes.**

Avec l'essor de l'industrie nucléaire civile et militaire depuis les années quarante, les risques d'exposition des populations aux radiations ionisantes augmentent. La plupart des expositions répertoriées jusqu'à présent, mises à part les frappes nucléaires ayant mis fin à la seconde guerre mondiale et les essais atomiques à l'air libre, ont un caractère accidentel.

### **I.1 Risque d'origine civile.**

- Accidents de criticité (conditions dans lesquelles un système exploitant une réaction nucléaire en chaîne diverge) liés à l'utilisation industrielle de la fission nucléaire, comme cela fut le cas à Vinca (Yougoslavie) en 1958 et à Tokaïmura (Japon) en 1999.
- Accidents dus à un dysfonctionnement sur un réacteur, tel l'accident de Tchernobyl en 1986 ou beaucoup plus récemment l'accident de la centrale de Fukushima I (Japon).
- Accidents dus au détournement d'une source médicale ou industrielle. L'accident de Goiâna (Brésil) en 1987 est un exemple de situation comportant un nombre élevé de victimes irradiées présentant un syndrome hématologique par dissémination d'une source radiologique non recyclée selon la réglementation internationale. Un autre exemple de situation de ce type eut lieu en 2000 à Samut Prakarn (Thaïlande) où le vol d'une source de cobalt 60 utilisée en radiothérapie entraîna l'irradiation de dix personnes et le décès de trois d'entre elles.
- Accidents dus au non respect des règles de sécurité ou à la mauvaise utilisation d'une source industrielle. En 1999, un ouvrier chilien a été irradié en ramassant la source d'iridium servant dans un gammagraphe ; celle-ci avait été accidentellement séparée de l'appareil. Ce patient a été transféré en France où il a bénéficié d'une thérapie cellulaire pour soigner ses lésions radiologiques. La surexposition des vingt-trois patients traités par radiothérapie pour des cancers à l'hôpital d'Épinal entre 2005 et 2006 est également un exemple d'une suite de négligences ayant conduit au décès de quatre patients et au développement de pathologies

radio-induites.

## I.2 Risque d'origine terroriste.

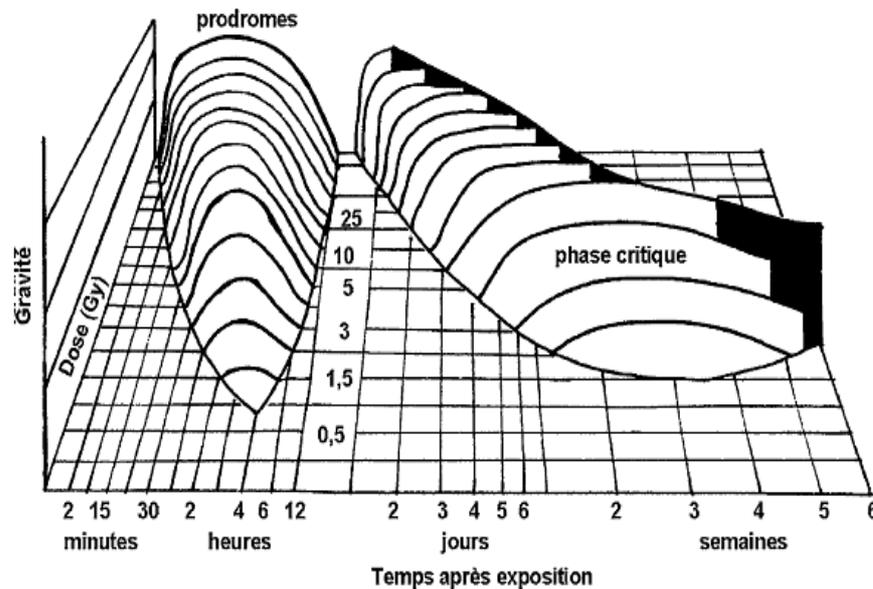
Avec l'apparition de nouvelles menaces terroristes telles que celles du groupe Al Quaida et la dislocation de l'union soviétique faisant craindre la dissémination de ses armes nucléaires, les risques de contamination intentionnelle des populations civiles par une arme de type « bombe sale » n'ont jamais été aussi élevés.

Plusieurs attentats de ce type ont été déjoués par le passé, notamment en 1998 près de la ville de Grozny où les services secrets tchéchènes avaient retrouvé un engin explosif improvisé (EEI) contenant des matières radioactives. La seule utilisation malveillante d'agents radioactifs répertoriée fut l'empoisonnement pour des raisons politiques d'Alexandre Litvinenko en 2006. Ce dernier est décédé de suites de l'ingestion de Polonium 210.

## II. Les dommages de l'irradiation sur le corps humain dépendent de la dose reçue.

Les syndromes provoqués par une irradiation à forte dose (supérieure à 0,5 Gy) ont été regroupés sous le terme de Syndrome Aigu d'Irradiation (SAI).

Le SAI comporte trois phases dont l'intensité et la durée dépendent de la qualité du rayonnement, de la dose, du débit de dose et du volume tissulaire irradié. La première phase ou phase prodromale correspond à l'apparition transitoire des symptômes et varie en fonction de la dose reçue par la victime. La deuxième phase correspond à la phase de latence clinique, et sa durée est inversement proportionnelle à la dose. Enfin, la troisième phase ou phase d'état correspond à l'apparition de symptômes cliniques contribuant aux différents syndromes qui sont, en fonction de la dose reçue, le syndrome hématopoïétique, le syndrome gastro-intestinal et le syndrome cérébrovasculaire (**illustration 2**). La durée et la sévérité de chacune de ces phases est proportionnelle à la dose d'irradiation reçue (de Revel T et al, 2005).



**Illustration 2:** Présentation de trois phases du SAI : Prodrome, phase de latence et phase clinique. Le décès probable des individus est indiqué par les zones noires. Illustration issue de (Young RW, 1987)

Le **tableau 1** reprend la symptomatologie observée en fonction des doses d'irradiation. Chronologiquement, la phase prodromale est d'autant plus précoce que la dose est plus élevée. Le syndrome cérébrovasculaire est le plus précoce, puis le gastro-intestinal intervient, et enfin le syndrome hématopoïétique, l'apparition de ces différents syndromes est cependant fonction de la dose absorbée de même que de la localisation de irradiation. Ainsi, expérimentalement on définit le syndrome gastro-intestinal par la DL50 à 6 jours chez le rongeur ou la DL50 à 15 jours chez le primate non humain (PNH). Pour le syndrome hématologique c'est la DL50 à 30 jours chez le rongeur et la DL50 à 60 jours chez le primate (MacVittie TJ et al, 2011).

Les rayonnements ionisants ont donc des effets délétères sur la matière vivante. Les effets d'une irradiation sur un organisme peuvent être stochastiques ou déterministes. Les effets cytogénétiques apparaissent dès qu'une cellule est soumise à un rayonnement ionisant cependant, la traduction clinique de ces effets n'est mesurable qu'au delà de 0,5 Gy avec la chute légère des lymphocytes (Flüry-Herard A, 1991) en irradiation X ou gamma.

*Les effets déterministes :*

- Les effets immédiats ou précoces : ils n'apparaissent que pour des doses élevées.

## II. LES DOMMAGES DE L'IRRADIATION SUR LE CORPS HUMAIN DÉPENDENT DE LA DOSE REÇUE.

---

- Les effets somatiques tardifs : ils se manifestent après plusieurs années.
- Les effets tératogènes : ils correspondent à l'atteinte de l'embryon ou du fœtus.

### *Les effets stochastiques.*

- L'accroissement de l'occurrence de cancers due aux mutations induites par les RI sur l'ADN.
- Les mutations induites par les RI sur les gamètes peuvent entraîner des pathologies chez l'embryon ou un défaut de fonctionnalité des gamètes.

Les effets déterministes sont connus et dépendent de l'organe touché.

A partir de la dose de 0,7 Gy apparaît un prodrome d'ordre neurovégétatif qui se traduit par des atteintes neurologiques et digestives légères ne mettant pas en péril le pronostic vital:

- Asthénie, apathie et céphalées.
- Nausées, vomissements, diarrhées.

Dans le cas d'une irradiation localisée au niveau de la peau, les symptômes sont divisés en effets précoces et effets tardifs. Les effets précoces concernent les pathologies liées à l'irradiation de l'épiderme uniquement. Pour des doses croissantes s'étalant de 4 à 25 Gy se développent une épilation transitoire simple (4-5 Gy), un érythème (6-12 Gy), une radiodermite sèche (12-15 Gy), une radiodermite exsudative (15-20 Gy) et enfin une radionécrose (25-30 Gy).

Les effets tardifs sont liés aux atteintes de l'épiderme, du derme et de l'hypoderme. Toujours dans le cas d'une irradiation cutanée localisée se développent donc également une atrophie cutanée, une sclérose cutanée et sous-cutanée, des troubles de la pigmentation et des telangiectasies.

Le premier syndrome à apparaître lors d'une irradiation corporelle totale (ICT) est le syndrome hématologique pour des doses supérieures à 0,5 Gray. Les symptômes cliniques de cette affection sont liés à une aplasie médullaire avec pancytopénie. Ceci entraîne de manière précoce des hémorragies et des infections et de manière tardive une anémie. La mort peut survenir en quelques semaines dans les cas les plus graves mais une guérison est possible en l'absence de soins en

## II. LES DOMMAGES DE L'IRRADIATION SUR LE CORPS HUMAIN DÉPENDENT DE LA DOSE REÇUE.

---

dessous de la dose létale pour 50% des individus dans les 30 jours qui suivent l'exposition, soit 4 à 4,5 Gy chez l'Homme (DL50/30) (Mole RH et al, 1984).

A partir de 10 Gy se développe le syndrome gastro-intestinal (Baranov et al, 1994). Celui-ci est caractérisé cliniquement par le développement de pathologies liées à la destruction des muqueuses:

- Diarrhées
- Infections
- Hémorragies digestives
- Déshydratation
- Occlusions, perforations et invaginations

A cette dose d'irradiation, des traitements palliatifs tels que des transfusions et une antibiothérapie sont proposés pour améliorer le pronostic vital. De plus les syndromes associés cutanés ou hématopoïétiques doivent être également pris en charge. A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement efficace du syndrome gastro-intestinal et dans les cas les plus sévères celui-ci entraîne la mort des individus en 5 à 10 jours après sa survenue (Monti P et al, 2005).

Enfin, pour des irradiations très sévères avec doses de radiations ionisantes reçues comprises entre 20 et 50 Gy se développe le syndrome cérébrovasculaire. Apparaissent alors des troubles de l'activité motrice, des signes méningés, des altérations sensorielles et un coma dans les cas extrêmes. Le décès intervient rapidement entre 48 heures et une semaine après l'irradiation.

Toutes les manifestations cliniques précitées s'accumulent avec l'augmentation de la dose d'exposition, un individu atteint du syndrome cérébrovasculaire développerait également les syndromes hématopoïétique et gastro-intestinal. Pour des doses d'irradiation élevées, le décès intervient donc suite à un dysfonctionnement général des organes appelé défaillance multi-viscérale (*Multiple organ failure* ou MOF) (Konchalovsky MV et al, 2005). En outre, le MODS/MOF est une conséquence majeure du SAI pour laquelle aucun traitement n'existe actuellement.

D'autres effets de l'irradiation se développent plus tardivement et sont une cause élevée de morbidité retardée. Ces effets sont principalement dus aux dommages subis par l'ADN des cellules

## II. LES DOMMAGES DE L'IRRADIATION SUR LE CORPS HUMAIN DÉPENDENT DE LA DOSE REÇUE.

conduisant à l'apparition de certains cancers, les plus courantes dans le cas d'une ICT étant les leucémies. Dans les cas de contamination radioactive comme ce fut le cas lors de l'accident de Tchernobyl, le cancer le plus fréquent est celui de la thyroïde causé par la fixation dans cet organe d'iode 131. De plus l'exposition aux rayonnements ionisants de femmes enceintes peut avoir des effets tératogènes qui dépendent du stade de la grossesse. En période de préimplantation de l'embryon, la nidation peut être empêchée. Lors de l'organogenèse l'irradiation peut donner suite à des malformations congénitales; enfin, en période fœtale un retard mental et/ou de croissance peut survenir .

Dose en gray	Symptômes
< 0,5 Gy	Aucun signe clinique, risque tératogène possible
0,5 Gy < dose < 1Gy	Chute légère du nombre de lymphocytes
1 Gy < dose < 2 Gy	Nausées, vomissements, céphalées pendant 24 à 48 heures, chute précoce des lymphocytes, chute transitoire des éléments figurés du sang
2 Gy < dose < 5Gy	Nausées et vomissements précoces, asthénie, hyperthermie, chute rapide des lymphocytes, diarrhée
5 Gy < dose < 20Gy	Aplasie médullaire profonde, atteintes morphologiques des tissus, destruction des épithéliums, troubles digestifs majeurs, hémorragies. Cette fourchette de dose, supérieure à la DL50, conduit à une mortalité élevée à 60 jours.
> 20 Gy	État de choc, troubles neurologiques : désorientation et convulsions, réactions cutanées précoces : irradiation supra-létale coma et mort dans les 14 à 36 heures.

**Tableau 1:** *Évolution clinique d'un individu en fonction de la dose de radiations ionisantes reçue en irradiation corporelle totale (en rose, effets pour des doses dites infracliniques).*

*Nota bene : la DL<sub>50</sub> chez l'homme est de l'ordre de 4 à 4,5Gy (Mole RH et al, 1984).*

Différents syndromes apparaissent au-delà d'une dose seuil d'irradiation. Cependant des atteintes fonctionnelles peuvent être observées pour des doses infra-cliniques. Le **Tableau 2** reprend en fonction de la dose les différentes atteintes.

## II. LES DOMMAGES DE L'IRRADIATION SUR LE CORPS HUMAIN DÉPENDENT DE LA DOSE REÇUE.

Syndrome	Dose en Gy	1	5	10	20	50
Atteintes morphologiques						
Hématopoïétique						
Gastro-intestinal						
Neurologique						
Atteintes fonctionnelles						
Hématopoïétique						
Gastro-intestinal						
Neurologique						

**Tableau 2:** Atteintes morphologiques et fonctionnelles en fonction de la dose d'irradiation reçue. pour les fonctions hématopoïétique, gastro-intestinale et neurologique.

Si l'on considère les irradiations accidentelles, par définition inhomogènes, la survenue du syndrome hématopoïétique est d'autant plus probable que la surface atteinte est étendue. Le syndrome gastro-intestinal apparaît pour des doses plus élevées mais il se précise en concomitance avec le syndrome hématologique. Le syndrome neurologique n'est observé que pour des doses au-delà des possibilités thérapeutiques actuelles.

L'effet de l'irradiation diffère selon le degré d'immaturation des cellules lésées. En effet, la radiosensibilité des cellules dépend de la prolifération cellulaire : une cellule en mitose est beaucoup plus sensible du fait de la structure de son ADN monocaténaire (absence des histones). Dès 1906 Bergonié et Tribondeau (Bergonié et Tribondeau, 1906) avaient édicté le postulat selon lequel plus une cellule prolifère rapidement, plus elle est radiosensible. Ainsi, les effets de l'exposition aux RI sur le tissu hématopoïétique sont conditionnés par la structure hiérarchisée et tri-compartmentée de ce dernier. Il faut distinguer le compartiment des cellules souches, définies par leur capacité d'auto-renouvellement, le compartiment des progéniteurs qui sont engagés dans une voie de maturation et le compartiment comportant les cellules matures.

Les progéniteurs engagés dans une voie de prolifération et de maturation sont les plus radiosensibles, car ce sont des cellules cyclantes (dose 37% de survie ou  $D_0$  de l'ordre de 1 Gy). Quant aux cellules souches, leur état de quiescence leur confère un certain niveau de radiorésistance. A l'exception des lymphocytes, qui conservent une capacité de division mitotique dans leur état différencié, les cellules matures sont radiorésistantes. En effet, les globules rouges et les plaquettes sont des éléments anucléés, et les polynucléaires matures ne se divisent plus.

L'aplasie médullaire radio-induite est la résultante de la mortalité cellulaire des compartiments des progéniteurs immatures et de maturation (dépendant de la dose d'irradiation) ainsi que de la durée de vie des cellules matures (indépendamment de la dose). Ainsi les périodes de neutrothrombopénie et lymphopénie sont liées à la mort de la fraction cyclante et à la dépopulation des cellules matures. Les processus de différenciation et d'auto-renouvellement sont d'autant plus perturbés que le micro-environnement médullaire est lésé par les RI.

La gravité de l'aplasie médullaire dépend de la dose et de l'hétérogénéité de distribution. En pratique, une irradiation de 2 à 5 Gy (dose moyenne) conduit à une insuffisance médullaire suivie d'une reconstitution hématopoïétique vers la 4<sup>e</sup>-5<sup>e</sup> semaine après irradiation. Des doses supérieures, de l'ordre de 5 à 15 Gy, sont fortement myélo-toxiques avec pour conséquence une restauration très lente, voire absente. La reprise de l'hématopoïèse endogène se fera tardivement via les cellules souches pluripotentes « vraies » dont l'activité transcriptionnelle est lente, nécessitant un grand nombre de divisions cellulaires pour renouveler le compartiment sanguin.

Ainsi, les traitements de l'aplasie médullaire radio-induite devront permettre :

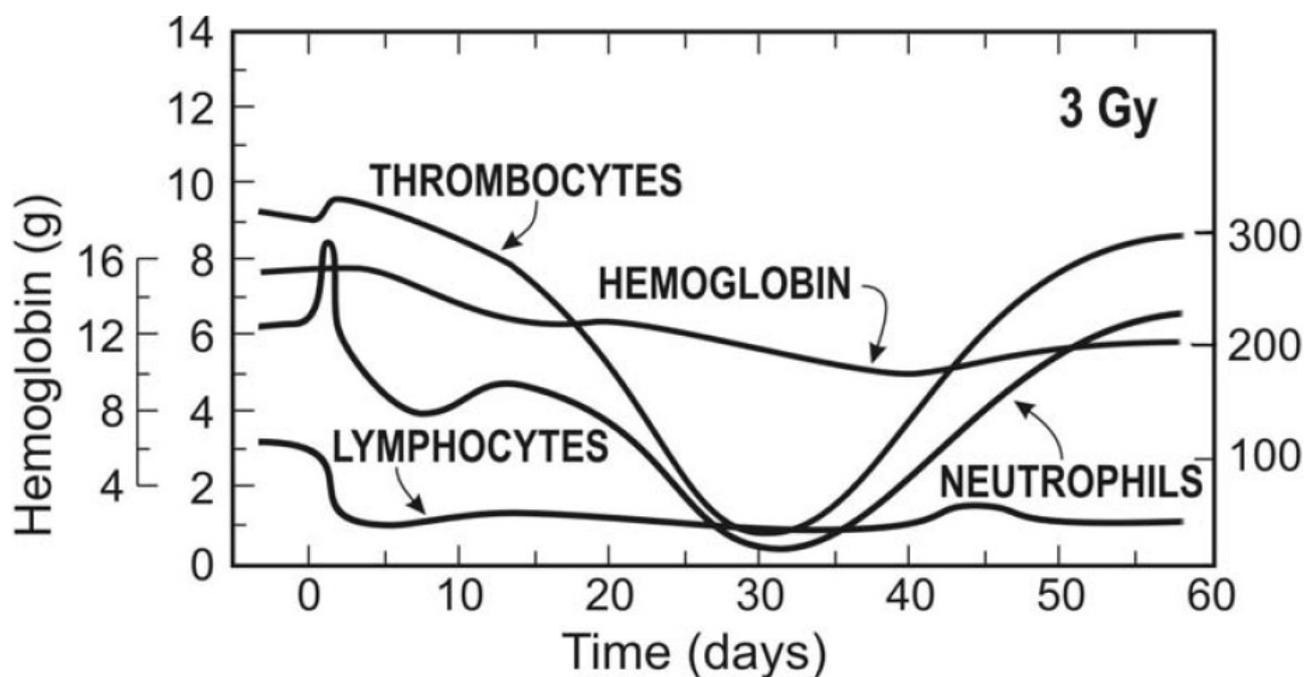
- d'assurer la couverture de la phase initiale de neutro- et thrombopénie dans l'attente d'une reprise endogène.
- d'assurer une reconstitution à long terme de l'hématopoïèse en l'absence de reprise endogène.

### **III. Le syndrome hématopoïétique est la composante majeure du SAI et doit être toujours pris en charge quelles que soient les pathologies associées.**

Lors d'une exposition aux RI au-delà de la dose de 0,5 Gy, le syndrome hématopoïétique se développe. Les causes de morbidité relatives à ce syndrome sont le risque hémorragique (anémie

### III. LE SYNDROME HÉMATOPOÏÉTIQUE EST LA COMPOSANTE MAJEURE DU SAI ET DOIT ÊTRE TOUJOURS PRIS EN CHARGE QUELLES QUE SOIENT LES PATHOLOGIES ASSOCIÉES.

liée aux saignements diffus induits par l'absence d'hémostase plaquettaire) et le risque infectieux. L'anémie induite par le dépeuplement des territoires médullaires intervient plus tardivement que celle due aux hémorragies. Dans tous les cas l'anémie apparaît plus tardivement que la neutropénie et la thrombocytopénie (**illustration 3**). De plus, la profondeur de l'aplasie possède un impact négatif sur les possibilités de survie dans un contexte de syndrome gastro-intestinal. Effectivement, en cas d'irradiation localisée ou d'irradiation corporelle totale hétérogène conduisant au développement d'un syndrome gastro-intestinal, la survie dépend alors de la dose reçue et du niveau d'épargne médullaire. La restauration du système hématologique est donc une priorité dans la perspective du traitement du SAI.



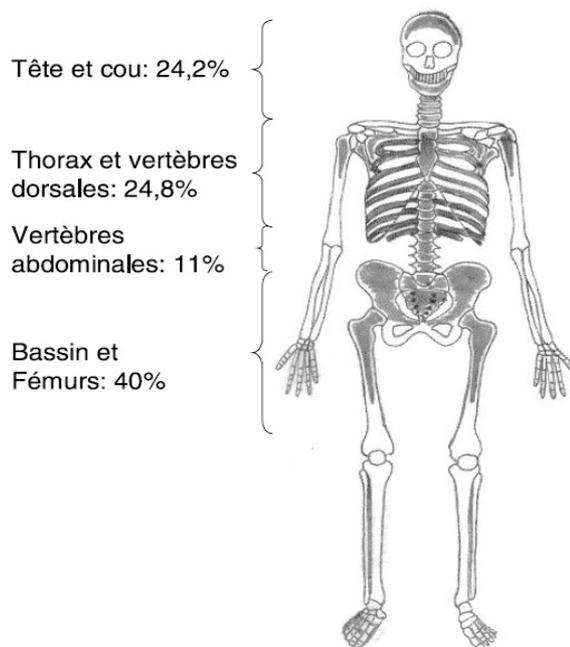
**Illustration 3:** Effets d'une irradiation corporelle totale à 3 Gy sur le système hématopoïétique (Cerveny T J et al, 1989).

#### III.1 L'hématopoïèse humaine.

L'hématopoïèse est la fonction qui permet à l'organisme de renouveler les éléments figurés du sang matures assurant l'homéostasie du tissu hématologique. Les lymphocytes, granulocytes, monocytes et plaquettes et les hématies ont une durée de vie limitée dans l'organisme et sont donc

### III. LE SYNDROME HÉMATOPOÏÉTIQUE EST LA COMPOSANTE MAJEURE DU SAI ET DOIT ÊTRE TOUJOURS PRIS EN CHARGE QUELLES QUE SOIENT LES PATHOLOGIES ASSOCIÉES.

produits en permanence au niveau de la moelle osseuse (**illustration 4**).



**Illustration 4:** Répartition de la moelle osseuse fonctionnelle dans le squelette d'un homme de 30 ans environ. Les zones d'hématopoïèse sont indiquées en gris foncé. D'après les données de Cristy (1981). Illustration issue de (Bertho JM, 2006)

L'hématopoïèse comporte trois stades distincts hébergeant les cellules souches pluripotentes, les progéniteurs et les précurseurs hématopoïétiques. Le passage d'un stade à l'autre se fait par l'intermédiaire de signaux chimiques et par des interactions de contact entre les cellules du micro-environnement et les cellules souches elles-mêmes.

Le stade des cellules souches pluripotentes est constitué de cellules souches très immatures et peu cyclantes pouvant se différencier en la totalité des éléments figurés du sang. Ce stade est considéré comme étant le moins radiosensible du fait de la condensation de l'ADN de ses cellules en quiescence. Les CSH pluripotentes sont caractérisées chez l'Homme par le phénotype antigénique  $CD34^+/Lin^-$ . Chez la souris ces cellules possèdent les marqueurs  $LIN^-/SCA-1^+/KIT^+$  où l'expression de Kit serait liée à la quiescence des CSH (Thorén LA et al, 2008). En effet seule une fraction des CSH est quiescente, en fonction des facteurs hormonaux et microenvironnementaux ces cellules entrent en cycle et se différencient.

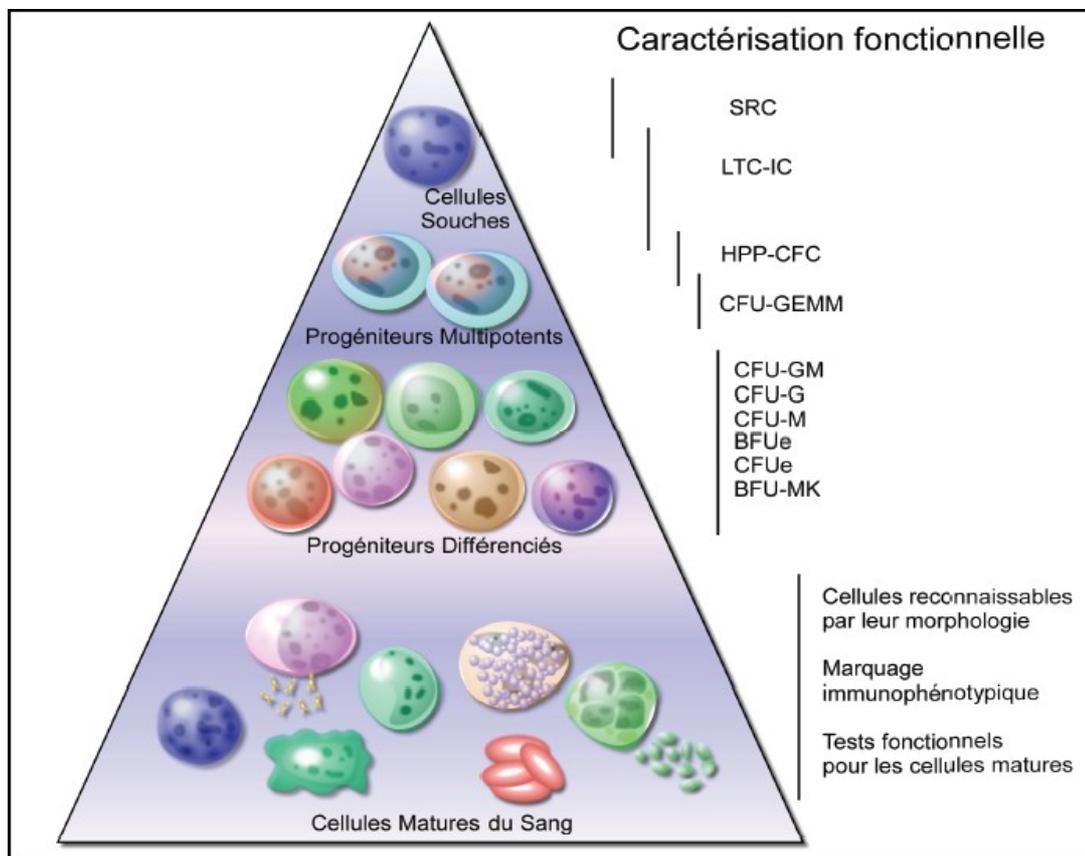
Le stade des progéniteurs comporte des cellules plus matures ayant perdu leur pluripotence.

**III. LE SYNDROME HÉMATOPOÏÉTIQUE EST LA COMPOSANTE MAJEURE DU SAI ET DOIT ÊTRE TOUJOURS PRIS EN CHARGE QUELLES QUE SOIENT LES PATHOLOGIES ASSOCIÉES.**

Ces progéniteurs multipotents sont cependant capables de proliférer et d'être à l'origine de plusieurs types de cellules matures. Un même progéniteur commis pourra, par exemple, se différencier en granulocyte et monocyte, mais pas en érythrocyte.

Les précurseurs sont les cellules précédant immédiatement la cellule mature et fonctionnelle. Ils ne peuvent se différencier qu'en un seul type cellulaire et sont déjà morphologiquement reconnaissables.

Les cellules matures sont libérées dans la circulation sanguine (**Illustration 5**).



**Illustration 5:** Représentation schématique de l'hématopoïèse. La CS hématopoïétique est capable de s'auto-renouveler et d'assurer la production des cellules matures et des éléments figurés du sang. A chaque stade est associé le test fonctionnel permettant de les identifier.

### **III.2 Les traitements existants du syndrome hématologique visent principalement à stimuler les CSH résiduelles par cytokinothérapie ou à effectuer une greffe thérapeutique.**

Le syndrome hématologique est une composante majeure du syndrome aigu d'irradiation (SAI). Il est dû à la destruction de la moelle osseuse alors incapable d'assurer sa fonction de renouvellement des cellules sanguines. La profondeur et la durée de l'aplasie médullaire dépendent notamment de la dose reçue et du pourcentage de territoires médullaires épargnés.

L'aplasie induite par l'exposition aux RI est la première cause de morbidité ou de mortalité par elle-même ou en association avec d'autres lésions combinées pour des doses moyennes d'irradiation à partir de 5 Gy, lutter contre cette dernière est un objectif fondamental dans la thérapie des irradiés accidentels.

A la suite des greffes de moelle osseuse proposées à 5 irradiés yougoslaves par l'équipe du professeur Mathé (Mathé et al, 1963) le traitement de l'aplasie médullaire radio-induite (RI) reposait jusqu'aux années 80 sur la greffe de moelle osseuse allogénique. Cette approche a cependant montré ses limites lors de l'accident de Tchernobyl en 1986. En effet, le caractère hétérogène des irradiations accidentelles conduit à une sous-exposition de certains territoires médullaires et donc à une épargne des foyers médullaires correspondants, à l'origine d'une reprise d'immunocompétence. Un tel contexte est donc défavorable à la prise du greffon avec une augmentation du taux de rejet de greffe et un risque majeur de réaction du greffon contre l'hôte (GVH). Ces conflits immunitaires sont vraisemblablement générateurs de MODS/MOF. Par ailleurs, la recherche de donneurs immunologiquement compatibles reste un point délicat du fait de la grande variabilité des marqueurs du complexe majeur d'histocompatibilité, de la nécessité de trouver rapidement après l'accident un donneur et ce d'autant plus que l'on considère des scénarios d'accidents d'irradiation touchant un grand nombre de victimes (Dainiak N et Ricks RC, 2005).

Le recours à une greffe de moelle osseuse doit être modulé par le problème principal de la thérapie des irradiés accidentels. Celui-ci réside dans le nombre de cellules souches hématopoïétiques résiduelles de l'individu et de leur capacité à restaurer l'hématopoïèse endogène.

C'est pourquoi le développement de nouvelles approches thérapeutiques s'est avéré

### III. LE SYNDROME HÉMATOPOÏÉTIQUE EST LA COMPOSANTE MAJEURE DU SAI ET DOIT ÊTRE TOUJOURS PRIS EN CHARGE QUELLES QUE SOIENT LES PATHOLOGIES ASSOCIÉES.

---

indispensable. Ainsi, pour des doses intermédiaires d'irradiation (2 – 7 Gy), l'arsenal thérapeutique s'est trouvé renforcé par l'utilisation de facteurs de croissance hématopoïétiques capables de stimuler l'hématopoïèse résiduelle. Dans ce contexte, le GM-CSF (*granulocyte and monocyte – colony stimulating factor*) et le G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*) ont prouvé leur capacité de stimulation de la granulopoïèse. L'efficacité du traitement par injection de cytokines a été démontrée chez l'animal par (Mac Vittie TJ et Farese AM, 1995). Cependant, la stimulation de la thrombopoïèse reste un point d'achoppement, bien qu'il existe des facteurs thrombopoïétiques disponibles mimant les effets de la TPO. Enfin, l'efficacité des cytokines décroît notablement dans les cas d'éradication médullaire sévère.

Dans ce cadre, l'unité de Radio-Hématologie Expérimentale de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées, a développé une stratégie thérapeutique novatrice chez le primate non humain (PNH) (Drouet et al, 2004) basée sur l'administration *in vivo* de molécules anti-apoptotiques (cytokinothérapie anti-apoptotique d'urgence ou CKAU), le but de la CKAU diffère de la thérapie par l'utilisation du G-CSF d'une part par la précocité du traitement (dans les heures suivant l'exposition) et d'autre part par le fait qu'elle ne vise pas en premier lieu à stimuler les CSH résiduelles mais à augmenter le pool initial de ces CSH en limitant leur apoptose. Cette approche prometteuse nécessite cependant que la nature radiologique de l'accident soit détectée de manière précoce afin de préserver le plus possible de CSH résiduelles.

Une dernière possibilité de thérapie est l'expansion *ex vivo* des cellules souches résiduelles collectées rapidement après l'irradiation dans un but d'autogreffe .

Cette dernière approche s'est révélée décevante en raison de l'impossibilité, dans le cas d'irradiations sévères nécessitant un soutien thérapeutique cellulaire, de prélever un nombre suffisant de cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques résiduels préservés sur les plans quantitatif et qualitatif pour constituer un greffon après expansion *ex vivo*.

L'utilisation coordonnée du G-CSF et d'une greffe de cellules hématopoïétiques amplifiées *in vitro* n'a pas amélioré les différents paramètres hématopoïétiques chez le PNH par rapport à l'utilisation du G-CSF seul (Bertho JM et al, 2005).

La régulation de la CSH est donc un élément clé de la thérapie du syndrome hématopoïétique, cette régulation est assurée par le microenvironnement des CSH au niveau de la niche hématopoïétique (Dominici M et al, 2009).

## **IV. Les différents acteurs de la niche hématopoïétique sont indispensables à sa fonctionnalité.**

### **IV.1 Une reconstitution hématopoïétique à long terme ne peut se produire sans une reconstruction de la niche.**

L'hématopoïèse se déroule dans un micro-environnement unique qui favorise l'auto-renouvellement et soutient la différenciation des progéniteurs. Chacune de ces activités requiert différents facteurs de croissance et protéines d'adhérence, apportés aux cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans des compartiments spécifiques du micro-environnement médullaire. Ainsi, il existe des zones favorisant l'auto-renouvellement et des zones favorisant la différenciation. *In vitro*, les cellules stromales de la moelle osseuse sont utilisées comme sources de facteurs de croissance intervenant dans le processus de l'hématopoïèse. Le stroma hématopoïétique est composé de multiples types cellulaires comprenant des fibroblastes, des macrophages, des cellules endothéliales et des adipocytes. Il est difficile d'évaluer l'importance relative de chacun de ces types cellulaires, mais il a été montré que les contacts cellulaires directs, la production de matrice extracellulaire et la sécrétion de cytokines sont nécessaires à la formation et à la maturation des cellules hématopoïétiques *in vitro*. Le rôle des cellules stromales de la moelle osseuse *in vivo* est beaucoup moins connu. Leur rôle est d'autant plus complexe à définir que trois types de micro-environnements, ou niches, ont été identifiés : une zone endostéale, une zone vasculaire et la zone formée par les cellules voisines des CSH.

### IV.1.1 La niche endostéale.

La niche endostéale a été décrite pour la première fois par les équipes de Zhang *et al* et Calvi *et al* en 2003 (Zhang J et al, 2003); (Calvi LM et al, 2003).

Cette niche se situe au contact direct des os et est composée de différents types cellulaires : les cellules souches mésenchymateuses, les ostéoblastes, les fibroblastes, les macrophages et adipocytes. La plupart des protéines d'adhérence entre ces cellules activent la quiescence des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ces cellules sécrètent également des molécules allant dans le sens de la quiescence et de l'auto-renouvellement. Par exemple, l'angiopoïétine 1, sécrétée par les cellules souches mésenchymateuses (CSM) et les ostéoblastes se fixe sur le récepteur Tie2 des CSH et active la dormance de ces cellules (Gomei Y et al, 2010). De plus, certaines molécules de la matrice extracellulaire telles que l'ostéopontine et l'acide hyaluronique présents dans la niche endostéale et capables d'interagir avec le récepteur CD44 des CSH inhibent la prolifération et la différenciation des CSH. Enfin, la faible concentration en oxygène présente au niveau de cette niche est également défavorable à une activation des cellules (**illustration 6**).

Il apparaît donc que, dans une situation d'homéostasie, très peu de cellules souches hématopoïétiques s'engageraient dans un processus de différenciation. Cependant, les cellules du micro-environnement sécrètent également la chimiokine CXCL12 (ou SDF-1) qui active la migration des CSH et permet leur passage vers la niche vasculaire en fonction du gradient croissant de cette chimiokine (Hattori K et al, 2003)(**illustration 7**).

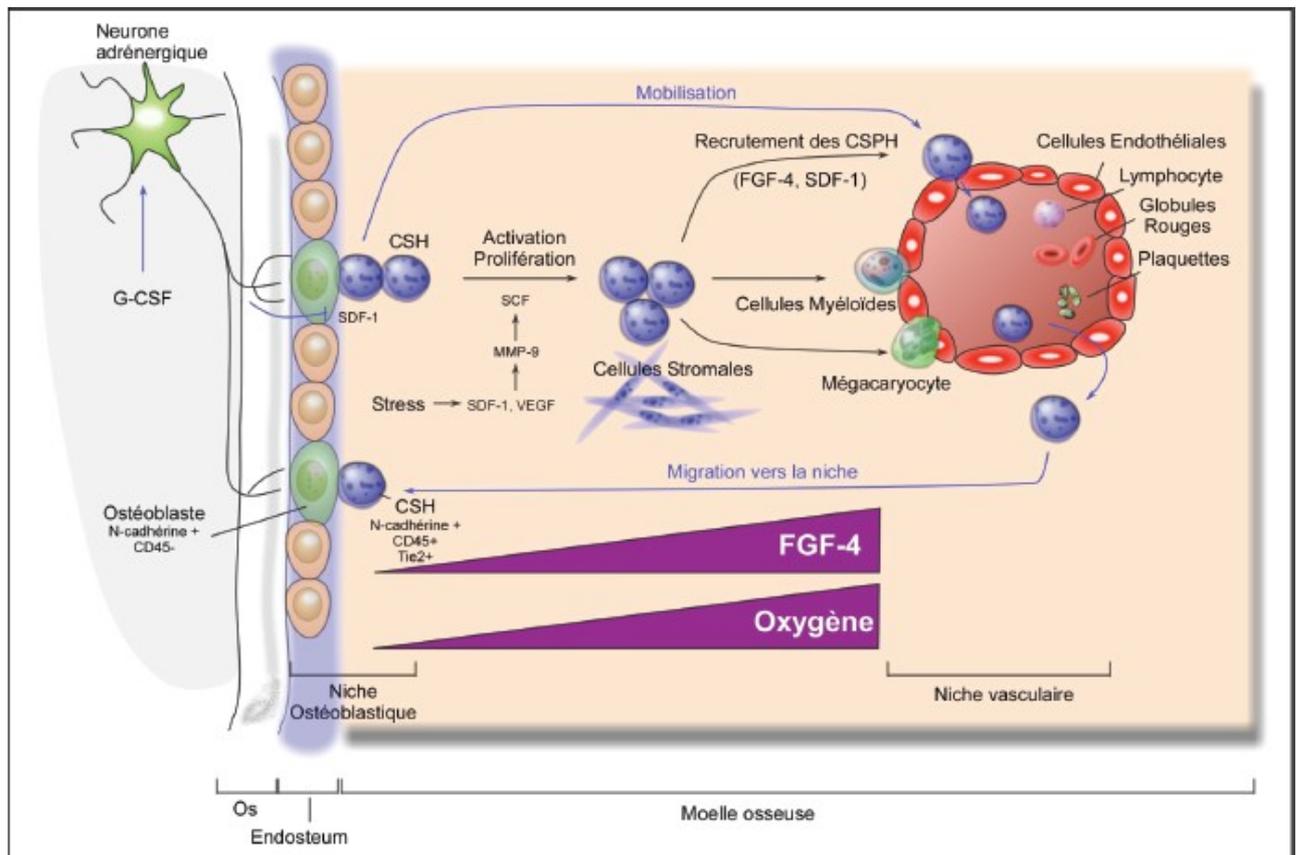
D'autres résultats ont suggéré que les cellules ostéoblastiques sont une composante de la niche hématopoïétique du fait de leur localisation et de l'expression de nombreux facteurs de croissance (Taichman, 2005). Deux études publiées simultanément ont apporté des informations sur la localisation *in vivo* de la niche hématopoïétique, sur sa structure cellulaire et sur les signaux moléculaires mis en jeu. Dans la première étude, des souris invalidées pour l'expression du récepteur IA du BMP (*Bone Morphogenic Protein*) ont été utilisées pour montrer que l'inhibition de la voie de signalisation des BMP entraîne l'augmentation du nombre d'ostéoblastes N-cadhérine+ CD45- corrélée à l'augmentation du nombre de CSH (Zhang J et al, 2003). Dans la deuxième étude, un modèle de souris transgénique exprimant constitutivement la PTH (*parathyroid hormone*) ou son récepteur PPR (*PTH/PTH related protein receptor*) sous le contrôle du promoteur du collagène  $\alpha 1$  a été utilisé (Calvi LM et al, 2003). Ces molécules interviennent dans la régulation de l'homéostasie

#### IV. LES DIFFÉRENTS ACTEURS DE LA NICHE HÉMATOPOÏÉTIQUE SONT INDISPENSABLES À SA FONCTIONNALITÉ.

---

du calcium et donc dans la formation et la résorption osseuse. Les cellules ostéoblastiques stimulées par la voie des PPR ont proliféré et ont consécutivement permis d'augmenter le nombre de CSH. Il a été montré qu'à l'inverse, un déficit en ostéoblastes engendrait une diminution du nombre de cellules hématopoïétiques y compris de CSH (Visnjic D et al, 2004). Cette relation intime entre CSH et ostéoblaste est possible grâce à des processus d'adhérence qui impliquent de nombreuses molécules comme : VLA-4 (*Very Late Antigen-4* ;  $(\alpha_4\beta_1)$ ), VLA- 5 ( $\alpha_5\beta_1$ ), VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*), CD34, CD44, CD164, ICAM-1 (*Intracellular Cell Adhesion Molecule-1*), ICAM-3, LFA-1 (*Lymphocyte Function-Associated Antigen-1*), LFA-3, PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*). De plus des cytokines associées aux cellules ou liées à la matrice comme l'interleukine-3 (IL-3), le FLT-3L (*fms-like tyrosine kinase-3 ligand*), le GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*), le SCF et le TGF- $\beta_1$  peuvent elles aussi servir de molécule d'adhérence. Le mécanisme permettant aux CSH de venir s'associer aux ostéoblastes est encore mal connu. Des études récentes suggèrent que la N-cadhérine, Tie2 et Jagged-1 sont impliqués dans ce processus (Calvi LM et al, 2003);(Zhang J et al, 2003);(Arai F et al, 2004). Un élément important lié au maintien de l'immaturation des CSH est la très faible tension en oxygène au niveau de la niche ostéoblastique. Dans l'organisme, les cellules se trouvent dans des conditions où le pourcentage d'O<sub>2</sub> varie de 14% à moins de 0,4% (Porwol T et al, 2001). Dans la moelle osseuse, cette valeur est particulièrement faible car elle varie de 2 à 4% à proximité des artérioles et certaines études suggèrent que certaines zones de la moelle osseuse sont en anoxie (Chow DC et al, 2001); (Antoniou ES et al, 2004) et que c'est dans ces zones que les CSH sont localisées (Nilsson SK et al, 2001). Des études *in vitro* montrent que la culture de cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques (CSPH) dans des conditions d'hypoxie favorise l'auto-renouvellement et limite les phénomènes de différenciation (Hermitte F et al, 2003).

#### IV. LES DIFFÉRENTS ACTEURS DE LA NICHE HÉMATOPOÏÉTIQUE SONT INDISPENSABLES À SA FONCTIONNALITÉ.



**Illustration 6:** La niche ostéoblastique et la niche vasculaire dans la moelle osseuse. La niche ostéoblastique permet de maintenir quiescentes les CSH et leur permet ainsi de conserver leur immaturité. Seuls quelques ostéoblastes (en vert) ont la capacité de former une niche pour les CSH. La niche vasculaire participe à la migration transendothéliale des CSH (lors de la mobilisation ou de la re-médullarisation) et favorise leur prolifération et leur différenciation. (Yin T et Li L, 2006)

##### IV.1.2 La niche vasculaire.

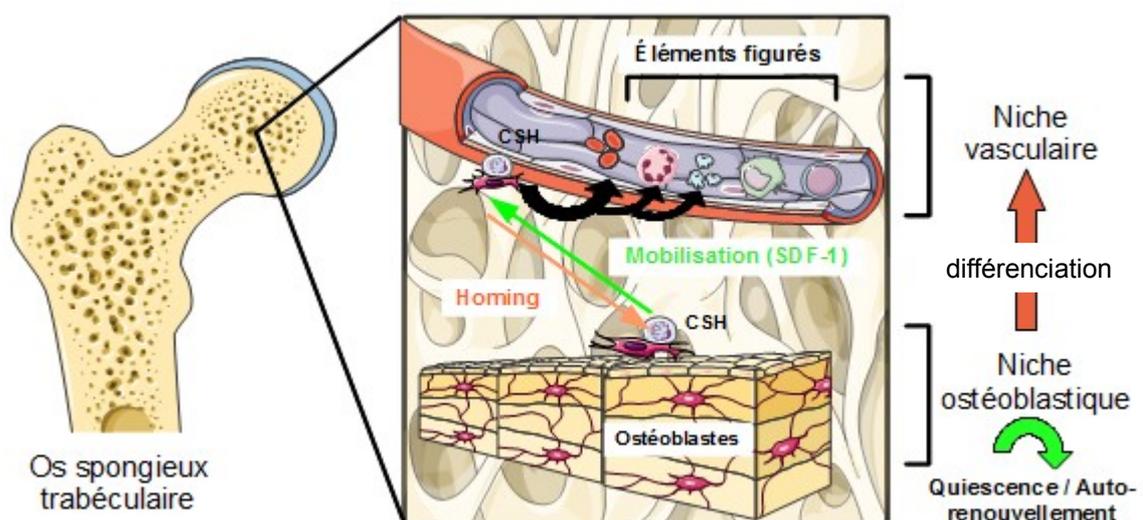
La première description de la niche vasculaire des CSH a été proposée par l'équipe de Heissig *et al* en 2002 (Heissig B et al, 2002). Ces travaux ont montré qu'une métalloprotéinase (MMP9) située au contact de l'endostéum pouvait cliver le SCF présent sur la membrane des cellules stromales du microenvironnement. Ce SCF libéré induirait alors l'entrée en cycle des CSH et l'augmentation de leur mobilité permettant leur passage vers la niche vasculaire.

Cette niche est située au contact de l'endothélium de la moelle osseuse. Ce compartiment est composé des cellules endothéliales et de cellules réticulaires capables de sécréter le CXCL12. La niche vasculaire est impliquée dans les processus de différenciation des CSH, l'interaction entre les

#### IV. LES DIFFÉRENTS ACTEURS DE LA NICHE HÉMATOPOÏÉTIQUE SONT INDISPENSABLES À SA FONCTIONNALITÉ.

progéniteurs engagés dans la voie de différenciation mégacaryocytaire et les cellules endothéliales de la moelle osseuse a un effet positif sur la thrombopoïèse (Avecilla ST et al, 2004). Il a été démontré que ces cellules endothéliales particulières situées au niveau des sinusoides auraient une origine et un phénotype différent des autres cellules endothéliales microvasculaires de l'organisme (Rafii S et al, 2002).

Une forte concentration en oxygène associée à la proximité des facteurs solubles pro-différenciants présents dans le sang tels que l'érythropoïétine ou la thrombopoïétine pousse les cellules souches à se différencier en éléments figurés matures. Toutefois, des facteurs angiogéniques comme le VEGF et l'angiopoïétine-1 ont un rôle important pour le soutien aux CSH. Le VEGF est la principale molécule de régulation de la formation des vaisseaux sanguins et de l'hématopoïèse. En utilisant de petites molécules intracellulaires inhibant l'activité tyrosine des VEGFR, Gerber *et al.* ont démontré que le VEGF régule la survie des CSH grâce à un mécanisme autocrine (Gerber HP et al, 2002). L'angiopoïétine-1, en se liant à son récepteur Tie-2, prévient l'entrée en division des cellules, permet le maintien de la quiescence et de l'immaturité des CSH et protège ces dernières de stress myélosuppresseurs (Arai F et al, 2004). Dans la zone ostéoblastique, les CSH sont maintenues en quiescence, alors que dans la niche vasculaire, les CSH se divisent. La migration séquentielle des cellules hématopoïétiques, débutant avec les CSH dans la niche ostéoblastique, permet leur prolifération et leur différenciation jusqu'à la maturation. Durant cette étape, les cellules migrent à travers le tissu médullaire vers la niche vasculaire.



**Illustration 7:** Niches hématopoïétiques et ostéoblastiques. Fonctions et mobilité des CSH en fonction du gradient de SDF-1.

Différents facteurs solubles interviennent dans le microenvironnement pour réguler l'hématopoïèse. Ces facteurs sont des glycoprotéines qui vont agir avec une grande spécificité fonctionnelle et vont permettre de réguler les processus de différenciation et d'auto-renouvellement nécessaires au maintien de l'homéostasie tissulaire. Encore aujourd'hui, on ne connaît pas toutes les interactions qui existent entre les cellules hématopoïétiques et les composants circulants ou ceux qui sont propres au micro-environnement. Cependant, il est connu que les cellules stromales (les cellules endothéliales, les fibroblastes, les adipocytes et les ostéoblastes) ainsi que les monocytes/macrophages et les lymphocytes produisent la plupart des facteurs de croissance nécessaires au développement des cellules hématopoïétiques.

Au niveau de la niche endostéale, les facteurs sécrétés par les ostéoblastes tels que le TGF- $\beta$  et l'ostéopontine inhibent la prolifération des CSH et les maintiennent quiescentes. *A contrario* le SCF, le Flt3-L, l'Il-1, l'Il-6 et la TPO sont des facteurs qui activent la prolifération et la différenciation des CSH. Les protéoglycanes sont des macromolécules complexes, formées de glycosaminoglycanes (GAG) ou mucopolysaccharides acides, constitués d'une épine dorsale peptidique sur laquelle se branchent des chaînes polysaccharidiques linéaires constituant l'acide hyaluronique, le chondroïtine sulfate, le kératane sulfate, l'héparane sulfate. Les protéoglycanes par leurs charges polyanioniques forment des agrégats qui jouent un rôle important dans les mouvements de l'eau, et la stabilisation des fibres de collagènes. Ils interviennent dans l'adhérence des précurseurs hématopoïétiques au stroma et dans la fixation de facteurs de croissance. Les glycosaminoglycanes se fixent à d'autres molécules comme la fibronectine, et lient le GM-CSF et l'IL3. A la surface cellulaire, les héparanes sulfates permettent l'adhérence des cellules progénitrices aux cellules du stroma.

### **IV.2 Les CSH, les cellules souches mésenchymateuses et les progéniteurs endothéliaux sont les cellules à partir desquelles tous les éléments de la niche hématopoïétique sont produits.**

En médecine régénérative, les cellules souches adultes, bien que possédant un potentiel de variété de différenciation moindre que les cellules souches embryonnaires, sont utilisées de façon préférentielle pour des raisons aussi bien éthiques que techniques. Les cellules souches adultes ne

peuvent cependant pas remplacer les CS embryonnaires; les cellules les plus intéressantes en termes de potentialité de différenciation seraient les CS du sang placentaire et les iPSC (cellules souches reprogrammées à partir de cellules différenciées) (Wernig M et al, 2007).

##### **IV.2.1 La notion de cellule souche.**

La notion de cellule souche (CS) a été dégagée pour la première fois à propos du tissu hématopoïétique (Ford CE et al, 1956); (Till JE et McCulloch EA, 1961). Chez la souris, l'existence d'une cellule souche multipotente a été prouvée par l'expérience de Till et McCulloch. L'irradiation à 10 Gy d'une souris détruit son tissu hématopoïétique et induit une aplasie médullaire mortelle en l'absence de greffe de moelle osseuse. Au contraire, si une greffe est réalisée après l'irradiation l'animal ne décède pas d'insuffisance médullaire. Vers le 10<sup>e</sup> jour sa rate est remplie d'amas cellulaires macroscopiques. Ces colonies sont mixtes c'est-à-dire constituées de cellules appartenant à plusieurs lignées cellulaires. Une colonie observée correspondant à une cellule souche injectée. On les appelle CFU-S (*Colony Forming Unit-Spleen*).

À la suite de l'explosion de la bombe d'Hiroshima, il est apparu que, chez les personnes irradiées, la capacité de produire des cellules sanguines avait disparu. Des travailleurs d'une centrale nucléaire yougoslave (Vinca), irradiés accidentellement en 1956, reçurent des injections de moelle osseuse d'individus sains afin de remplacer leur hématopoïèse déficiente (Mathé et al, 1963). Ce fut la première tentative pour restaurer le fonctionnement de la moelle osseuse à l'aide des rares cellules ayant la capacité de reconstituer une hématopoïèse déficiente.

Les CS sont définies comme une population cellulaire capable de s'auto-renouveler et de se différencier en se divisant de façon symétrique et asymétrique. Les CS ont la capacité de produire de multiples types de cellules matures et fonctionnelles. Cette définition correspond à la définition « minimale » des CS. Celle-ci ne permet pas de distinguer les CS des autres cellules qui ont la capacité de se diviser et cette définition doit comporter d'autres arguments pour être plus discriminante. Certains investigateurs ont proposé d'ajouter d'autres items à cette définition afin de la compléter :

- la capacité des CS à s'auto-renouveler durant toute la durée de vie,
- la substantielle contribution des CS à l'homéostasie tissulaire.

Si cette définition paraît plus complète, elle n'est toutefois pas parfaite. En effet, les CS de la crête neurale, par exemple, forment une population cellulaire éphémère (Murphy M et Bartlett PF, 1993). Dans les tissus solides, la contribution des CS est territorialement restreinte; de cette façon, une seule CS ne peut pas contribuer au maintien tissulaire de la majeure partie d'un organe (Gage FH, 2000). Cette définition des CS ne serait valable que pour les CS hématopoïétiques (CSH) et les cellules germinales. Elle apparaît donc comme étant trop restrictive. Ainsi, il est difficile d'établir une définition « définitive » pour l'ensemble des CS.

Bien souvent, ces définitions ne sont valables que lorsqu'elles sont relatives à un tissu et non à un organisme entier composé d'une multitude de tissus et d'une large diversité de CS. Les CS peuvent se distinguer des autres cellules présentes dans un tissu commun par le biais de leur capacité de différenciation, par le niveau de différenciation dans lequel elles se trouvent et par les gènes qu'elles expriment.

Une observation importante est que plusieurs types de CS peuvent participer à la reconstitution d'un tissu (Hillyer CD et Wells SJ, 1993). Par exemple, pour l'hématopoïèse peuvent participer les CS issues du sac vitellin (Palis J et Yoder MC, 2001), du sang de cordon (Broxmeyer HE et al, 1989), du foie fœtal (Gale RP, 1992) et de la moelle osseuse adulte (Becker AJ et al, 1963); (Siminovitch L et al, 1963). Chacune de ces CS a une capacité d'auto-renouvellement durable, elles peuvent reconstituer une hématopoïèse déficiente et peuvent produire de multiples phénotypes lors de tests de clonogénicité. De la même façon, une grande variété de CS a été identifiée dans le système nerveux à différents niveaux de développement et en différents lieux dans le cerveau (Pevny L et Rao MS, 2003).

De plus, l'idée selon laquelle les CS existent dans différents tissus, qu'elles expriment des caractéristiques individuelles spécifiques et sont interchangeable, a conduit au concept d'universalité des propriétés des CS. Les premiers travaux ayant pour objectif d'identifier un marqueur commun des CS n'ont pas été couronnés de succès (Ivanova NB et al, 2002); (Ramalho-Santos M et al, 2002). Toutefois, une méta-analyse des gènes conférant un caractère de cellule souche, grâce à la comparaison de profils d'expression génique de différentes populations de CS purifiées, a permis d'identifier un seul gène exprimé par les trois populations de CS étudiées : l'intégrine  $\alpha 6$  (Fortunel NO et al, 2003); (Guo Y et al, 2003 [1]). Bien que sur la base de l'expression de cette protéine, il soit possible de caractériser certaines populations de CS (Lawson

#### IV. LES DIFFÉRENTS ACTEURS DE LA NICHE HÉMATOPOÏÉTIQUE SONT INDISPENSABLES À SA FONCTIONNALITÉ.

---

DA et al, 2007); (Sugiyama T et al, 2007), cette expression n'est pas restreinte aux cellules immatures et de nombreuses cellules matures ont cette protéine à leur surface.

Les CS peuvent schématiquement être classées en trois grandes catégories en fonction de leur capacité de prolifération et de différenciation :

Les CS totipotentes. Après fécondation, le zygote résultant est une cellule totipotente. Cela signifie qu'elle a le potentiel génétique pour créer toutes les cellules de l'organisme (cellules du mésoderme, de l'endoderme, de l'ectoderme, des cellules germinales), du placenta et des cellules des tissus extra-embryonnaires. Cette cellule totipotente peut se diviser en cellules conservant cette totipotence lors des 4 premiers jours du développement embryonnaire, soit 3 à 4 divisions cellulaires.

Les CS pluripotentes (appelées CS embryonnaires). Après environ 5 jours, les cellules totipotentes se différencient et se spécialisent pour former le blastocyste. Les cellules de la couche externe vont former le placenta et les tissus de soutien du développement fœtal dans l'utérus. Les cellules de la masse interne du blastocyste sont des cellules pluripotentes. Ces dernières ont le potentiel de former toutes les cellules de l'organisme, toutefois elles ne peuvent pas participer à la formation du placenta et des tissus extra-embryonnaires.

les CS multipotentes. Les cellules pluripotentes poursuivent leur spécialisation en se différenciant en cellules multipotentes ayant un potentiel de différenciation plus limité. Par exemple, les CS hématopoïétiques sont multipotentes car leur différenciation permet la production des différents types de cellules sanguines : globules rouges, globules blancs et plaquettes. Les cellules multipotentes sont présentes aussi bien chez le fœtus que chez l'adulte. Des CS multipotentes ayant un potentiel de différenciation n'étant pas restreint à un seul type tissulaire, présentes chez l'adulte ou dans le sang de cordon, ont récemment été décrites : MAPC (*Multipotent Adult Progenitor Cell*) (Jiang Y et al, 2002 [1]), USSC (*Unrestricted Somatic Stem Cell*) (Kogler Get al, 2004), MIAMI (*Marrow Isolated Adult Multilineage Inductible Stem Cells*) (D'Ippolito G et al, 2004). Plus récemment, des travaux sur la reprogrammation génique, notamment par l'expression des gènes Oct4 et Sox2, de cellules différenciées adultes telles que les fibroblastes ont permis de leur faire acquérir une capacité de différenciation multipotente. Ces cellules reprogrammées ont en effet été capables de transdifférenciation vers les trois lignées des feuilletts embryonnaires (Wernig M et al, 2007); (Yu J et al, 2007); (Nagy K et al, 2011).

#### IV. LES DIFFÉRENTS ACTEURS DE LA NICHE HÉMATOPOÏÉTIQUE SONT INDISPENSABLES À SA FONCTIONNALITÉ.

---

Les CS unipotentes sont capables de générer un seul type de cellules différenciées. Elles sont déjà engagées dans une voie de différenciation et présentent un potentiel de prolifération limité. En cas de lésion du tissu auquel elles appartiennent, et contrairement à la majorité des autres types de CS qui ont besoin de signaux de détermination, elles sont directement mobilisables. C'est le cas des cellules satellites qui, en cas de lésion du muscle squelettique, vont pouvoir rapidement et efficacement régénérer les fibres musculaires lésées.

Un autre système de classification des CS est utilisé, il est basé sur leur origine et il sert de référence au législateur pour établir les règles éthiques d'utilisation des CS. Cette classification distingue trois types de CS : les CS embryonnaires totipotentes, les CS fœtales et les CS des tissus adultes. Ces cellules correspondent à différents stades de développement mais ne coexistent pas dans l'organisme.

Les CS embryonnaires (ES) (Mimeault M et al, 2007): elles sont issues de la masse interne du blastocyste, structure de 16-40 cellules issues des divisions de l'ovocyte fécondé. Le feuillet externe du blastocyste donnera le placenta. S'il est implanté dans l'utérus, le blastocyste entier peut se développer en un fœtus viable. Au 5<sup>e</sup> jour du développement, chacune des cellules de la masse interne du blastocyste est pluripotente. Une fois le blastocyste dissocié, les cellules ES qui en sont extraites ont perdu toute possibilité de se développer ultérieurement en un embryon ; cependant, elles peuvent être cultivées en laboratoire à l'infini tout en conservant leur caractère de pluripotence, et un génome intact. Il est donc possible d'obtenir des millions de cellules ES pluripotentes à partir d'un petit nombre de cellules embryonnaires de blastocyste. Placées dans des conditions de culture précises, ces cellules ont la capacité de se différencier en des cellules spécialisées correspondant à tous les tissus de l'organisme (cœur, sang, neurones...). La pluripotence intrinsèque des ES leur confère un avantage unique pour analyser les signaux propres aux CS et pour caractériser les gènes qui sont activés en réponse à ces signaux. Ces caractéristiques de pluripotence et d'auto-renouvellement à long terme ont amené beaucoup d'espoirs et ont ouvert de larges perspectives dans le cadre de la médecine régénératrice. Toutefois, les tests chez la souris ont montré qu'elles ont un fort potentiel tumorigène (tumeur bénigne ou maligne, tératome ou tératocarcinome).

Les CS fœtales (Mimeault M et al, 2007): elles sont isolées à partir de tissus fœtaux provenant d'avortements, donc à un stade beaucoup plus tardif (5-10 semaines) que le stade de

#### IV. LES DIFFÉRENTS ACTEURS DE LA NICHE HÉMATOPOÏÉTIQUE SONT INDISPENSABLES À SA FONCTIONNALITÉ.

---

blastocyste embryonnaire. Les CS fœtales peuvent être isolées à partir du sang, de la moelle osseuse, mais aussi à partir du foie et des reins. Le sang fœtal est riche en CS avec un potentiel de reconstitution hématopoïétique plus important que celui des CS issues du sang de cordon ou de la moelle osseuse adulte. Durant le premier trimestre, le sang fœtal contient aussi une population de CS mésenchymateuses qui soutiennent l'hématopoïèse et qui peuvent se différencier en de multiples types cellulaires. En termes d'applications, les CSH et les CS mésenchymateuses d'origine fœtale présentent des avantages par rapport aux cellules issues de tissus adultes comme une meilleure prise de greffe, une multipotentialité plus importante et une immunogénicité plus faible. L'utilisation de cellules fœtales présente moins de problèmes éthiques que l'utilisation d'ES et leur potentiel de différenciation est plus élevé que les CS adultes.

Les CS tissulaires adultes (Mimeault M et al, 2007): elles assurent l'homéostasie d'un organe, que ce soit naturellement ou après une lésion, assurant ainsi la pérennité de la fonction de l'organe. Les nombreux travaux réalisés *in vitro* ou après transplantation chez l'animal permettent d'attribuer aux CS adultes les caractéristiques suivantes qui les distinguent des cellules ES :

- elles ne sont pas considérées comme pluripotentes et sont généralement restreintes à la différenciation en cellules d'un tissu donné,
- elles ne se multiplient pas à l'infini à l'état indifférencié,
- elles sont très hétérogènes, compte tenu de la diversité des tissus de l'organisme auxquels elles appartiennent.

Certaines CS adultes se multiplient très efficacement en culture, en conservant intact leur caractère souche comme les CS nerveuses, épidermiques ou mésenchymateuses. D'autres n'ont pas ce pouvoir, soit parce qu'elles perdent leur potentiel en se divisant (CSH), soit parce qu'elles prolifèrent très peu *in vitro* (CS musculaires). Quel que soit le type de CS considéré, ces cellules ont des caractéristiques qui les rapprochent. Toutes les CS doivent réguler leur cycle cellulaire : elles peuvent entrer dans des périodes de prolifération importante, maintenir leur capacité d'auto-renouvellement ou entrer dans une période de quiescence en évitant le processus de sénescence. De plus, les CS doivent maintenir l'intégrité de leur génome en évitant l'accumulation de mutations génétiques et la transformation néoplasique. Les CS doivent pouvoir faire le choix entre auto-renouvellement et différenciation. Elles doivent interagir avec leur environnement par le biais de

facteurs de croissance et de molécules de la matrice extracellulaire.

### **IV.2.2 Les cellules souches mésenchymateuses.**

Les CSM furent identifiées pour la première fois en 1976 par l'équipe de Friedenstein (Friedenstein A et Kuralesova AI, 1971) mais le terme MSC (Mesenchymal Stem Cells) ne fut retenu comme tel qu'après les travaux de Caplan en 1991 (Caplan AI, 1991). Ces cellules sont très prometteuses dans le domaine de la thérapie cellulaire car elles disposent de nombreux avantages :

- Elles sont présentes dans une grande variété de tissus adultes faciles à prélever tels que la moelle osseuse (tissu de référence pour l'isolement des CSMs), le tissu adipeux (tissu de référence pour l'isolement des *Adipocyte Stem Cells* ou ASCs), le sang de cordon ombilical, le sang périphérique, le placenta, le cuir chevelu ou encore la pulpe dentaire.
- Malgré leur faible proportion dans les tissus (0,001-0,01%), ces cellules peuvent être rapidement isolées et ont une forte activité proliférative.
- Elles ont déjà été utilisées avec succès pour le traitement de différentes affections telles que l'*osteogenesis imperfecta*, l'infarctus du myocarde et la réaction du greffon contre l'hôte (*graft versus host disease* ou GVHD). Pour revue (Hilfiker A et al, 2011)
- Elles ont la capacité de migrer vers les zones de l'organisme où se produit un dommage (Liu ZJ et al, 2009).
- Leur utilisation dans la prévention de la GVHD implique une action immunomodulatrice de leur part.

Les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse humaine sont caractérisées morphologiquement par leur forme en fuseau en microscopie. D'autre part, elles possèdent une forte activité proliférative et ont la capacité d'adhérer rapidement sur le plastique des boîtes de culture.

L'expression de différents marqueurs antigéniques à leur surface permet de les discriminer des autres types cellulaires, notamment par cytométrie en flux. Aucun de ces marqueurs n'est

#### IV. LES DIFFÉRENTS ACTEURS DE LA NICHE HÉMATOPOÏÉTIQUE SONT INDISPENSABLES À SA FONCTIONNALITÉ.

réellement spécifique des CSM, c'est la combinaison de leur présence ou absence qui détermine le phénotype de la population cellulaire que l'on étudie. Ces marqueurs ou « clusters » de différenciation (CD) sont recensés dans le **tableau 3**.

Par exemple, une CSM arbore classiquement les CD105, CD166, CD90, CD73, Stro-1 et est négative pour l'expression du marqueur hématopoïétique CD45. Le CD34, marqueur caractéristique des CSH, serait quant à lui exprimé par une sous-fraction de CSM à faible capacité d'adhérence (Kaiser S et al, 2007). Cette fraction caractéristique disparaît rapidement lors de la culture *in vitro*.

	Antigènes de surface	nom de l'antigène
<b>Positif</b>	CD105	Endoglin
	CD73	Ecto-5'-nucléotidase
	CD90	Thy-1
	CD166	ALACAM
	Stro-1	/
	HLA-ABC	
<b>Non spécifiques, expression variable</b>	SSEA-1/4 (early)	stage-specific embryonic antigen
	CD34	gp105 / Mucosialin
	CD49b	Vla-2 $\alpha$
	CD130	gp130
	CD146	MCAM
	CD200	OX9
	$\alpha$ V/ $\beta$ 5	Intégrine
<b>Négatif</b>	CD45	LCA
	CD14	LPS-R
	CD11b	Mac-1
	CD79a	Ig $\alpha$
	CD19	B4
	HLA-DR	/

**Tableau 3:** Marqueurs antigéniques utilisés pour la discrimination des CSM en cytométrie en flux

L'activité physiologique des CSM est le résultat de l'expression de différents facteurs présents à leur surface et sécrétés dans le milieu environnant. Ces chimiokines peuvent avoir une activité autocrine, paracrine ou endocrine. En effet, dans le cas du SDF-1, les CSM peuvent s'auto-stimuler car elles possèdent le récepteur de cette molécule, mais ce facteur est aussi connu comme chimioattractant pour les leucocytes. Le phénotype sécrétoire des CSM est décrit dans le **tableau 4**.

Les CSM sécrètent également des cytokines pro-inflammatoires telles que IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  et anti-inflammatoires comme le TGF- $\beta$ . De plus il a été démontré l'expression d'un facteur hématopoïétique, le GM-CSF et de facteurs pro-angiogénique, l'angiogénine et le VEGF. D'autres facteurs ont été détecté au niveau du sécrétome des CSM : SCF, IL-6, IL-8 (Hwang JH et al, 2009).

#### IV. LES DIFFÉRENTS ACTEURS DE LA NICHE HÉMATOPOÏÉTIQUE SONT INDISPENSABLES À SA FONCTIONNALITÉ.

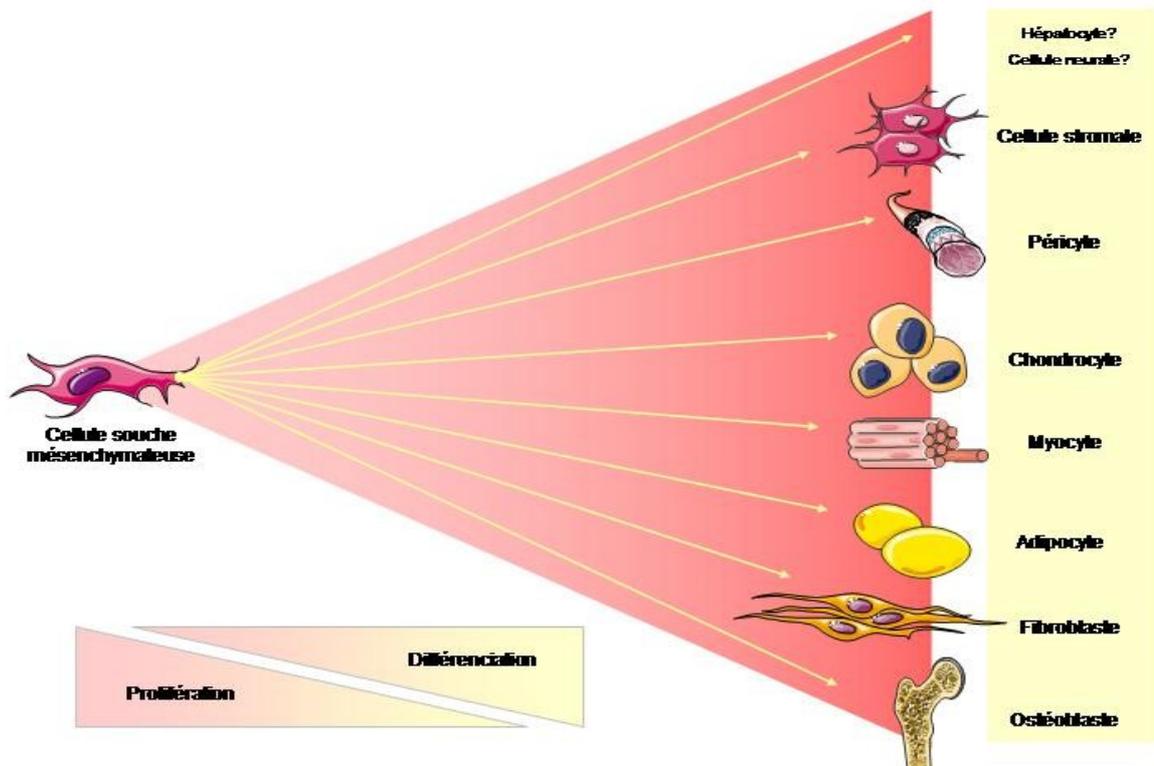
Chimiokines sécrétées	Nom	Récepteurs associés exprimés
CCL2	MCP-1	CCR2
CCL3	MIP-1 $\alpha$	CCR1 et CCR5
CCL4	MIP-1 $\beta$	CCR5
CCL7	MCP-3	CCR2 et CCR3
CCL20	MIP-3 $\alpha$	/
CCL26	eotaxin-3	CCR3
CX3CL1	fraktalkine	CX3CR1
CXCL1	GRO $\alpha$	/
CXCL2	GRO $\beta$	/
CXCL5	ENA-78	/
CXCL8	IL-8	/
CXCL10	IP-10	CXCR3
CXCL11	i-TAC	CXCR3
CXCL12	SDF-1	CXCR4

**Tableau 4:** *Chimiokines et récepteurs associés exprimés par les CSM.*

Ces cellules sont également reconnues pour leur plasticité. En effet, les CSM sont capables de se différencier vers plusieurs types cellulaires du feuillet mésodermique tels que les ostéoblastes, les adipocytes, les chondrocytes ou encore les péricytes (Pittenger MF et al, 1999) (**illustration 8**).

Une récente étude a permis l'identification des CSM associées aux CSH de la niche hématopoïétique vasculaire (Méndez-Ferrer et al, 2010). Ces cellules situées au contact de l'endothélium expriment la Nestine et sont associées avec des fibres adrénérgiques du système nerveux sympathique (SNS). Le SNS est connu pour réguler la mobilisation des CSH (Katayama Y et al, 2006), de plus, ces CSM nestine<sup>+</sup> secrètent de nombreux facteurs actifs sur le « homing » et la balance quiescence / différenciation des CSH (CXCL12, SCF, IL-7, VCAM1, et OPN).

#### IV. LES DIFFÉRENTS ACTEURS DE LA NICHE HÉMATOPOÏÉTIQUE SONT INDISPENSABLES À SA FONCTIONNALITÉ.



**Illustration 8:** *Potentialité de différenciation des CSM.*

#### IV.2.3 Les progéniteurs endothéliaux.

Les progéniteurs endothéliaux (EPC) ne sont pas encore une population finement caractérisée. Du point de vue structurel et fonctionnel, cette population apparaît encore très hétérogène.

Ces cellules sont à l'origine des cellules endothéliales qui forment l'endothélium, la couche la plus interne des vaisseaux sanguins qui forme la surface d'échange entre le tissu sanguin et les organes.

Bien que la moelle osseuse soit considérée comme étant la principale source d'EPC, elle n'est probablement pas la seule car d'autres cellules souches endothéliales ont été isolées à partir de différents tissus tels que le sang périphérique, le tissu adipeux, le tissu cardiaque et le tissu musculaire. Les EPC sont issus de différents types cellulaires incluant les hémangioblastes et les cellules CD34<sup>+</sup> de la « side population » de la moelle osseuse, les progéniteurs endothéliaux du sang périphérique VEGFR2<sup>+</sup> ainsi que les cellules souches hématopoïétiques (CSH) CD34<sup>+</sup>.

Les EPC sont caractérisés le plus souvent par l'expression de marqueurs de surface qui

#### IV. LES DIFFÉRENTS ACTEURS DE LA NICHE HÉMATOPOÏÉTIQUE SONT INDISPENSABLES À SA FONCTIONNALITÉ.

varient en fonction de leur stade de différenciation; elles sont cependant toujours négatives pour le CD45 (**Tableau 5**).

Cinétique d'expression	Marqueur de surface	Spécifique des cellules issues de la moelle osseuse	Spécifique des cellules issues du sang périphérique
Précoce	CD34	+	
	VEGF-R2	+	
	CD133	+	
	C-kit		+
	Sca-1		+
tardive	VE-cadherine		
	Facteur de Von Willebrand		

**Tableau 5:** Cinétique d'expression des marqueurs de surface des EPC.

#### IV.2.4 Les cellules souches hématopoïétiques.

Le système hématopoïétique est organisé comme une hiérarchie pyramidale de différents types cellulaires clonogéniques ayant différentes capacités d'auto-renouvellement, de prolifération et de différenciation. Au sommet de cette pyramide se trouvent les CSH. Pour le maintien de l'homéostasie du tissu sanguin ou en réponse à un stress hématologique, les CS sont recrutées dans l'hématopoïèse active et réalisent une série de divisions mêlant auto-renouvellement et divisions de maturation. Les cellules gagnant en maturation ont des capacités de prolifération et un potentiel de différenciation se réduisant progressivement. Ces cellules forment le compartiment des progéniteurs où l'on distingue des progéniteurs pluripotents capables de fortement proliférer en réponse à des combinaisons de facteurs de croissance synergiques, et des progéniteurs plus matures engagés dans la différenciation d'une lignée unique et répondant à un petit nombre de facteurs de croissance plus spécifiques de la lignée donnée. Ces cellules sont caractérisées par une faible capacité d'auto-renouvellement. Les progéniteurs hématopoïétiques se différencient finalement en précurseurs qui se divisent peu ou pas, puis en cellules totalement matures. Ces deux derniers groupes de cellules constituent le compartiment de maturation où les cellules ne se divisent plus et sont morphologiquement reconnaissables. À la fin du processus de maturation, les cellules traversent la barrière endothéliale pour quitter la moelle et gagner la circulation sanguine. Les cellules matures

du sang ont une durée de vie limitée allant de 1 jour (pour les neutrophiles) à 120 jours (pour les érythrocytes).

##### **IV.2.4.1** *Les sources des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques (CSPH) adultes.*

Il existe différentes sources de CSPH utilisables en recherche fondamentale ou dans la perspective de greffes.

La moelle osseuse:

C'est le siège de l'hématopoïèse, elle est logiquement la première source de CSPH. La quantité de CSPH dans un prélèvement de moelle est variable selon les individus et selon la quantité de sang périphérique qui contamine le prélèvement.

Le sang périphérique:

Les CSPH circulent dans le sang, mais le nombre est habituellement très bas et représente 1 à 2 % du nombre retrouvé dans la moelle osseuse avec de grandes fluctuations entre les individus. En revanche, chez des patients ayant reçu une chimiothérapie ou un traitement par des facteurs de croissance hématopoïétiques de type *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF) et *Stem Cell Factor* (SCF), une re-circulation sanguine transitoire des CSPH est observée. Les CSPH du sang se trouvent dans la fraction mononucléée des leucocytes et peuvent être prélevés grâce à un dispositif de cytophérèse.

Le sang de cordon:

Longtemps considéré comme un déchet biologique, le sang de cordon est maintenant utilisé comme une source de CSPH. Le prélèvement se fait par ponction de la veine ombilicale après clampage du cordon et séparation de l'enfant, le volume ainsi prélevé est compris entre 70 et 150 mL.

Les résultats obtenus lors de ces études montrent que des disparités existent entre ces différentes sources de CSPH. De même, leurs caractéristiques fonctionnelles sont différentes, par exemple la proportion de cellules CD34<sup>+</sup> quiescentes est plus élevée pour les cellules issues du sang mobilisé (Gothot A et al, 1997); (Gothot A et al, 1998), et les profils d'expression génique des cellules issues de la moelle ou du sang mobilisé présentent des différences significatives (Graf L et al, 2001).

##### **IV.2.4.2** *Tests de clonogénicité.*

Les tests de clonogénicité sont utilisés pour quantifier les progéniteurs multipotents et les progéniteurs unipotents des lignées granulocytaires, érythroïdes, monocytaires et mégacaryocytaires (Fauser AA et Messner HA, 1978). La technique la plus couramment utilisée consiste à déposer les cellules sur un milieu semi-solide supplémenté par un cocktail de cytokines favorisant la prolifération et la différenciation de progéniteurs isolés formant alors des colonies de cellules majoritairement matures. Les progéniteurs à l'origine de ces colonies sont appelés CFC (*Colony Forming Cell*), CFU (*Colony Forming Unit*) ou BFU (*Burst Forming Unit*). Les colonies sont énumérées et classées sur la base de la morphologie des cellules matures qui les composent par microscopie.

- Les CFU-GEMM (*CFU-granulocyte, érythrocyte, macrophage, megacaryocyte*). Les colonies formées proviennent des progéniteurs précoces ou immatures qui peuvent se différencier en différentes lignées. Ces colonies sont très denses et l'on peut souvent observer en périphérie les granulocytes, les macrophages ou les mégacaryocytes. Elles sont constituées de cellules translucides et de cellules rouges dont la couleur est due à la présence de l'hémoglobine.
- Les CFU-GM (*CFU-granulocyte and macrophage*) : les colonies formées sont plutôt de forme homogène avec un centre plus concentré et une périphérie moins dense de couleur translucide. Les progéniteurs formant ces colonies peuvent donner naissance à deux types cellulaires : les macrophages et les granulocytes.
- BFUe (*BFU-erythroid*) : ce sont des progéniteurs érythroïdes plus immatures que les CFU-E. Comme ils possèdent une capacité de prolifération plus importante, ils donnent lieu à des colonies plus grosses. Ces colonies sont appelées des « burst » du fait de leur ressemblance avec les colonies érythrocytaires observées au cours du développement embryonnaire dans la zone vitelline appelée « burst vitelli » chez l'oiseau.
- CFUe (*CFU-erythroid*) : ces progéniteurs érythroïdes tardifs assez matures forment

#### IV. LES DIFFÉRENTS ACTEURS DE LA NICHE HÉMATOPOÏÉTIQUE SONT INDISPENSABLES À SA FONCTIONNALITÉ.

---

rapidement (6 jours) des colonies de petite taille. La couleur rouge orangée de ces colonies est due à la présence de l'hémoglobine.

- Les BFU-MK (*BFU-Megakaryocytic*) : ce sont des progéniteurs relativement primitifs de la lignée mégacaryocytaire donnant naissance à des colonies d'au moins 10 cellules regroupées en plusieurs amas.
- Les CFU-MK (*CFU-Megakaryocytic*) : issues des BFU-MK, elles sont par conséquent plus différenciées et donnent naissance à des colonies formées d'au moins trois mégacaryocytes.

La culture des CSPH est utilisée pour caractériser leur capacité de prolifération et de différenciation à des étapes distinctes et successives de leur différenciation et pour estimer la fréquence de ces cellules. Ces cultures sont réalisées sur des stromas cellulaires pré-établis qui délivrent des signaux d'inhibition et de stimulation régulant la croissance *ex-vivo* des cellules hématopoïétiques. La nature de ce stroma peut varier selon les modèles, il peut s'agir de cellules fibroblastiques issues de culture primaire de cellules de moelle osseuse ou de lignées cellulaires transformées. Les cellules se développant 1 à 3 semaines après le début de la culture sont considérées comme représentant la descendance de progéniteurs relativement matures, alors que celles se développant plus tard (après 5 à 8 semaines) sont considérées comme issues des cellules les plus primitives et sont appelées LTC-IC (*Long Term Culture -Initiating Cell*) (Sutherland et al., 1991; Udomsakdi et al., 1992).

L'équipe d'Ogawa a mis au point un test permettant la détection des CFU-blastes (Leary AG et Ogawa M, 1987). Ce test est réalisé en deux étapes : une première culture en milieu semi-solide sans cytokines, puis une seconde étape de culture en présence de cytokines. Ce test permet de mettre en évidence des colonies blastiques composées de cellules indifférenciées qui peuvent donner, dans 10 à 60% des cas, des colonies secondaires après repiquage.

Le test des HPP-CFC (*High Proliferative Potential-CFC*) mis au point par Bradley *et al.* chez la souris, met en évidence des colonies issues de progéniteurs hématopoïétiques quiescents car résistants au traitement par le 5-Fluorouracile (Bradley TR, Hodgson GS, 1979). Différentes versions de ce test ont ensuite été appliquées à l'Homme comme le test HPP-Q (*High Proliferative*

*Potential-Quiescent*) dans lequel l'utilisation d'un anticorps anti-*Tumor Growth Factor-β* (TGF-β) entraîne la mise en cycle des progéniteurs hématopoïétiques maintenus quiescents par le TGF-β autocrine. Ce test permet l'accès à des sous-populations de progéniteurs quiescents non détectés dans les conditions classiques (Hatzfeld J et al, 1991).

## **V. Ces types cellulaires, soumis à l'irradiation subissent différents types de mort cellulaire.**

L'évolution de la niche irradiée dans sa structure et sa fonctionnalité est soumise à la chronologie de la mort de ses différentes composantes cellulaires. Celle-ci est différente en fonction du type de mort cellulaire associé à chaque type cellulaire dans le cas d'une irradiation. Bien qu'il existe d'autres types de morts cellulaires tels que l'anoikis ou l'autophagie, trois cas de figure majeurs peuvent se présenter ici :

- La nécrose.
- L'apoptose.
- La sénescence.

### **V.1 La nécrose.**

La nécrose est l'évènement qui survient en réponse à une agression sévère des cellules pouvant être induite par un surdosage d'agents cytotoxiques ou par une exposition à une forte dose de radiations ionisantes. Si l'apoptose peut être comparée à un « suicide cellulaire », la nécrose est souvent référencée comme « meurtre cellulaire ».

L'évènement le plus précoce de la nécrose est le gonflement des mitochondries suivi rapidement par la rupture de la membrane plasmique et le relargage dans le milieu environnant des constituants du cytoplasme incluant des enzymes protéolytiques. Par la suite, la chromatine nucléaire se désorganise et se condense en paquets ce qui conduit à la caryolyse.

La nécrose est responsable d'une importante réaction inflammatoire des tissus qui induit la formation de cicatrices.

La dégradation de l'ADN dans le cas de la nécrose ne suit pas un schéma aussi précis que celle intervenant lors de l'apoptose et conduit à des produits de dégradation de tailles hétérogènes.

## **V.2 L'apoptose**

Le phénomène d'apoptose a été mis en évidence en 1972 par John Kerre, Andrew Willie et Alastair Currie. L'apoptose se produit naturellement par l'organisme, c'est le mécanisme par lequel ce dernier se débarrasse de cellules ayant perdu leur fonction.

L'apoptose intervient notamment de manière physiologique lors de l'embryogenèse ainsi que dans l'immunité. En effet, pendant le développement de l'embryon, l'apoptose joue un rôle crucial dans la formation des doigts en permettant l'élimination des cellules qui les relient entre eux. Lors d'une réaction immunitaire faisant suite à une infection virale, les lymphocytes T8 cytotoxiques induisent la mort des cellules infectées.

L'apoptose est caractérisée par la compaction de la chromatine nucléaire, la condensation du cytoplasme des cellules et la fragmentation de l'ADN. Lors de ce phénomène, l'intégrité de la membrane plasmique n'est jamais atteinte et les composants internes de la cellule ne sont pas relargués dans le milieu. Ce type de mort cellulaire n'est donc pas accompagné d'une inflammation. La cellule se désagrège en plusieurs corps apoptotiques qui sont éliminés par la suite par les macrophages.

Dans les conditions d'homéostasie, la survie cellulaire est soumise à la balance entre facteurs de survie et facteurs pro-apoptotiques. Plusieurs causes peuvent donc aboutir au « suicide » programmé des cellules par apoptose :

- La perte des signaux de survie qui fait pencher la balance de manière défavorable.
- Les dommages de l'ADN consécutifs à une exposition aux radiations ionisantes ou aux rayons UV.
- Les signaux hormonaux d'activation des processus de mort.
- La perte des interactions cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire.
- Le vieillissement cellulaire.

La signalisation du processus apoptotique se fait par deux voies principales.

La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort qui passe par des protéines transmembranaires de la superfamille des TNF telles que FAS. L'activation de ces récepteurs par un stimulus externe entraîne la cascade d'activation des caspases. Cette cascade initiée avec la caspase 8 va aboutir à la lyse des protéines de structure de la cellule par les caspases effectrices et à la fragmentation de l'ADN.

La voie intrinsèque est liée aux dommages subis par l'ADN, au stress des mitochondries ou au stress du réticulum endoplasmique. Cette voie de signalisation implique les oncogènes de la famille Bcl-2 et la protéine p53. L'activation de cette voie conduit au relargage du cytochrome c mitochondrial dans le cytosol. Ceci a pour conséquence l'arrêt de la chaîne respiratoire et la cascade d'activation des caspases initiée par la caspase 9.

### **V.3 La sénescence**

La sénescence cellulaire est l'une des nombreuses voies par lesquelles la cellule eucaryote meurt. Celle-ci est cependant caractéristique des cellules adhérentes. Contrairement à l'apoptose, la nécrose et les autres formes de mort cellulaire, la sénescence est caractérisée par une perte de la fonction répliquative mais également par un maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la cellule.

Selon le postulat de Hayflick (Hayflick L et al, 1961), la culture de cellules *ex vivo* connaît trois phases distinctes. La première lors de la mise en culture où les cellules ont une faible activité proliférative, une seconde phase d'expansion exponentielle et enfin la dernière phase où les cellules conservent uniquement leur activité métabolique pendant une longue période.

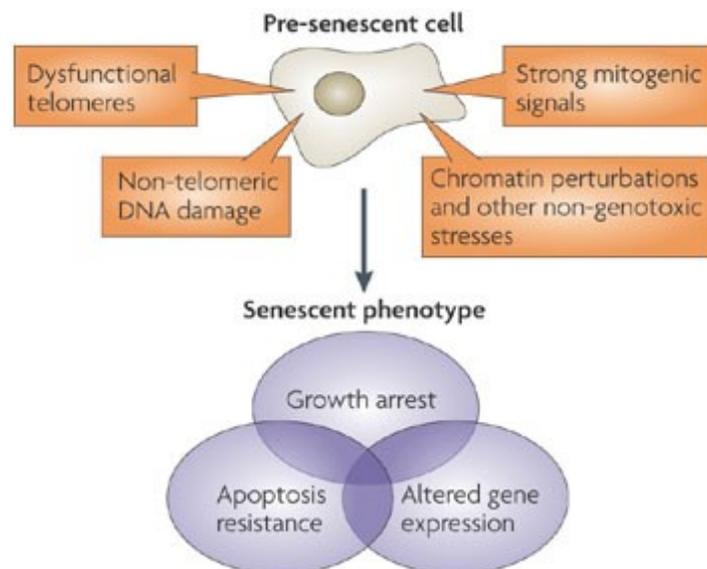
La sénescence cellulaire s'explique par plusieurs mécanismes (**illustration 9**). Le premier est la diminution de la taille des télomères des chromosomes lors de chaque phase répliquative. En effet, les cellules humaines somatiques sont dépourvues de télomérase (hTERT), l'enzyme gouvernant l'élongation des télomères. Cette enzyme, présente dans les cellules souches ainsi que dans les cellules cancéreuses et les cellules immortalisées *in vitro*, est activée lorsque les télomères atteignent une taille critique en dessous de laquelle la cellule se suicide par apoptose ou entre en sénescence (Bodnar AG et al, 1998), (Vaziri H et Benchimol S, 1998).

Ce processus de mort cellulaire peut également être induit par le stress. Lorsque des cellules sont explantées de leur organisme-hôte, leur micro-environnement est bouleversé. En effet le

## V. CES TYPES CELLULAIRES, SOUMIS À L'IRRADIATION SUBISSENT DIFFÉRENTS TYPES DE MORT CELLULAIRE.

pourcentage en oxygène varie fortement à la hausse d'où un fort stress oxydatif dû notamment aux ROS (*reactive oxygen species*). De plus, les cellules adhérentes ne reçoivent plus les signaux de survie transmis par leur contact à la matrice extracellulaire et aux autres cellules du micro-environnement, ce qui déséquilibre la balance des signaux survie/mort. Enfin, la composition du milieu de culture n'est jamais optimale en termes de nutriments et de facteurs de survie. Ce dernier point semble être le plus limitant dans le maintien de l'activité proliférative des cellules en culture et dans l'apparition du phénomène de sénescence. La sénescence induite par le stress, se produisant après un nombre limité de passages, est donc indépendante de celle provoquée par le raccourcissement des télomères.

La sénescence cellulaire est induite par des voies similaires aux autres voies de mort cellulaire telles que celles médiées par p53. Enfin, la sénescence cellulaire peut être induite par l'action de certains oncogènes : ce phénomène appelé OIS (*oncogene-induced senescence*) a été découvert lors de recherches sur des variants du gène HRAS responsable de l'immortalisation de cellules primaires (Land H et al, 1983), (Serrano M et al, 1997). Dans les cellules humaines, la principale voie de signalisation responsable de l'OIS est celle de p16<sup>INK4A</sup>.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Illustration 9:** Phénomènes inductifs et conséquences de la sénescence cellulaire. D'après (Judith Campisi et Fabrizio d'Adda di Fagagna, 2007)

#### V.4 Cinétique de mort cellulaire.

La sénescence des cellules est caractérisée par différents marqueurs aussi bien morphologiques que fonctionnels, ou encore par l'expression de molécules spécifiques.

- Arrêt du cycle cellulaire.
- Modifications morphologiques.
- Induction de l'activité SA- $\beta$ -galactosidase.
- Altérations de la chromatine.
- Induction du phénomène d'autophagie.
- Activation de la voie p16<sup>INK4A</sup>.

La nécrose est un phénomène violent non contrôlé par l'organisme qui survient immédiatement après le dommage dû à l'irradiation; les cellules subissant cet effet sont condamnées et ne feront l'objet d'aucun traitement mis à part une prophylaxie à base de radioprotecteurs.

Après irradiation, le délai d'apparition de l'apoptose varie d'un type cellulaire à l'autre. En effet, l'apoptose peut survenir juste après irradiation (apoptose précoce ou interphasique), après l'arrêt en G2 (Merritt et al, 1997) (Radford et al, 1994), ou après plusieurs divisions cellulaires (apoptose tardive) (Dewey WC et al, 1995), (Yanagihara K et al, 1995), (Castedo M et al, 2004). Les CSH disparaissent préférentiellement via ce mécanisme de mort cellulaire. Il est possible de traiter l'apoptose précoce à l'aide d'une CKAU afin de préserver un pool de CSH plus important pour la reconstitution hématologique (Drouet M et al, 1999).

Enfin, la sénescence non répliquative apparaît 48 heures post-irradiation. De plus, les cellules subissant ces effets maintiennent leur intégrité pendant une longue période et sont principalement des cellules de soutien. Ceci laisse le champ libre à une thérapie génique visant à activer les progéniteurs cellulaires résiduels afin de reconstruire une niche fonctionnelle avant la disparition des éléments vieillissants.

## **VI. L'optimisation de la prise en charge des irradiés accidentels nécessite l'utilisation de modèles animaux.**

Pour des raisons éthiques évidentes, les différents protocoles cliniques de traitement de l'irradiation accidentelle doivent préalablement être testés sur des modèles animaux. Plusieurs étapes sont nécessaires pour développer et optimiser les techniques utilisées pour vérifier d'une part l'efficacité du traitement proposé et d'autre part pour évaluer l'occurrence d'effets secondaires délétères induits par ce traitement.

Dans un premier temps, l'utilisation d'un modèle de petit animal est nécessaire pour décrypter en détail les mécanismes d'action précis des traitements proposés. Les souris *non-obese diabetic severe combined immunodeficiency* (NOD-SCID) sont fréquemment utilisées pour étudier la prise de greffe. En effet, ces animaux sont impuissants à développer une réaction immunitaire spécifique. Ces souris sélectionnées génétiquement présentent un défaut de fonction des lymphocytes T, B et NK et ne sont plus capables d'activer l'activité du complément. Ce modèle permet de tester un greffon de taille préclinique sans risque de rejet par l'organisme-hôte; de plus, la petite taille et les facilités de stabulation/entretien du modèle murin permettent de réaliser rapidement une étude statistiquement exploitable sur une expérimentation.

Même si le modèle murin possède plusieurs qualités, ses limites n'en font pas un bon candidat pour des études précliniques. En effet, sa distance phylogénétique avec l'Homme interdit une extrapolation des résultats obtenus. De plus, dans le cas particulier de l'étude de la restauration hématopoïétique, le modèle souris est inadapté en raison des fortes différences existant entre l'hématopoïèse humaine et murine. Chez la souris, l'hématopoïèse est à la fois médullaire et splénique, la formule sanguine est différente avec une prédominance lymphocytaire, la demi-vie des globules rouges est inférieure à celle de l'Homme et la radiosensibilité globale de la souris est différente celle observée chez l'Homme (DL50/30 chez l'Homme aux alentours de 4,5 Gy, chez la souris « sauvage » 8 Gy et chez la souris NOD-SCID 3Gy).

Le modèle du primate non humain (PNH) présente de nombreux avantages sur les autres espèces animales pour développer des modèles expérimentaux en hématologie. Le haut degré d'homologie génétique entre l'humain et les autres primates se traduit par des similitudes physiologiques et notamment des paramètres biochimiques et immuno-hématologiques. Chez les macaques rhésus et nemestria il a été démontré un taux d'homologie de 93 à 99% au niveau des séquences génétiques et protéiques d'une quinzaine de cytokines (Villinger F et al, 1995).

Lors d'une ICT il, existe un gradient de dose absorbée en fonction de l'épaisseur corporelle traversée par les rayonnements Cette hétérogénéité lésionnelle a pu être évaluée chez les primates de grande taille, comme le babouin, qui se révèlent être la meilleure modélisation des ICT chez l'Homme (Herodin F et al, 1992). Le modèle primate a permis de montrer que l'aplasie médullaire radio-induite s'installe dans un contexte de forte réaction inflammatoire associée à des troubles sévères de l'hémostase. L'évaluation de l'hématopoïèse résiduelle et la recherche de dosimètres biologiques sont possibles chez le primate.

Plusieurs protocoles de thérapie cellulaire ont été conduits chez le primate traitant de la transplantation de CSH CD34 positives soumises ou non à une phase d'expansion *in vitro* (Norol F et al, 1999); (Bertho JM et al, 2005). L'avantage de ce modèle animal est d'autoriser l'évaluation de la « transplantabilité » des cellules cultivées sans ajout d'un greffon non manipulé de sauvegarde. Les études ainsi réalisées, principalement en situation autologue, ont abouti à des résultats contrastés qui dépendent essentiellement du milieu et des cytokines utilisées pour la culture ainsi que de la durée de celle-ci. Un protocole préclinique a déjà été transposé en clinique, celui d'Andrews et al (Andrews RG et al, 1999) transposé par J. Reiffers (Reiffers J et al, 1999).

Des greffes de CSM autologues ont déjà été réalisées chez le babouin irradié dans la perspective de soutenir la reconstitution hématopoïétique de ces animaux (Drouet M et al, 2005). Bien que cette étude visât à soutenir la reconstitution induite par des CSH co-injectées, ce protocole a démontré la faisabilité de greffes de cellules stromales dans un modèle primate du syndrome hématopoïétique.

Ce modèle possède cependant des limites. En effet, son coût est élevé concernant tant l'achat des animaux que leurs conditions de stabulation et d'entretien. De plus, le statut sanitaire des PNH est difficilement contrôlable et ils sont souvent porteurs d'infections virales telles que l'herpès B. Cependant, nous avons toujours sélectionné des animaux séronégatifs et euthanasié les animaux présentant une séroconversion. Il n'en reste pas moins vrai que la plupart des primates sont porteurs

sains de rétrovirus présentant un pouvoir cytopathogène *in vitro* (spumavirus). Les prélèvements biologiques sur ces animaux nécessitent une anesthésie préalable qui s'ajoute à la difficulté du modèle (Dans le modèle murin, l'anesthésie gazeuse facilite cette étape). Ces facteurs ne permettent donc pas la formation de cohortes expérimentales de grande ampleur. Cependant, la variété génétique des animaux étudiés est bien plus grande que dans un modèle murin, les résultats d'expérimentations obtenus avec les PNH sont donc beaucoup plus robustes.

Malgré la lourdeur de ce modèle, ses avantages de proximité avec l'Homme et les études déjà réalisées le font apparaître comme le meilleur candidat pour notre étude du traitement de la niche hématopoïétique par thérapie cellulaire, lors d'une ICT.

## **VII. Hypothèse de travail : Utilisation d'un vecteur cellulaire pour délivrer une protéine active sur la restructuration de la niche.**

### **VII.1 Les cellules souches adipeuses (ASC).**

Le tissu adipeux est une source abondante de cellules souches mésenchymateuses dont les résultats sont prometteurs dans le domaine de la médecine régénératrice. En effet, ces cellules peuvent être facilement récoltées en grand nombre sans risque de séquelles majeures pour le donneur. Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études ont fourni des données précliniques sur l'innocuité et l'efficacité des cellules souches dérivées du tissu adipeux, ce qui a permis de favoriser leur utilisation pour des applications cliniques.

Dans le domaine de la médecine régénérative, des études fondamentales et précliniques ont été menées pour remédier aux lacunes cliniques sur l'utilisation des cellules souches les plus utilisées jusqu'à présent: les cellules souches mésenchymateuses (CSM). Les CSM sont présentes dans de nombreux tissus adultes, le plus représentatif étant la moelle osseuse. Pendant de nombreuses années, les cellules issues de la moelle ont été la principale source de cellules souches

pour les applications du génie tissulaire ((Caplan AI, 1991); (Pittenger MF et al, 1999); (Caplan AL, 2007) ) mais leur prélèvement en quantités limitées couplée à leur faible représentation dans le tissu osseux ont conduit les chercheurs à se tourner vers d'autres sources.

Toutefois, des études récentes ont montré que le tissu adipeux sous-cutané donne un net avantage sur d'autres cellules souches sources en raison de la facilité avec laquelle le tissu adipeux peut être prélevé, ainsi que la facilité d'isoler des cellules souches à partir de ce tissu. (Schäffler A et al, 2007). Ces cellules sont obtenues par digestion enzymatique de tissu adipeux issu d'une liposuction. Le mélange de cellules stromales et vasculaires mis en culture par la suite a été nommé la fraction stromale vasculaire (FSV) (Traktuev DO et al, 2008). Une sous-population de cellules souches a par la suite été identifiée dans la FSV par Zuk *et al.* (Zuk PA et al, 2001); (Zuk PA et al, 2002).

La désignation est encore variable au sein de la communauté scientifique et plusieurs désignations leurs sont encore attribuées:

PLA (*Processed lipoaspirates*)

ADSC (*Adipose-Derived Stromal cells* ou *Adipose-Derived Stem Cells*)

AD-MSK (*Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells*)

ADRC (*Adipose-Derived Regenerative Cells*)

ASC (*Adipose Stem Cells*)

Les ASC prolifèrent de façon stable *in vitro* et peuvent, tout comme les CSM « classiques » issues de la moelle osseuse, se différencier vers les voies chondrocytaire, adipocytaire, myocytaire, neuronale et ostéocytaire ((Zuk PA et al, 2002); (Izadpanah R et al, 2006); (Romanov YA et al, 2005)). En outre, une équipe a récemment isolé une population d'ASC possédant une capacité de différenciation multipotente (Rodríguez LV et al, 2006).

### **VII.1.1 Caractérisation.**

Les ASC expriment différents marqueurs de surface communs aux CSM: CD10, CD13,

## VII. HYPOTHÈSE DE TRAVAIL : UTILISATION D'UN VECTEUR CELLULAIRE POUR DÉLIVRER UNE PROTÉINE ACTIVE SUR LA RESTRUCTURATION DE LA NICHE.

---

CD29, CD34, CD44, CD54, CD71, CD90, CD105, CD106, CD117, et STRO-1. Il faut cependant souligner que les CSM et les ASC perdent leur marqueur CD34 au cours de la culture (Kaiser S et al, 2007).

Les ASC sont négatives pour les marqueurs des lignées hématopoïétiques CD45, CD14, CD16, CD56, CD61, CD62E, CD104, ainsi que pour les marqueurs des cellules endothéliales CD31, CD144, et le facteur von Willebrand (Zuk PA et al, 2002); (Musina RA et al, 2005); (Romanov YA et al, 2005)). Morphologiquement, ces cellules ont la forme caractéristique de fibroblastes en fuseau et sont capables de la préserver après l'expansion *in vitro* ((Zuk PA et al, 2002); (Arrigoni E et al, 2009); (Zannettino AC et al, 2008)). Cependant, après un nombre de passages supérieur à 10, ces cellules s'étalent ce qui indique une perte de leur capacité de prolifération.

Les similitudes entre les ASC et les CSM semblent indiquer que les ASC pourraient être dérivées des CSM présentes dans le sang périphérique (0,03% des cellules circulantes), qui s'infiltrent dans le compartiment adipeux par les parois des vaisseaux ((Zuk PA et al, 2002); (Zannettino AC et al, 2008); (Brighton CT et al, 1992); (Canfield AE et al, 2000); (Bianco P et al, 2001)). D'autre part, selon une théorie récente, ces cellules souches seraient apparentées aux péricytes ((Traktuev DO et al, 2008); (Chen CW et al, 2009); (Crisan M et al, 2008); (Zannettino AC et al, 2008); (Tintut Y et al, 2003); (Abedin M et al, 2004); (Amos PJ et al, 2008)). En effet, les péricytes autour de micro-vaisseaux expriment l'alpha-actine des cellules musculaires lisses ( $\alpha$ -SMA) ainsi que certains marqueurs des CSM (CD44, CD73, CD90, CD105), mais elles n'expriment pas les marqueurs de cellules endothéliales ou hématopoïétiques (Chen CW et al, 2009). Les péricytes sont capables d'adhérer, de proliférer en culture en maintenant leur profil antigénique initial, et peuvent se différencier en os, cartilage et cellules graisseuses (Chen et al., 2009). En outre, les CSM injectées par voie systémique migrent vers les vaisseaux sanguins *in vivo* et se différencient en péricytes (Chen CW et al, 2009). Considérant les données ci-dessus, on peut supposer que les péricytes sont les précurseurs des CSM, mais cela ne signifie pas que toutes les CSM sont issues des péricytes (Chen CW et al, 2009) ou que tous les péricytes sont nécessairement des cellules souches ((Lin G et al, 2008); (Traktuev DO et al, 2008); (da Silva Meirelles L et al, 2008); (Abedin M et al, 2004); (Tintut Y et al, 2003); (Zannettino AC et al, 2008); (Amos PJ et al, 2008)).

## VII.HYPOTHÈSE DE TRAVAIL : UTILISATION D'UN VECTEUR CELLULAIRE POUR DÉLIVRER UNE PROTÉINE ACTIVE SUR LA RESTRUCTURATION DE LA NICHE.

---

Traktuev et al. (2008) ont défini une sous-population de péricytes en tant qu'ASC. Ces cellules sont CD34<sup>+</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, et CD144<sup>+</sup> et expriment des marqueurs de cellules mésenchymateuses, les antigènes des muscles lisses, et des marqueurs pericytaires, y compris les protéoglycanes chondroïtine sulfate (NG2), CD140a, et CD140b (PDGF  $\alpha$  récepteur et  $\beta$ , respectivement) ( (Traktuev DO et al, 2008); (Amos PJ et al, 2008)). Toutefois, Lin et al. (2008) n'ont pas pu co-localiser le CD34 et le CD104b, et en ont donc conclu que les cellules CD34<sup>+</sup> / CD31<sup>-</sup> du tissu adipeux vasculaire ne sont pas des péricytes.

Les différences dans l'expression de marqueurs de surface dans ces études peut s'expliquer par le stade de croissance de la culture (Romanov YA et al, 2005). De même, la variabilité de la positivité CD34 dans plusieurs rapports est probablement une conséquence de la régulation à la baisse d'expression de ce marqueur dans les quelques premiers jours de l'expansion *in vitro* (Traktuev DO et al, 2008).

### VII.1.2 Activité paracrine.

Le tissu adipeux participe activement au processus endocrinien sécrétant des cytokines et des facteurs de croissance (Kilroy GE et al, 2007). Les ASC sécrètent des niveaux élevés de différentes cytokines listées ci-après.

**VII. HYPOTHÈSE DE TRAVAIL : UTILISATION D'UN VECTEUR CELLULAIRE POUR DÉLIVRER UNE PROTÉINE ACTIVE SUR LA RESTRUCTURATION DE LA NICHE.**

Nom	Nom complet	Références
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	
EGF	Epidermal Growth Factor	Chen et al;. 2009, Kilroy et al;. 2007,
FGFb	Basic Fibroblast Growth Factor	Rehman et al 2004; Cai et al, 2007;.
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor	Ebrahimian et al, 2009;. Kim et al,
TGF-β	Transforming Growth Factor β	2009;. Kim et al, 2007;. Wei et al,
IGF	Insulin Growth Factor	2009
BDNF	Brain-Derived neurothrophic Factor	
FLT-3 Ligand	FMS-like tyrosine kinase 3	
G-CSF	Granulocyte Colony stimulating Factor	
GM-CSF	Granulocyte/Monocyte Colony stimulating Factor	
M-CSF	Monocyte Colony stimulating Factor	
IL-6	Interleukine 6	
IL-7	Interleukine7	Kilroy et al 2007, Rehman et al 2004
IL-8	Interleukine8	
IL-11	Interleukine11	
IL-12	Interleukine 12	
LIF	Leukemia Inhibitory Factor	
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α	
HGF	Hepatocyte Growth Factor	Cai et al, 2007

**Tableau 6:** *Tableau récapitulatif des cytokines sécrétées par les ASC.*

Cette sécrétion de facteurs paracrines par le tissu adipeux contribue probablement à des concentrations élevées de ces cytokines dans les cas d'obésité ((Kilroy GE et al, 2007); (Hotamisligil GS et al, 1995)).

Il est important de noter que ces facteurs de croissance angiogéniques et anti-apoptotiques sont sécrétés en quantité suffisante pour induire une activité biologique et que leur sécrétion augmente de manière significative dans des conditions hypoxiques ((Rehman J et al, 2004); (Cai L et al, 2007); (Lee EY et al, 2009)). Le HGF est peut-être le principal facteur angiogénique sécrété par les ASC et joue un rôle central dans les effets paracrines. L'inhibition de l'expression du HGF a montré une suppression des effets angiogéniques et régénératifs des ASC dans les tissus ischémiques. Inhiber l'expression de HGF réduit la capacité des ASC à favoriser la prolifération des cellules endothéliales et supprime leur effet pro-angiogénique *in vitro* (Cai L et al, 2007).

### VII.1.3 Régénération tissulaire.

Les matériaux actuellement utilisés dans la régénération des tissus mous en chirurgie esthétique, qui comprennent le collagène, l'acide hyaluronique, le silicium et d'autres matières de charge, ont plusieurs inconvénients tels que l'immunogénicité, le coût élevé, et l'allergénicité, et le risque de transmission de maladies infectieuses. D'un autre côté, les greffes autologues de graisse sont plus largement disponibles, mais une limite de cette technique est la faible persistance du greffon dans l'organisme (Minn KW et al, 2010). Les greffons adipeux transplantés peuvent perdre du volume au fil du temps en raison de la résorption du tissu qui peut entraîner la perte de 20-90% du volume du greffon d'origine (Cherubino M et Marra KG, 2009). La solution idéale pour la régénération des tissus mous serait de favoriser la régénération des tissus adipeux vascularisés pour combler le défaut de masse dû à la lésion (Brayfield C et al, 2010).

Récemment, Frerich et al. (Frerich B et al, 2005) font état d'une co-culture *in vitro* en utilisant le modèle d'ASC humaines et de cellules endothéliales de veine ombilicale, ayant abouti à la formation d'un réseau capillaire.

Les ASC sécrètent la quasi-totalité des facteurs de croissance qui prennent part à une cicatrisation normale ((Ebrahimian TG et al, 2009); (Blanton MW et al, 2009); (Kim WS et al, 2007);(Rehman J et al, 2004)). Après greffe, les ASC peuvent rester viables et sécrètent des facteurs de croissance de façon continue et régulée en réponse à des stimuli environnementaux, tout comme c'est le cas dans le processus de cicatrisation naturelle (Badillo AT et al, 2007). Les ASC améliorent la guérison des plaies par l'augmentation de la densité des vaisseaux, l'augmentation de l'épaisseur du tissu, et le dépôt de collagène (Ebrahimian TG et al, 2009). Elles améliorent également l'aspect esthétique des cicatrices qui en résulte (Blanton MW et al, 2009).

Un approvisionnement sanguin est crucial pour la cicatrisation des plaies. Le VEGF sécrété par les ASC induit la migration et la prolifération des cellules endothéliales et donc l'augmentation de la vascularisation du lit de la plaie ((Lorens HP et al, 2006); (Rehman J et al, 2004)). Il est à la fois expérimentalement et cliniquement démontré que l'administration topique d'ASC augmente le taux de guérison de la plaie ((Ebrahimian TG et al, 2009); (Rigotti G et al, 2007)). Kim et al. (2007) ont démontré que les ASC stimulent la prolifération, la migration et la sécrétion de collagène de

type I par les fibroblastes dans un modèle de plaie *in vitro*.

#### **VII.1.4 Perspectives de thérapie cellulaire.**

Les thérapies cellulaires utilisant les ASC sont largement prometteuses dans divers domaines cliniques basés sur les résultats en recherche fondamentale. Ces cellules ont été utilisées en clinique pour stimuler la réparation osseuse dans les déficits osseux crâniens (Lendeckel S et al, 2004), leur utilisation pour le traitement des maladies cardio-vasculaires, sans effets secondaires cardiaques (par exemple, une instabilité électrique) a également été démontrée (Bai X et Alt E, 2010).

Ces cellules sont connues pour leur « homing » dans certains tissus comme les tissus lésés. Bien que les mécanismes sous-jacents de la migration des ASC restent à déterminer, la clarification des rôles des récepteurs de chimiokines et des molécules d'adhérence de ces cellules peut conduire à l'élaboration de stratégies thérapeutiques pour améliorer le recrutement des ASC cultivées au niveau des tissus blessés ou endommagés.

Nous avons donc décidé d'utiliser les ASC dans notre modèle pour plusieurs raisons:

- La facilité de prélèvement du tissu adipeux
- Leur forte capacité proliférative.
- Le « homing » de ces cellules au niveau des zones déplétées de la moelle osseuse irradiée.
- Leur faible immunogénicité.
- Leur potentialité de soutien de la néovascularisation
- La possibilité de transfection efficace de ces cellules notamment par une technique d'électroporation (Zaragosi LE et al, 2007).

## VII.2 **La protéine choisie a été le morphogène Sonic Hedhehog.**

### VII.2.1 Description.

Le gène Sonic Hedgehog (Shh) a été découvert en 1978 lors de recherches sur le développement embryonnaire de la drosophile au Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire. Ces travaux ont été récompensés par le prix Nobel de médecine et physiologie 1995, et le gène doit son nom à un personnage de jeux vidéos très populaire à cette époque. Shh est le membre le plus étudié de la famille des morphogènes de type hedgehog qui en comporte trois, Sonic Hedgehog (Shh), Desert Hedgehog (Dhh) et Indian Hedgehog (Ihh).

Un morphogène est un gène codant une protéine produite pendant le développement embryonnaire et dont le gradient gouverne la formation des axes et des polarités de l'embryon plus particulièrement au niveau du système nerveux central chez les vertébrés. Shh est également produit par certaines cellules adultes telles que les cellules épithéliales de l'intestin et de l'estomac (Zavros Y et al, 2008) et est impliqué dans les phénomènes de division cellulaire et le développement de certains cancers notamment au niveau gastro-intestinal.

La protéine Sonic hedgehog est issue de l'autocatalyse du précurseur de 45 kDa qui produit deux protéines distinctes dont une seule semble avoir une activité biologique; cette dernière, d'un poids moléculaire de 20 kDa, possède un domaine de signalisation N-terminal (Hh-N).

L'autoprotéolyse du précurseur passe par la formation d'un intermédiaire thioester qui va subir une attaque nucléophile de la part d'une molécule de cholestérol, ce qui engendre la formation d'une liaison covalente entre cette molécule et la partie carboxy-terminale du peptide Hh-N. La protéine Hh-N ainsi modifiée est alors soumise à une seconde modification lipidique : l'introduction d'un acide gras sur la cystéine amino-terminale (Pepinsky RB et al, 1998). Cette dernière modification met en jeu une acyltransférase, *skinny hedgehog*, mise en évidence par Chamoun et collaborateurs à partir des études génétiques et biochimiques du mutant *ski(-/-)* qui ont révélé

l'incapacité de ce mutant à ajouter un groupement palmitate amino-terminal (Chamoun Z et al, 2001). Alors que la molécule de cholestérol permet l'ancrage de Hh-N à la surface de la cellule, l'acide gras augmente son activité biologique. Hh-N ainsi modifiée est responsable de la totalité des activités signalisatrices identifiées pour les protéines Hh (Ingham PW, 2001).

### **VII.2.2 Signalisation.**

Chez la drosophile, la cascade de signalisation est initiée par la liaison de la protéine Sonic Hedgehog au récepteur à 12 domaines transmembranaires patched (Ptc). Ptc est un inhibiteur de la protéine Smoothened (Smo), un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G de la famille Wnt/Frizzled qui est capable d'activer le clivage protéolytique du complexe de signalisation (HSC). Ce complexe protéique comprend le facteur de transcription Cubitus interruptus (Ci), la sérine / thréonine kinase Fused (Fu), la molécule de kinésine comme Costal 2 (Cos2) et suppresseur de fusion (Sufu). Cos2 se lie également à la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase CK1 (anciennement la caséine kinase 1) et la glycogène synthase kinase 3 (GSK3), qui sont d'autres kinases impliquées dans la voie de signalisation Hedgehog.

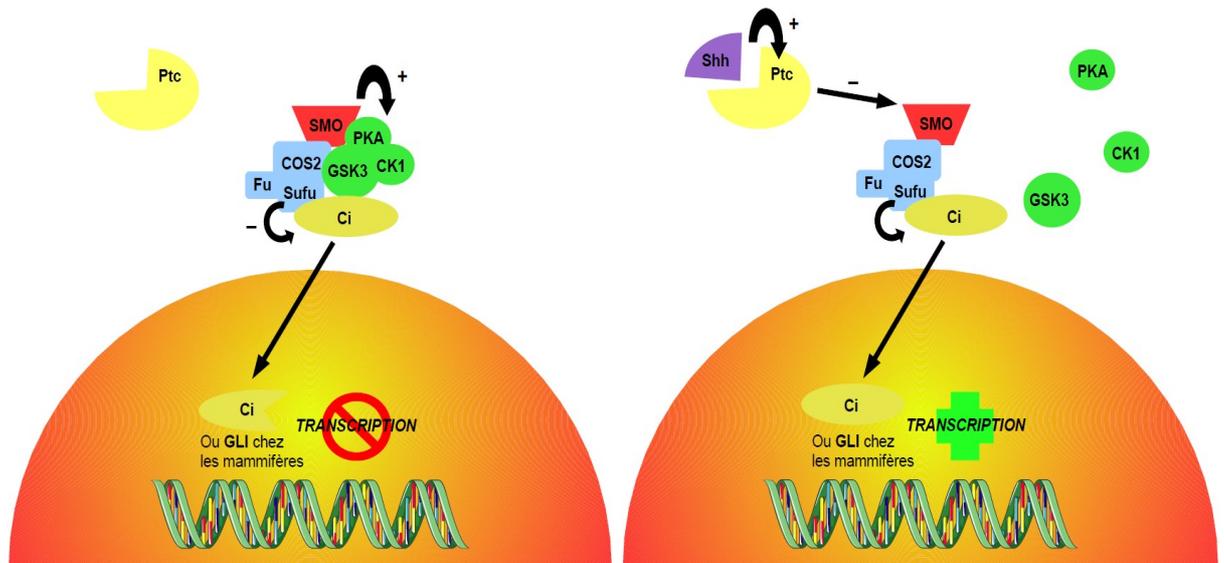
En l'absence de ligand, Ptc réprime Smo et empêche l'activation de la voie de signalisation Hedgehog. Le HSC est lié aux microtubules et à la membrane et interagit avec la protéine Smo via Cos2. Cubitus interruptus subit alors un clivage protéolytique via PKA, CK1 et GSK3 pour produire une forme inactive de Ci, qui pénètre dans le noyau et inhibe la transcription du gène cible de la voie de signalisation (**illustration 10**).

En présence de Sonic Hedgehog, l'inhibition de PTC sur Smo est levée et le HSC est libéré des microtubules. Smo est phosphorylée par la PKA, ce qui provoque la libération de CK1 et PKA, CK1 et GSK3. Ci n'est alors plus inhibé par Sufu et est donc libre de pénétrer dans le noyau pour induire la transcription de gènes cibles Hedgehog comme engrailed, Ptc et decapentaplegic.

La voie de signalisation Hedgehog chez les vertébrés a de nombreux points communs avec celle de la drosophile. Chez les mammifères, il existe deux gènes Ptc (Ptc 1 et 2) ainsi que trois homologues Ci connus sous le nom Gli1, Gli2 et Gli3. Gli1 et Gli2 sont des activateurs de la transcription, alors que Gli3 fonctionne comme un répresseur de cette fonction. Les régulateurs de

## VII.HYPOTHÈSE DE TRAVAIL : UTILISATION D'UN VECTEUR CELLULAIRE POUR DÉLIVRER UNE PROTÉINE ACTIVE SUR LA RESTRUCTURATION DE LA NICHE.

signalisation Hedgehog chez les vertébrés comprennent la mégaline, un membre de la famille des low-density lipoprotein (LDL) qui se lie à Hedgehog, et la protéine SIL qui fonctionne en aval de Ptc.



**Illustration 10:** Voie de signalisation de Sonic Hedgehog permettant l'activation de la transcription par l'intermédiaire du facteur Gli.

### VII.2.3 Activités biologiques ayant conduit au choix de cette protéine.

Parmi les différents candidats régulant directement ou indirectement l'hématopoïèse la voie de signalisation hedgehog peut représenter un acteur essentiel dans l'hématopoïèse adulte à l'état d'homéostasie et de celle induite par le stress. Il a été décrit que Sonic Hedgehog induit l'expansion des cellules hématopoïétiques pluripotentes humaines et le repeuplement médullaire chez la souris immunodéprimée via une régulation de la Bone Morphogenic Protein (BMP) (Bhardwaj G et al, 2001). Dans les cellules répondant à Shh, le récepteur transmembranaire Ptc1 induit l'inhibition de la protéine smoothened qui conduit à l'activation de Noggin, un inhibiteur spécifique de BMP-4. Cette cascade de signalisation a pour résultat un effet mitogène sur les cellules-cibles. Le rôle précis du facteur de transcription Gli reste cependant débattu.

Cependant, d'autres études ont contesté la régulation myéloïde et lymphoïde de Ptc1 et ont

## VII. HYPOTHÈSE DE TRAVAIL : UTILISATION D'UN VECTEUR CELLULAIRE POUR DÉLIVRER UNE PROTÉINE ACTIVE SUR LA RESTRUCTURATION DE LA NICHE.

---

suggéré que la signalisation Hedgehog peut être indispensable pour la fonction des cellules souches hématopoïétiques adultes (CSH). En ce qui concerne le micro-environnement, il a été décrit que Shh pourrait être impliqué dans la vascularisation de certains tissus embryonnaires et présenterait une activité pro-angiogénique chez l'adulte indépendamment du facteur de transcription Gli (Renault MA et al, 2010); (Dohle E et al, 2010); (Chinchilla P et al, 2010). Ce dernier effet est susceptible d'être induit indirectement par la sécrétion de VEGF, d'angiopoïétine 1 et 2 par les fibroblastes activés (Fujii T et Kuwano H, 2010). De plus ce facteur améliorerait la régénération des cellules ostéoblastiques de la niche endostéale (Dohle E et al, 2010).

---

## OBJECTIFS

Lors d'une ICT, le syndrome aigu d'irradiation qui s'ensuit est caractérisé par une diminution drastique des taux sanguins des différents éléments figurés du sang. Consécutivement à l'aplasie médullaire radio-induite et hors greffe de CSH, l'organisme entame une reconstitution endogène à partir des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques résiduels. Cependant toujours lors de l'ICT, l'ensemble des cellules de la niche est touché, ce qui induit d'une part la mort par apoptose des CSH et d'autre part une déstructuration de la vascularisation ainsi qu'une perte de la fonction de soutien et de maintien de l'homéostasie assurée par les cellules du micro-environnement. Ces derniers effets réduisent le potentiel de régénération du tissu hématopoïétique ainsi que les chances de réussite d'une éventuelle prise de greffe thérapeutique.

Le premier objectif de notre étude a été l'évaluation des effets des rayonnements ionisants sur les différents progéniteurs des cellules de la niche hématopoïétique pour décrypter *in vitro* l'évolution de cette niche à moyen terme post irradiation et proposer des stratégies de traitement du SAI visant les cellules du micro-environnement dans sa globalité. Ce premier point a été réalisé notamment par dénombrement des progéniteurs clonogènes mésenchymateux et endothéliaux dans différentes conditions d'irradiation  $\gamma$  et d'oxygénation.

L'étude bibliographique nous a par la suite orientés sur le morphogène Sonic Hedgehog. En effet, la voie de signalisation hedgehog serait un acteur majeur de l'hématopoïèse adulte aussi bien dans des conditions d'homéostasie que pathologiques. Il a été également décrit que Sonic Hedgehog, induit l'expansion des cellules hématopoïétiques pluripotentes humaines et permet un repeuplement cellulaire chez les souris immunodéprimées. De plus, comme précisé précédemment, Shh est impliqué dans la formation du réseau vasculaire embryonnaire et conserve une activité pro-angiogénique chez l'adulte. Shh posséderait donc un effet positif global sur la niche hématopoïétique, tant sur les CSH que sur le micro-environnement. Nous avons donc décidé d'utiliser cette protéine *in vivo* dans un protocole de traitement du SAI par thérapie cellulaire dans un modèle de macaque irradié à 8 Gy par une source  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ . L'objectif de ce travail est d'améliorer la restauration hématopoïétique post-ICT dans ce modèle, d'une part par un repeuplement cellulaire de la niche à court terme mais aussi par une thérapie visant à améliorer la revascularisation du tissu et la capacité de soutien du micro-environnement à long terme.

En préalable de cette étude principale, d'autres objectifs ont dû être réalisés :

- Le choix d'une source cellulaire pour la production d'un greffon de cellules manipulées génétiquement de taille clinique.
- La conception et la production en masse du vecteur codant la protéine d'intérêt.
- La vérification de l'activité de Shh sur les CSH ainsi que sur la formation d'une néovascularisation *ex vivo*.



# **D**euxième Partie



---

## **Étude Expérimentale**

---

# I. Matériel et méthodes

## I.1 Évolution des composants cellulaires de la niche irradiée in vitro.

### I.1.1 Culture cellulaire.

#### *CSM*

Un prélèvement de moelle d'un volume d'environ 5 mL a été réalisé au niveau de la crête iliaque postérieure ou de la tête humérale d'un macaque. Ce prélèvement a été mélangé volume à volume avec de l'IMDM (Iscove's *minimum essential medium* – Invitrogen Life Technologies) supplémenté avec de l'héparine. Les globules rouges ont été éliminés par une lyse hypotonique, les cellules ont été lavées en PBS et resuspendues en IMDM supplémenté avec 2% de SVF et 10mM d'Hepes.

Les cellules nucléées ont étéensemencées dans des flasques de 150 cm<sup>2</sup> (Techno Plastic Products) à une densité de 6000 cellules/cm<sup>2</sup>. Le milieu de culture utilisé est le Minimum Essential Medium alpha (MEM $\alpha$ , GIBCO – Invitrogen Life Technologies) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (HyClone), 0,1mg/mL de Pénicilline/Streptomycine (GIBCO - Invitrogen Life Technologies) et 10 $\mu$ g/mL de cyprofloxacin (EUROMEDEX). Les cellules fusiformes adhérant rapidement au plastique sont définies comme étant les cellules souches mésenchymateuses (CSM).

Les cellules nuclééesensemencées comme décrit précédemment ont été cultivées dans un incubateur à atmosphère humide à 37°C et une teneur en CO<sub>2</sub> de 4,5%. Les cellules ont été maintenues en culture jusqu'à ce qu'elles aient effectué cinq doublements et parviennent à 90% de confluence à la surface des flasques. Le milieu de culture a été remplacé une fois par semaine.

À confluence le milieu de culture a été aspiré puis le tapis cellulaire est lavé deux fois avec 5mL de PBS. Ensuite, 4mL de solution constituée d'un mélange volume à volume de trypsine-EDTA et de Versène (GIBCO - Invitrogen Life Technologies) ont été utilisés pour détacher les CSM du plastique de culture. Les flasques ont été placées dans un incubateur à atmosphère humide à 37°C et 4,5% de CO<sub>2</sub> pendant 5 min. L'action de la trypsine a été inhibée par l'ajout de 4 mL de milieu de culture contenant 10% de SVF. La suspension cellulaire a été transférée dans des tubes en polypropylène à fond conique. Le fond des flasques a été lavé deux fois avec 5 mL de PBS afin de

recupérer la totalité des cellules. Les CSM ont été centrifugées à 300g pendant 10 minutes à température ambiante puis comptées sur cellule de Malassez.

A chaque passage, l'ensemencement et le milieu de culture sont les mêmes que ceux de l'ensemencement initial.

## **I.1.2 Étude de radiosensibilité.**

### ***I.1.2.1 CFU-F.***

La radiosensibilité des CSM a été évaluée par le dénombrement des colonies formées à partir d'une cellule initiale. Les cellules ont été récoltées, comptées puis ensemencées à une densité de 40 cellules/cm<sup>2</sup> dans onze flasques de 75cm<sup>2</sup>. Les flasques sont ensuite irradiées dans un irradiateur gamma <sup>137</sup>Cs autoprotégé (IBL-637, CIS-BIO international, Saclay, France), à raison d'une seule dose par flasque. Les doses s'échelonnent de 0 à 5Gy par palier de 0,5Gy.

Le milieu de culture a été remplacé 7 jours après l'irradiation et les colonies ont été marquées par rinçage des flasques en PBS 1X puis par incubation des colonies dans une solution de Cristal Violet pendant quelques secondes. Les boîtes de culture ont ensuite été rincées à l'eau du robinet. Les colonies ont été évaluées après 15 jours. Une colonie est considérée en tant que telle à partir de 20 cellules. L'expérience a été réalisée en duplicate.

Cette expérience a été reproduite dans différentes conditions d'oxygénation de l'atmosphère des incubateurs : 20%, 5% et 1%.

### ***I.1.2.2 CFU-endothéliales.***

La radiosensibilité des cellules souches endothéliales a été évaluée avec la même technique que celle utilisée pour les CSM. Les progéniteurs endothéliaux à forte capacité de prolifération (> 100 doublements) issus de sang de cordon ombilical ou *high proliferative potential-endothelial colony forming cell* (HPP-ECFC) (Lonza, Bâle) ont été ensemencés à 40 cellules par cm<sup>2</sup> et cultivées pendant la même période dans le milieu EGM-2 (Lonza, Bâle). Ce milieu est supplémenté avec différents facteurs comprenant des cytokines et des facteurs de croissance spécifiques pour la prolifération des cellules endothéliales : EGF, hydrocortisone, VEGF, FGF-B, IGF-1, acide ascorbique et héparine.

### **I.1.3 Évaluation de la mort cellulaire post irradiation *in vitro*.**

#### ***I.1.3.1 Évaluation de l'apoptose.***

L'apoptose des CSM a été évaluée post-irradiation gamma à une dose de 2,5 Gy par cytométrie en flux après marquage fluorescent des cellules apoptotiques par le test polycaspases.

Les caspases activées dans les cellules apoptotiques sont détectées par fluorescence à l'aide du kit « carboxyfluorescein FLICA apoptosis detection » (Immunochemistry Technologies, USA) selon les recommandations du fabricant. Cette technique utilise un réactif non toxique perméant appelé « fluorochrome inhibitor of caspases » (FLICA) qui, une fois à l'intérieur des cellules, se lie de façon covalente à un résidu cystéine des caspases activées.

#### ***I.1.3.2 Évaluation de la sénescence.***

Dans un premier temps, les CSM ont été cultivées jusqu'à 90% de confluence dans des flasques de culture de 25cm<sup>2</sup> dans les conditions décrites précédemment. Les cellules ont par la suite été irradiées à 2,5Gy dans un irradiateur autoprotégé (IBL-637, CIS-BIO international, Saclay, France)

Quarante-huit heures après irradiation, la sénescence a été évaluée à l'aide du kit Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling) conformément au protocole élaboré par le fournisseur.

Pour chaque flasque dans les groupes témoins et les groupes irradiés, 10 champs ont été évalués au microscope optique. Pour chacun des champs, les cellules positives pour le marquage  $\beta$ -galactosidase ont été dénombrées.

## **I.2 Élaboration de l'outil de thérapie génique : ASC manipulées pour sécréter la protéine Sonic Hedhehog.**

### **I.2.1 Insert codant la protéine recombinante Shh.**

Pour l'étude de thérapie génique, l'isoforme N-terminale de Shh (Porter JA et al, 1995) a été clonée dans le vecteur plasmidique pIRES-2-EGFP (Clontech Laboratories, Mountain View,

California). Pour évaluer l'efficacité de la nucléofection et déterminer la taille du greffon ASC-Shh, nous avons utilisé le gène rapporteur *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP).

L'insert utilisé dans notre manipulation a été réalisé sur une séquence du gène SHH chez l'humain (Gene ID : 6469) et plus particulièrement sur la séquence de son ARN messager.

Afin de préserver l'activité de la protéine Shh sécrétée un codon "stop" a été introduit à la fin du gène cloné. Cette procédure évite la production d'une protéine de fusion avec l'eGFP. La séquence des amorces a été dessinée à l'aide du logiciel MacVector (Accelrys, Sand Diego, California) à partir de la séquence de référence NM\_000193. Les amorces utilisées pour amplifier la séquence clonée sont listées ci-dessous.

Amorces « long fragment »					Produit		
Nom	Séquence	Emplacement	longueur	Tm	longueur	T°C hybridation	% G+C
[HSHH-CF1]	5'-GGGACAGCTCGGAAGTCATCAGT-3'	117-139	23 nt	55.9	767 nt	60.1	61.0
[HSHH-CR2]	5'-GCGGTCCAGGAAAGTGAGGA-3'	883-864	20 nt	53.8			

Amorces fragment final					Produit		
Nom	Séquence	Emplacement	longueur	Tm	longueur	T°C hybridation	% G+C
[HSHH-CF1]	5'-GGGACAGCTCGGAAGTCATCAGT-3'	117-139	23 nt	55.9	633 nt	59.9	58.8
[HSHH-CR1]	5'-GGAAGCAGCCTCCCATTG-3'	749-730	20 nt	55.9			

**Illustration 11:** Amorces utilisées pour le clonage du gène humain *Sonic Hedgehog*.

### **1.2.2 Réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR).**

Les amorces ont été dessinées lors d'une étude précédente à l'aide du logiciel MacVector en respectant les paramètres suivants :

- Taille des amorces de 18 à 25 nucléotides,
- Taille du produit compris entre 80 et 120 nucléotides (pour les PCR de dosages)
- Pourcentage de GC des amorces compris entre 47 et 53%
- Tm de produits compris entre 55 et 80°C
- Différence de température d'Annealing inférieure à 2°C

Le principe du « design » est basé sur la réalisation d'une séquence consensus des séquences trouvées sur les banques de données.

L'obtention de la séquence codante utilisée N-terminale du gène Shh dans notre étude a nécessité plusieurs étapes.

Dans un premier temps les ARNm codant la protéine Shh présents dans des cellules issues de cancers colorectal ont été extraits à partir des lignées cellulaires IEC et HT-29.

Puis ces ARNm ont ensuite été convertis en ADNc par une réaction de transcription inverse.

La réaction a été effectuée avec le kit Euroscript RT<sup>®</sup> (Eurogentec, Liège). L'ARN a été mélangé avec le mix réactionnel composé de tampon de réaction (1X), MgCl<sub>2</sub> à 5 mM, une solution de dNTP à 0,5 mM, des amorces Oligo dT à 0,06 μM, 4 Unités d'inhibiteur de RNase et 12,5 Unités de transcriptase inverse Euroscript RT<sup>®</sup>. Les échantillons ont été incubés au bain-marie et sur bloc thermique selon le cycle suivant : 10 min à 25°C, 30 min à 48°C et 5 min à 95°C.

Enfin, une PCR semi-nichée en deux étapes a pu être réalisée à partir de ces ADN complémentaires. Le principe de la PCR semi-nichée est d'amplifier un premier fragment d'ADN que l'on utilisera pour effectuer la seconde PCR.

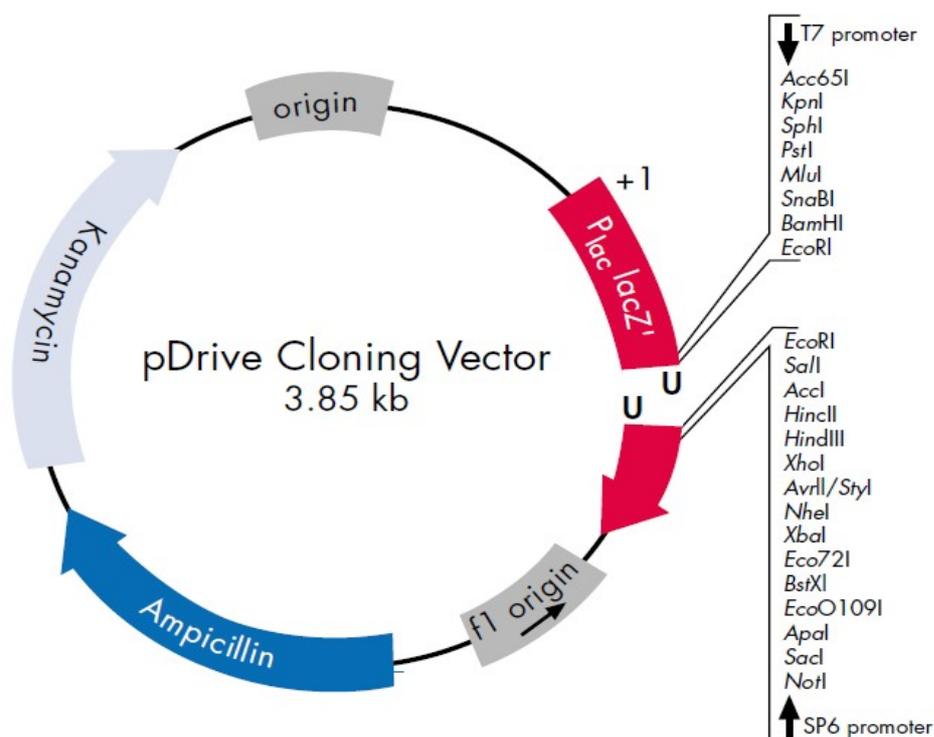
Le premier fragment ou « long fragment » est issu de la polymérisation effectuée avec un couple d'amorce dont le produit est plus grand que le fragment final. Cette technique permet d'obtenir une meilleure spécificité de la PCR quant au produit obtenu. Les deux PCR, F1/R2 et F1/R1, ont été réalisées dans les mêmes conditions dans un thermocycleur classique à l'aide du Kit KOD-HOT start DNA pol (TaKaRa). Le mix de réaction est composé de Tampon de PCR 1X, 1mM de MgSO<sub>4</sub>, 0,4μM d'amorce sens, 0,4μM d'amorce antisens, 200μM de mix de dNTP, 1 Unité de KOD-HOT start DNA polymérase, 200ng de matrice ADN et de l'eau à une quantité suffisante pour 50μL.

### **1.2.3 Plasmides.**

Plusieurs vecteurs plasmidiques ont été utilisés dans cette étude. Le premier vecteur a été le pDRIVE (Qiagen). Ce plasmide navette nous a permis de réaliser deux étapes :

L'addition d'adénine sur la partie 3' de l'insert SHH pour que la séquence transcrite du plasmide puisse être reconnue comme un ARNm par les ribosomes des cellules eucaryotes grâce à sa queue poly- A.

Le pDRIVE possède son site multiple de clonage (*multiple cloning site* ou MCS) au sein du gène LacZ codant pour la SA- $\beta$ -Galactosidase qui permet la sélection blanc/bleu des colonies bactériennes ayant intégré un plasmide contenant notre insert. Brièvement, les colonies sont cultivées sur un gel d'agar nutritif contenant un antibiotique à 10mg/mL, ici de l'ampicilline. Cette première sélection permet de sélectionner les bactéries ayant intégré le plasmide. Pour sélectionner les bactéries ayant intégré le plasmide contenant l'insert il faut incuber ces bactéries en présence de X-Gal. Les bactéries possédant un gène de la SA- $\beta$ -Galactosidase fonctionnel issu du plasmide vide développeront alors une réaction colorée bleue alors que les cellules qui contiennent le plasmide avec l'insert resteront blanches. La transformation de ce plasmide a été effectuée dans des bactéries compétentes DH5 $\alpha$ T1 ne pouvant pas réaliser l' $\alpha$ -complémentation de manière endogène.

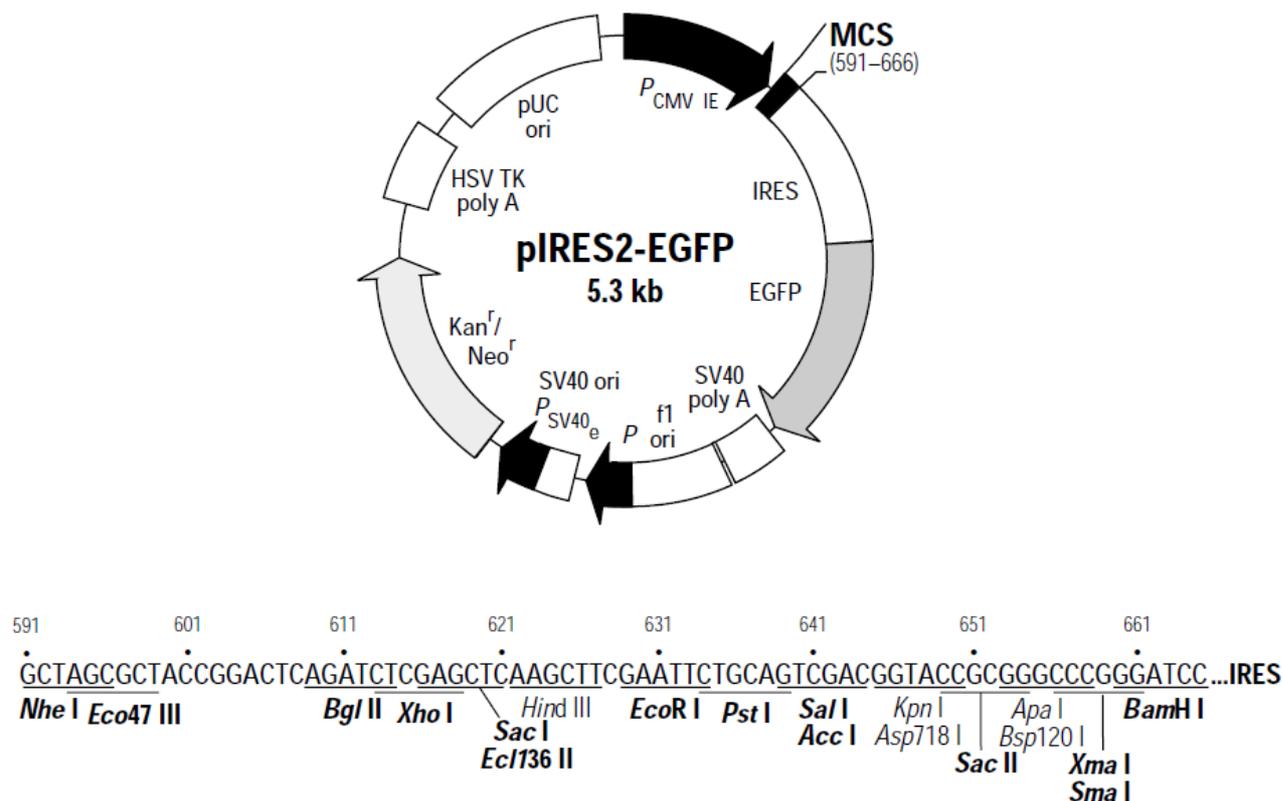


**Illustration 12:** Carte du plasmide commercial pDRIVE.

Une fois ce premier clonage réalisé, un sous-clonage dans le plasmide final a pu être effectué.

La base du vecteur utilisé pour l'étude de thérapie génique est le pIRES2-eGFP (BD Biosciences Clontech, San José – Californie). Ce plasmide est un vecteur à ADN bicistronique. En effet le gène codant l'eGFP est contrôlé par un promoteur faible de type IRES et, dans la suite de la séquence, le gène introduit dans le site multiple de clonage (MCS) est, lui, sous la gouvernance d'un

promoteur constitutif. Ce système permet la co-expression du gène rapporteur et du gène d'intérêt sans avoir recours à une protéine de fusion qui pourrait compromettre l'activité biologique de la protéine issue de l'expression du gène d'intérêt.



**Illustration 13:** Carte du plasmide commercial pIRES2-eGFP et séquence du site multiple de clonage..

#### **I.2.4 Digestions enzymatiques et réactions de ligation.**

Les réactions de digestion enzymatique des plasmides et des produits de PCR ont été réalisées avec les enzymes de restriction issues de la gamme Sigma-Aldrich. Lorsque les différentes enzymes ont été compatibles avec un même tampon de réaction, une double digestion a pu être effectuée. La réaction proprement dite a été effectuée par incubation du « mix » contenant le tampon de digestion, l'enzyme de restriction et le produit pendant 1 heure 30 dans un bain-marie à 37°C.

### **I.2.5 Transformation des plasmides dans les bactéries compétentes.**

Les bactéries compétentes DH5 $\alpha$ T1 ont été transformées de la manière suivante:

Les cellules ont été incubées 20 minutes sur de la glace puis 40 secondes dans un bain-marie à 42°C en présence de 0,5 $\mu$ L de plasmide. Le mélange a ensuite été rapidement refroidi avec de la glace et 350  $\mu$ L de milieu SOC ont été ajoutés. Les bactéries ont été incubées 1h à 37°C avant d'être étalées sur des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre contenant du milieu semi-solde LB AGAR.

L'antibiotique de sélection plasmidique (Kanamycine pour le pIRES-2-eGFP et Ampicilline pour le pDRIVE; la solution mère d'antibiotique est à une concentration 1000X soit 10mg/mL) est ajouté au moment où le milieu semi-solide est coulé dans les boîtes.

### **I.2.6 Electrophorèse.**

A chaque étape du clonage, l'insert Shh a été purifié par migration sur gel d'électrophorèse.

Pour les PCR de détection, les fragments issus des digestions enzymatiques ont été chargés dans les puits d'un gel d'agarose à 2% en tris-borate EDTA (TBE Sigma-Aldrich). La migration a été réalisée à 100 Volts pendant une heure en présence de SybrSafe. Cet intercalant permet la détection des bandes d'acides nucléiques avec de la lumière bleue et non des UV. En effet les UV pourraient altérer la séquence nucléotidique de l'insert.

Pour les étapes de clonage un gel d'agarose *Low Melting* (NuSieve) à 2% à été utilisé. Cet agarose particulier permet de récupérer les bandes d'acides nucléiques après la migration et de les purifier.

### **I.2.7 Minipreps et extraction des acides nucléiques.**

L'extraction des acides nucléiques issus de la migration sur gel Low Melting a été réalisée à l'aide d'un protocole de phénol/chloroforme.

Dans un premier temps, la bande d'acides nucléiques d'intérêt a été découpée et introduite dans un tube Eppendorf<sup>®</sup> contenant environ 100 $\mu$ L d'eau ultra-pure. Le tube a été incubé dans un

bain-marie à 56°C pour faire fondre la bande de gel.

Une fois le gel fondu, 1 volume de phénol à pH 7 (Aquaphenol, Appligene) et 0,2 volume de chloroforme ont été ajoutés au mélange puis le tube a été centrifugé 15 minutes à 14.000 tours par minute. La phase aqueuse a été récupérée et un volume égal de chloroforme lui a été additionné.

Après une nouvelle phase de centrifugation 15 minutes à 14.000 tours par minute, la phase aqueuse est à nouveau récupérée. Dans ce nouveau tube, 0,1 volume d'acétate de sodium pH 7, 1 µL de glycogène et 2,5 volumes d'éthanol absolu ont été ajoutés.

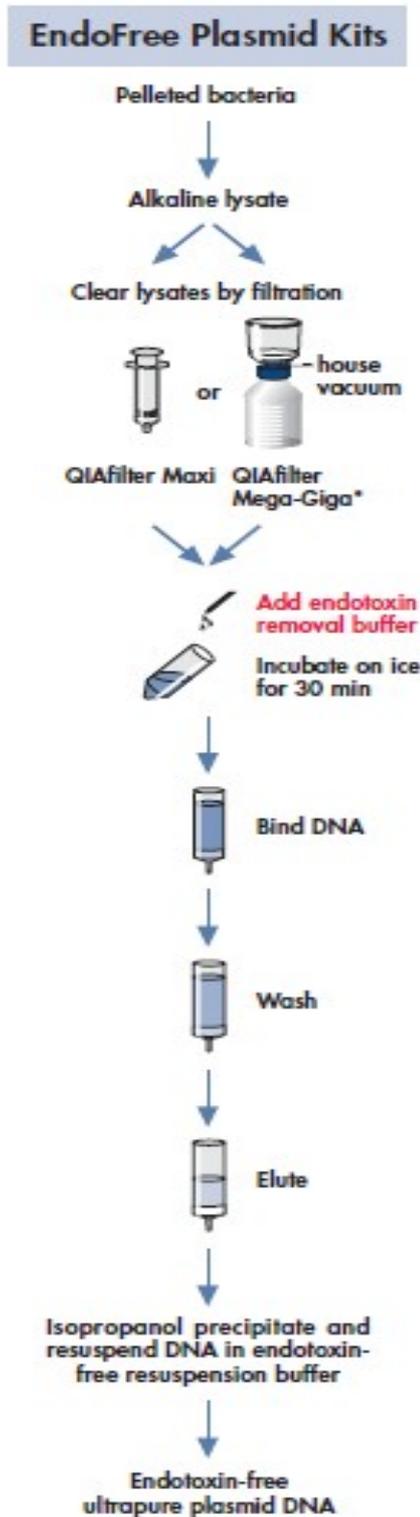
Les acides nucléiques ont été précipités 2h à -20°C.

Le tube a été centrifugé et le culot d'acides nucléiques a été lavé avec 1 mL d'éthanol à 70%. Après une dernière centrifugation, le surnageant a été éliminé et le culot mis à sécher quelques minutes à température ambiante.

Enfin, le culot a été dissout dans 20 µL d'eau ultra-pure et dosé à l'aide d'un spectrophotomètre (NanoDrop).

Les cultures bactériennes ayant servi à produire le plasmide codant Shh ont été effectuées en suivant le protocole de l'*Endofree Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) en suivant le protocole fourni par le fournisseur (<http://www.qiagen.com>). Le pIRES-2-eGFP comprenant une cassette de résistance à la Kanamycine, c'est cet antibiotique qui a permis la sélection bactérienne dans les minipreps.

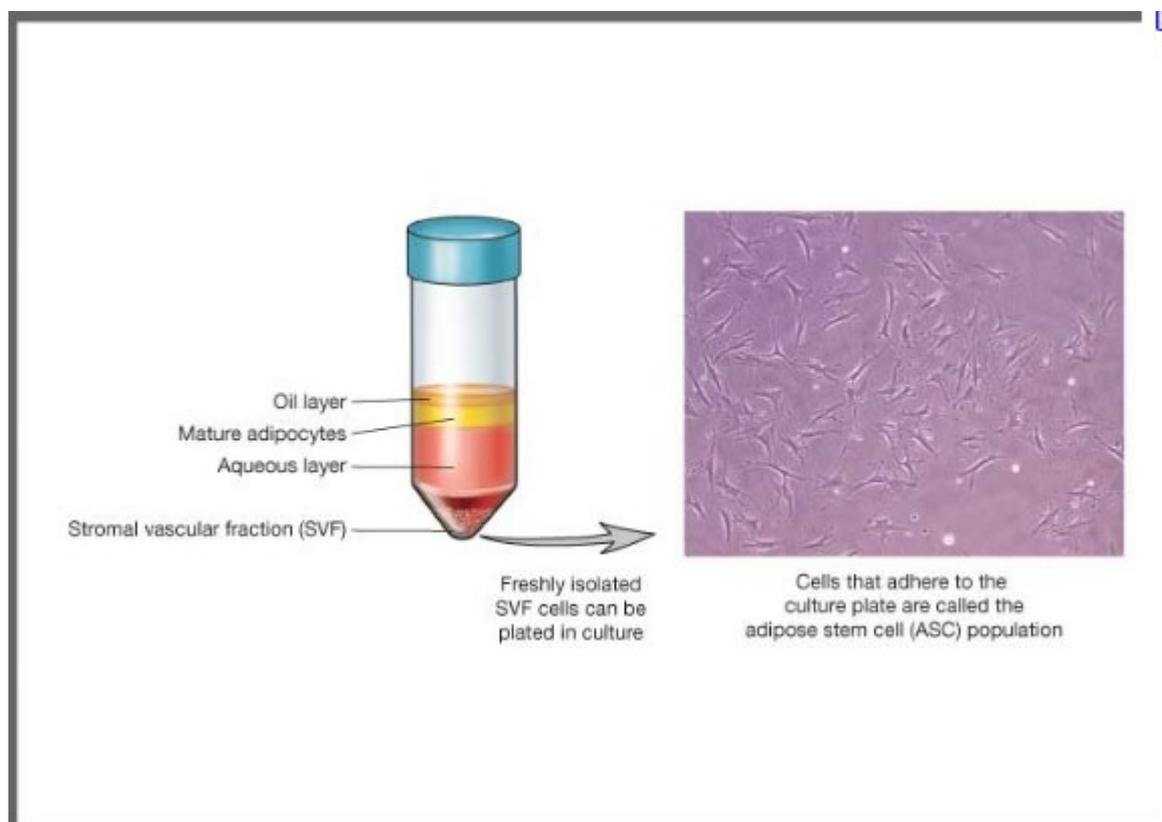
L'utilisation d'un kit Endofree® (exempt d'endotoxines) a été nécessaire afin de ne pas affecter négativement la culture des ASC transfectées avec des endotoxines bactériennes.



**Illustration 14:** Protocole d'extraction de plasmide à partir de culture bactérienne. (<http://www.qiagen.com>)

## I.2.8 Protocole de séparation des ASC.

Le tissu adipeux prélevé chirurgicalement en région sous-cutanée sur des porcs charcutiers a été dilacéré manuellement au scalpel dans une boîte de Pétri. Le tissu a ensuite été digéré dans une solution de collagénase de type II (Worthington – Biochemical Corporation) à une concentration de  $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  diluée dans du Hank's Buffered Salt Solution contenant les ions divalents  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  (GIBCO - Invitrogen Life Technologies) pendant 1 heure en agitation à  $37^{\circ}\text{C}$ . L'homogénat obtenu a été centrifugé à  $400g$  à  $+4^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes. Le surnageant contenant les adipocytes et les déchets fibreux a été aspiré et le culot cellulaire contenant la fraction stromale vasculaire ou SVF est resuspendu dans une solution de lyse hypotonique des globules rouges, composée de KCl. La suspension cellulaire a été filtrée sur un tamis cellulaire (BD Falcon) de maillage  $100\ \mu\text{m}$  puis centrifugée à  $400g$  à  $+4^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes. Le surnageant a été aspiré puis le culot cellulaire a été lavé par l'ajout d'une solution de Phosphate Buffered Saline (PBS). Après centrifugation selon le protocole précédent, les cellules ont été comptées sous un microscope optique à l'aide d'une cellule de Malassez.



**Illustration 15:** Séparation des ASC issue de la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux (Brayfield C et al, 2010).

## **I.2.9 Vérification du phénotype des ASCs.**

### **I.2.9.1** *Cytométrie en flux*

Entre les passages trois à huit (P3 à P8), les cellules ont été considérées comme les ASC et les cultures n'ont pas été prolongées afin d'éviter la survenue de la sénescence (perte du phénotype en forme de fuseau). Les ASC ont été caractérisées par cytométrie en flux (BD LSRII, BD Biosciences, Pont de Claix, France) après marquage par des anticorps monoclonaux spécifiques des antigènes CD90, CD44 conjugués à la phycoérythrine (PE) et CD31, CD45 (2A5 clone; BD Biosciences) conjugués avec l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC).

### **I.2.9.2** *Différenciation adipogénique.*

Toute la manipulation a été effectuée à température ambiante.

Les cellules ont été cultivées dans un 6-well Greiner Bio-One en emballage individuel (traité culture) jusqu'à confluence dans du milieu MEM- $\alpha$  à 10% SVF; l'ensemencement initial a été de 30000 cellules par puits.

Le milieu de différenciation utilisé a été le DMEM (Cambrex) additionné de 1 mM de dexaméthasone, 1 mM d'indométhacine (RBI), 10 $\mu$ g/mL d'insuline de porc et 10% de SVF. Ce dernier a été changé deux fois par semaine pendant trois semaines.

A chaque changement de milieu le milieu pro-différenciant a été alterné avec le milieu de maintien composé seulement de DMEM supplémenté avec 10 $\mu$ g/mL d'insuline de porc et 10% de SVF.

Par la suite, les puits ont été lavés une fois en PBS 1X. Puis les cellules ont été fixées pendant 15 minutes avec 1 mL de solution de formol à 10%. La solution précédente a été aspirée et les puits rincés à l'eau dé ionisée pendant 45 secondes. Les cellules ont été incubées avec 1 mL de solution à 0,18% Oil Red O (soit 18mg de poudre dans 10 mL d'une solution à 50% DMSO) pendant 5 minutes. La solution précédente a été retirée et les puits rincés à l'eau dé ionisée pendant 2 minutes.

Enfin, les cellules ont été incubées avec 1 mL de la solution Mayer's Hematoxylin pendant 10 minutes pour la contre coloration des noyaux. Les puits ont été rincés à l'eau du robinet pendant 2 minutes.

### **1.2.9.3** *Différenciation ostéogénique.*

Les cellules ont été cultivées dans un 6-well Greiner Bio-One en emballage individuel (traité culture) jusqu'à confluence dans du milieu MEM- $\alpha$  à 10% SVF; l'ensemencement initial a été de 30000 cellules par puits.

Le milieu de différenciation a été élaboré comme suit : Le milieu OBM (Cambrex) a été additionné de 100 nM de dexaméthasone, 10 mM de  $\beta$ -Glycérophosphate (Merck), 0,2 mM d'ascorbate et 10% de SVF. Le milieu a été changé deux fois par semaine pendant deux semaines.

Nous avons utilisé le kit Leukocyte Alkaline phosphatase kit 85L-3R (Sigma-Aldrich) pour révéler la différenciation.

Dans un premier temps la solution de citrate de travail a été préparée : Dans une flasque de 75cm<sup>2</sup> TPP, 2 mL de la solution de citrate concentrée (Citrate Concentrate solution) ont été dilués dans 100 mL d'eau déionisée.

Puis, la solution de fixation a été préparée : dans un tube en polypropylène 2 volumes de la solution de citrate de travail ont été dilués dans 3 volumes d'acétone. (par exemple 4 mL de Citrate et 6 mL d'Acétone).

La solution de sel de diazonium a été élaborée comme suit : dans un tube en polypropylène de 50 mL, une capsule de Fast Violet B a été dissoute dans 48 mL d'eau déionisée puis 2 mL de solution Naphthol AS-MX Phosphatase Alkaline ont été ajoutés. La solution a alors présenté une couleur jaune.

Les cellules ont été fixées pendant 30 secondes avec 1 mL de solution de fixation par puits. Par la suite, les cellules ont été incubées pendant 30 minutes avec la solution de sel de diazonium à l'abri de la lumière. Une dernière incubation des cellules a été effectuée avec 1 mL de la solution Mayer's Hematoxylin pendant 10 minutes pour la contre coloration des noyaux.

Les puits ont finalement été rincés à l'eau du robinet pendant 2 minutes.

### **1.2.9.4** *Différenciation chondrogénique.*

Pour l'étude de la différenciation chondrogénique les cellules ont été cultivés comme précédemment (Cf : I.1.1) puis ont été cultivées deux semaines avec le milieu spécifique CDM (*Chondrogenic Differentiation Medium*, Lonza, Bâle).

La révélation a été effectuée en fixant les cellules avec une solution de formalin à 10% suivie d'une incubation avec une solution de Safranine O diluée dans du DMSO.

### **I.2.10 Transfection des ASC.**

Les ASC sont récupérées par le protocole décrit dans la section culture. Après leur décompte la suspension cellulaire est répartie dans des tubes Eppendorf® coniques de 1,5 mL à raison de 10 millions de cellules par tube. Les tubes sont centrifugés à 200 g pendant 10 minutes à température ambiante.

Le surnageant est aspiré et le culot cellulaire est traité avec le kit *Human MSC (Mesenchymal Stem cell) Nucleofector*® (AMAXA Biosystems, Lonza - Bâle) suivant le protocole du fournisseur.

Le culot est resuspendu dans 100 µL de *Human MSC Nucleofector Solution* puis transféré dans la cuvette d'électroporation. Cinq µg de plasmide pIRES2-eGFP-SHH sont ajoutés à la solution, la manipulation ne devant pas prendre plus de 15 minutes à partir de la resuspension dans les 100 µL de solution.

Les cuvettes sont successivement introduites dans le NUCLEOFECTOR II™ (AMAXA Biosystems, Lonza - Bâle) et traitées avec le programme U-23 (haute efficacité).

Après l'électroporation, le contenu de chaque cuvette est réparti dans deux flasques de culture de 150 cm<sup>2</sup> contenant 25 mL de milieu de culture à 37°C. Les flasques sont placées dans un incubateur à atmosphère humide à 37°C et 4,5% de CO<sub>2</sub>.

Le protocole détaillé est disponible sur le site du fournisseur à l'adresse [https://www.lonzabio.com/fileadmin/groups/marketing/Downloads/Protocols/Generated/Optimized\\_Protocol\\_90.pdf](https://www.lonzabio.com/fileadmin/groups/marketing/Downloads/Protocols/Generated/Optimized_Protocol_90.pdf).

### **I.2.11 Efficacité de transfection et vérification de l'expression du plasmide.**

La détection des cellules transfectées se fait par l'intermédiaire de la détection de l'expression du gène rapporteur de la GFP.

### ***1.2.11.1 Cytométrie en flux.***

Les cellules ont été récoltées et comptées comme décrit précédemment. Après centrifugation 10 minutes à 400 g et 4°C, 50.000 ASC sont reprises dans 300µL de PBS. Le tube est brièvement vortexé. L'analyse des cellules a été effectuée dans un cytomètre de flux BD™ LSR II (BD Biosciences, San José – Californie). Les réglages du Forward Scatter et du Side Scatter sont de 300 Volts et 450 Volts respectivement. La GFP est détectée dans le canal du FITC.

L'acquisition des données a été effectuée avec le logiciel BD FACS Diva 6.0 (BD Biosciences, San José – Californie). La mesure de l'efficacité de transfection découle de l'analyse des cytogrammes réalisée à l'aide du logiciel FlowJo (Tree Star, inc – Oregon).

### ***1.2.11.2 Microscopie à épifluorescence.***

Les flasques de culture sont observées et photographiées sur un microscope à épifluorescence (Olympus, Shinjuku, Japon).

### ***1.2.11.3 Western Blot.***

La capacité de sécrétion des cellules greffées a été contrôlée *in vitro* en utilisant la technique de Western blot à partir de lysat et de milieu conditionné d'ASC en culture. Les protéines issues des cellules transfectées ou non transfectées ont été séparées sur un gel à gradient de Tris-glycine (4- 20%) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), puis transférées sur une membrane PVDF (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Les membranes ont été marquées avec un anticorps de chèvre polyclonal SHH anti-Shh humain dilué au 1/1000 (SantaCruz biotechnologie, Heidelberg, Allemagne) dans du TBS-Tween et lait à 5%, suivi de l'incubation d'un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase, dilué au 1/5000 (SantaCruz biotechnologie, Heidelberg, Allemagne). La révélation a été effectuée avec le westfemto SuperSignal ECL (Pierce, Rockford, IL, USA). L'intensité de la bande a été déterminée par densitométrie (Genegnome, Syngene, Cambridge, Royaume-Uni).

## **I.3 Contrôles de l'activité biologique de l'outil de thérapie génique ASC-Shh *in vitro* et *in vivo*.**

### **I.3.1 Action des ASC transfectées sur des CSH irradiées à 2,5Gy**

#### ***I.3.1.1 Cocultures.***

Différents lots de cellules CD34<sup>+</sup> humaines (Poïetics<sup>®</sup>, Lonza, Levallois-Perret, France) ont été irradiées *in vitro* (2,5 Gy gamma, source <sup>137</sup>Cs, 1,5 Gy / mn), puis rapidement mis en culture sur des monocouches confluentes d'ASC ou d'ASC transfectées avec le plasmide codant Shh (ASC-Shh). Cette dose homogène induit la mort cellulaire de 95% des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques et imite le préjudice subi par les zones sous-exposées de la moelle osseuse après une ICT unilatérale dans la fourchette de dose allant de 8 à 10 Gy (Drouet al, 2005). Les cultures ont été effectuées en utilisant le milieu StemSpan<sup>™</sup> H3000 (StemCell Technologies, Meylan, France) auquel a été ajoutée la combinaison de référence du Stem Cell Factor + FLT-3 ligand + thrombopoïétine + interleukine-3 (SFT3; 50 ng/mL).

Dix jours après irradiation, les cellules ont été récoltées; le traitement à la trypsine a permis de décrocher des grappes CD34<sup>+</sup> adhérentes à la monocouche d'ASC. Toutes les cellules récupérées ont par la suite été cultivées pendant un heure dans le milieu spécifique des ASC afin d'exclure les cellules non hématopoïétiques adhérentes au plastique de culture.

#### ***I.3.1.2 Cytométrie en flux.***

Pour l'analyse par cytométrie en flux, les cellules ont été marquées avec des anticorps anti-CD34 (anticorps monoclonal conjugué PE, BD Biosciences, Pont de Claix, France clone 563), anti-CD90 (anticorps monoclonal conjugué allophycocyanine, BD Biosciences, Pont de Claix, France, clone DO58-1283), anti-CD45 (anticorps monoclonal conjugué APC, BD Biosciences, Pont de Claix, France, 5E10 clone), anti-CD41 (anticorps monoclonal conjugué FITC, BD Biosciences, Pont de Claix, France, clone L138) et CD13 (anticorps monoclonal conjugué phycoérythrine cyanine 7, Beckman Coulter, Marseille, France, P2 clone).

L'analyse des données a été réalisée en utilisant le logiciel FlowJo (Threestar, Ashland, Oregon).

### **I.3.2 Quantification de l'hémoglobine dans des explants de Matrigel™ implantés à des souris NOD-SCID.**

#### ***I.3.2.1 Animaux.***

Les souris NOD-SCID  $\beta 2^{-/-}$  ont été acquises auprès du Dr F. Blanquet (plateau de haute technologie animale, Institut Jean-Roget, Université Joseph Fourier, Grenoble).

20 souris ont été utilisées. La manipulation a été effectuée sous PSM en anesthésie gazeuse (isoflurane).

#### ***I.3.2.2 Composition des implants.***

Quatre types d'implants (400 $\mu$ L de matrice par implant) ont été réalisés:

Cinq implants avec du Matrigel™ (BD Biosciences, USA) « classique » permettant une vascularisation importante à lui seul dans lequel ont été injectés 2 millions d'ASC de porc charcutier non transfectées.

Cinq implants avec du Matrigel™ « classique » permettant une vascularisation importante à lui seul dans lequel ont été injectés 2 millions d'ASC de porc charcutier transfectées avec le plasmide codant pour Shh.

Cinq implants avec du Matrigel™ «growth factor reduced» ne permettant pas une vascularisation importante à lui seul dans lequel ont été injectés 2 millions d'ASC de porc charcutier non transfectées.

Cinq implants avec du Matrigel™ «growth factor reduced» ne permettant pas une vascularisation importante à lui seul dans lequel ont été injectés 2 millions d'ASC de porc charcutier transfectées avec le plasmide codant Shh.

Le volume de matrice injecté est de 400  $\mu$ L.

#### ***I.3.2.3 Traitement des implants.***

Une semaine post-implantation, le Matrigel™ a été récupéré dans 1 mL de solution de Drabkin (20 mg de potassium ferricyanide, 5 mg de potassium cyanide, et 100 mg de bicarbonate de sodium dans 100 mL d'eau). Les implants ont été ensuite homogénéisés au potter mécanique. La solution obtenue a été centrifugée à 10000 g pendant 20 minutes et le surnageant a été repris dans

un tube neuf pour l'analyse spectrophotométrique.

#### **1.3.2.4** *Spectrophotométrie.*

Les échantillons ont été analysés sur un lecteur de plaques BioTek EL808. Préalablement à la mesure, une gamme a dû être réalisée à partir d'un échantillon dont la quantité d'hémoglobine est connue (réactifs HITACHI- ABX). La lecture de la DO de l'hémoglobine a été effectuée à 540 nm.

### **1.3.3 Vérification de la capacité de homing des ASCs par greffe de cellules infectées avec un lentivirus codant un gène rapporteur.**

#### **1.3.3.1** *Prétraitement des animaux*

Afin de permettre une prise de greffe efficace, les macaques ont dû subir un prétraitement myéloablatif. Pour cela, les singes ont reçu une chimiothérapie au cyclophosphamide (ENDOXAN®).

#### **1.3.3.2** *Infection virale.*

Pour le suivi *in vivo* de cellules, nous avons utilisé une stratégie d'infection lentivirale. Les ASC ont été infectées en utilisant un vecteur lentiviral pgk-GFP : rHIV-PPT-PGK-GFP-WPRE [VSVG] fournis par Génethon (France). L'infection a été réalisée dans un laboratoire L2. Cinq µL de virus pour  $1 \times 10^6$  ASC ont été utilisés dans cette expérimentation. Les cellules ont étéensemencées dans des flasques de culture de 150 cm<sup>2</sup> (Techno Plastic Products, Trasadingen, Suisse) puis cultivées jusqu'à confluence dans du milieu MEMα (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Nouveau-Mexique) complété avec 10% de sérum de veau fœtal (partie HyClone de Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) à 37 ° C dans l'air avec 5% de CO<sub>2</sub>.

Les 24 premières heures de culture ont été effectuées dans le laboratoire L2. Ce délai correspond au temps d'absorption du virus par les cellules.

#### **1.3.3.3** *Suivi ex vivo.*

La moelle du macaque traité au cyclophosphamide a été prélevée au niveau de l'humérus et de la crête iliaque postérieure trois jours et quinze jours après la greffe intra-osseuse des ASC infectées. La moelle totale a été mise en culture dans les conditions décrites précédemment pour les

---

ASC et les CSM. Huit jours après la mise en culture, les colonies fluorescentes ont été dénombrées au microscope à épifluorescence (Olympus, Shinjuku, Japan)

## **I.4 Utilisation des ASC transfectées pour l'amélioration de la reconstitution hématopoïétique post-ICT.**

### **I.4.1 Modèle de primate non humain.**

Le modèle animal utilisé dans cette expérimentation a été le macaque rhésus et cynomolgus (*Macaca mulatta* et *Macaca fascicularis*). La taille inférieure de cet animal par rapport à l'Homme a permis une facilitation du développement d'un greffon de taille clinique.

Les macaques mâles adultes (*Macaca fascicularis* et *mulatta*, **illustrations 16 et 17**) pesant  $7,8 + 0,4$  kg (n=13) utilisés dans nos expériences proviennent de l'animalerie accréditée de l'IRBA-CRSSA. Les animaux ont été stabulés dans des cages individuelles dans des pièces en dépression à 23°C et 60% d'humidité relative. Les primates ont été nourris *ad libitum* sauf le matin précédant leur anesthésie. Les expériences et les soins ont été approuvés par le comité d'éthique pour l'expérimentation animale du CRSSA en accord avec les lois et réglementations européennes. Les différents types de prélèvements ont été effectués sous anesthésie générale à la kétamine (Imalgene, Merial, Lyon, France; 10 mg/kg intramusculaire). Les singes traités ont tous été des macaques rhésus. Les animaux contrôles ont présenté une forte létalité à cette dose (2 sur 3) ce qui nous a amenés à intégrer des macaques cynomolgus pour compléter cette branche expérimentale et pouvoir réaliser une analyse statistique tout en respectant les contraintes éthiques.

Pour l'étude des clonogènes, la moelle osseuse des animaux a été prélevée avant irradiation, 1 jour après, 42 jours après et  $\geq 180$  jours après. A chaque date le prélèvement a été effectué sur deux sites, la tête humérale et la crête iliaque postérieure. Pour les singes traités avec un greffon de cellules manipulées un prélèvement supplémentaire a été effectué à J42 et J180 au niveau de la tête humérale non greffée.



**Illustration 16:** *Macaque rhésus. (Macaca mulatta)*



**Illustration 17:** *Macaque cynomolgus. (Macaca fascicularis)*

#### **I.4.2 Greffe des ASC-Shh.**

Les singes (n = 11) ont été placés dans une chaise de contention et ont subi une ICT par irradiation unilatérale avec une source de rayons gamma du  $^{60}\text{Co}$  à une dose médiane de 8 Gy (mesurée dans l'air au niveau de la crête iliaque antérieure) et un débit de dose de 10 cGy / minute. La dosimétrie a été réalisée à l'aide d'une chambre d'ionisation de  $0,3 \text{ cm}^3$  et de dosimètres thermoluminescents à alumine. Pour l'étude thérapeutique, Les ASC ont été injectées dans un humérus seul deux jours après l'irradiation tandis que les contrôles irradiés n'ont reçu que du PBS.

Les singes ont reçu des quantités de cellules manipulées de  $3 \pm 0,38 \times 10^6$  ASC-shh / kg (fourchette de 2,05 à 3,74).

Singes	Nombre de cellules transfectées	Cellules greffées après transfection et 4 jours de culture	
		ASC	ASC dont : ASC-Shh
1065	7,14	8,1	3,74
14295	7	4,9	3,45
62429	5,5	2,84	2,7
14166	5,2	5,8	2,05
Moyennes $\pm$ EType		5,41 $\pm$ 2,18	2,99 $\pm$ 0,76

**Tableau 7:** *Récapitulatif des greffes.*

Le groupe contrôle recevant des ASC transfectées par un plasmide ne codant aucune protéine active est actuellement en cours d'évaluation.

### **I.4.3 Suivi des taux sanguins des différents éléments figurés.**

La numération-formule (CBC) a été effectuée sur un analyseur Pentra 120 (ABX, Montpellier, France) et en utilisant une coloration May-Grunwald (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) sur des lames de verre. Les durées de neutropénie, thrombocytopénie, lymphopénie et d'anémie ont été définies respectivement lorsque l'ANC (Absolute Neutrophil Count), le nombre de plaquettes, la numération des lymphocytes et la quantité d'hémoglobine ont été  $0,5 \times 10^9 / L$ ,  $20 \times 10^9 / L$ ,  $1 \times 10^9 / L$ , et moins de  $10g / L$ . À court et moyen termes la reconstitution a été estimée à partir de l'aire sous la courbe (AUC) des numérations du jour 0 au jour 30 ainsi que 90 post ICT.

### **I.4.4 Analyse des CFU-hématopoïétiques.**

La moelle osseuse a été aspirée au niveau de la crête iliaque postérieure et de l'humérus avant ICT (taux de base [BL]) puis le 42<sup>e</sup> jour et les jours au-delà de 180 post ICT. Les cellules de faible densité ( $1,070g/cm^3$ ) ont été séparées par la technique Ficoll et mises en culture pour l'analyse des CFU. Ces cellules ont été cultivées dans un milieu contenant de la méthylcellulose (MethoCult H4435 pour les CFU-GM, BFU-E, et CFU-GEMM) ou sur un « coating » à base de collagène pour les CFU-MK (CFU-MK; MegaCult-C, StemCell Technologies, Meylan, France).

Après 14 jours de culture, les colonies ont été dénombrées et le nombre absolu de chaque type de CFU pour  $1 \times 10^5$  cellules mononucléées a été déterminé.

### **I.4.5 Suivi clinique des animaux.**

Il a été établi précédemment dans ce modèle que la greffe de CSM non manipulées n'avait pas d'effet thérapeutique sur la restauration hématopoïétique.

Pour des raisons éthiques, tous les animaux ont donc été transfusés avec du sang frais entier irradié à une dose de 20 Gy ( $^{137}Cs$  source) lorsque la numération plaquettaire était de moins de  $20 \times 10^9 / L$  ou l'hématocrite inférieur à 20% en présence de symptômes cliniques (pétéchies, épistaxis). De l'ampicilline ( $50 \text{ mg} / \text{kg} / \text{jour}$ ) et de la gentamycine ( $1,5 \text{ mg} / \text{kg} / \text{jour}$ ) ont été administrés au cours de la neutropénie (polynucléaires neutrophiles [ANC]  $< 0,5 \times 10^9 / L$ ) et la céfalexine ( $1 \text{ mg} / \text{kg} / \text{jour}$  pendant 3 jours) pendant des périodes fébriles prolongées, supérieures à  $39^\circ C$ .

## I.5 Analyses statistiques.

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type. Pour les études *in vivo* et *in vitro* le test non paramétrique U de Mann et Whitney a été utilisé.

Pour le dosage de l'hémoglobine dans les implants de Matrigel <sup>TM</sup> nous avons utilisé le test non paramétrique de Wilcoxon, les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM.

## II. Résultats et discussion.

### II.1 Évolution de la niche irradiée *in vitro*

#### II.1.1 Études de radiosensibilité.

##### II.1.1.1 *Cellules endothéliales.*

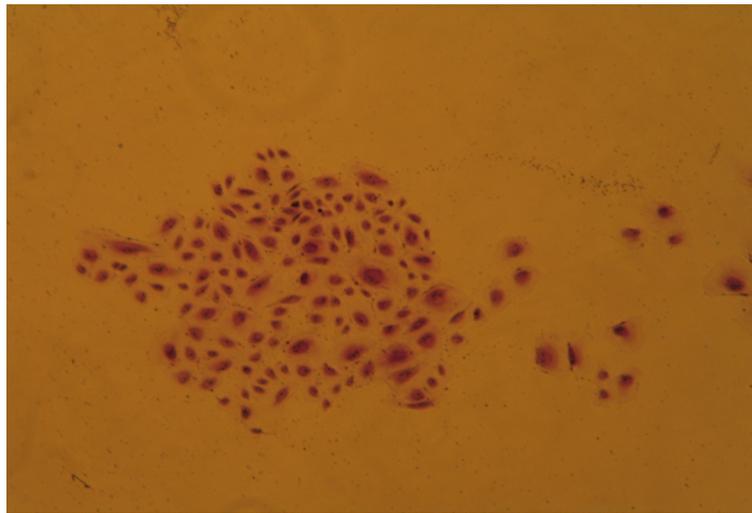
L'analyse des CFU-endothéliales révèle une courbe de radiosensibilité non linéaire en fonction de la dose de radiations reçue. De plus la radiosensibilité de ces cellules varie en fonction des conditions d'hypoxie. Afin de comparer les courbes entre elles nous avons mesuré la  $D_0$  de chaque groupe. Cette valeur est une constante qui définit les pentes des courbes de survie et qui correspond à la dose létale à 63% (aussi appelée D-37 où dose de survie à 37%).

La  $D_0$  observée pour les cellules cultivées à 20%  $O_2$  est de 1,98 Gy, celle des cellules cultivées à 5%  $O_2$  est de 0,93 Gy et celle des cellules cultivées à 1%  $O_2$  est de 0,73 Gy. La diminution de la concentration en oxygène dans le milieu augmente donc la radiosensibilité des HPP-ECFC en culture.

La radiosensibilité des cellules endothéliales est donc supérieure dans les conditions d'hypoxie sévère par rapport à la normoxie. Ce résultat implique que les cellules endothéliales présentes au niveau de la niche vasculaire, une zone de l'organisme relativement hypoxique avec environ 8% d' $O_2$ , sont les cellules du micro-environnement hématopoïétique les plus susceptibles

d'être touchées par l'irradiation qui induit une dégradation rapide de la vascularisation et donc de l'apport en oxygène vers les tissus (Daldrup HE et al, 1999).

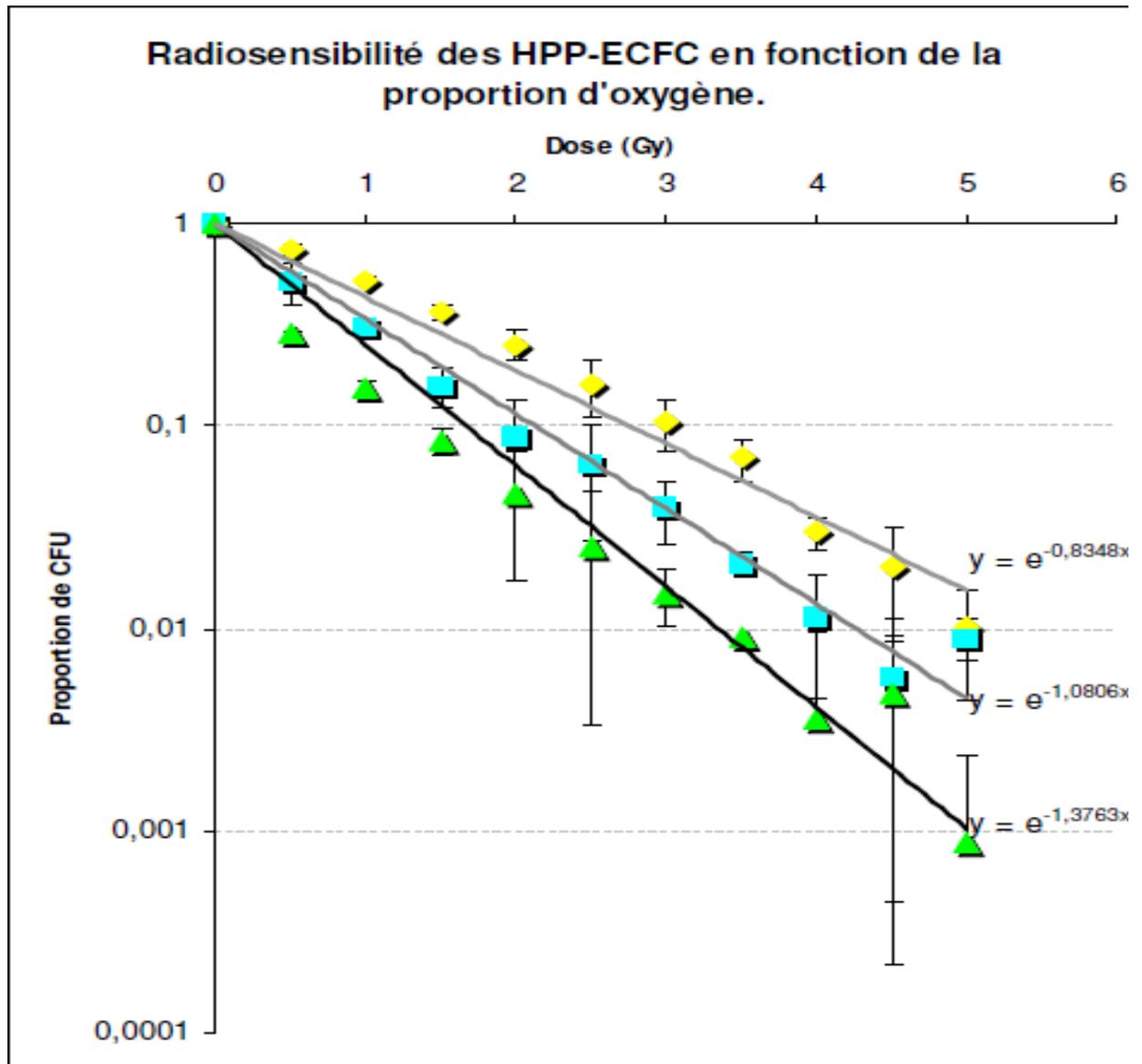
Les cellules endothéliales sont essentielles pour la revascularisation de la niche après un dommage, pour organiser une reconstitution de l'hématopoïèse d'un individu irradié. L'utilisation d'une stratégie de thérapie cellulaire visant à stimuler la revascularisation dans les zones lésées est donc ici justifiée.



**Illustration 18:** *CFU-endothéliale observée au microscope optique inversé (x40). Marquage au cristal violet.*

Les progéniteurs endothéliaux sont donc sévèrement affectés lors d'une ICT et sont cependant indispensables à une régénération efficace de l'hématopoïèse. En effet, il a été démontré récemment que la greffe de ces cellules permet une régénération plus rapide de l'hématopoïèse *in vivo*. Cet effet serait dû à plusieurs facteurs liés à la repopulation cellulaire de la niche vasculaire.

Le premier est la revascularisation du tissu permettant l'apport des nutriments et de l'oxygène nécessaire aux fonctions cellulaires (Salter AB et al, 2009), mais les EPC sont également nécessaires car elles activent la voie de signalisation du VEGFR2 (Hooper AT et al, 2009). Cette voie est très importante dans la reconstitution autologue de l'hématopoïèse ainsi que dans la capacité de prise de greffe des CSH dans le cas d'une greffe allogénique thérapeutique.



**Illustration 19:** Courbes de radiosensibilité des HPP-ECFC en fonction de la concentration en oxygène lors de la culture. En jaune 20% O<sub>2</sub>, bleu 5% et vert 1% (n=3).

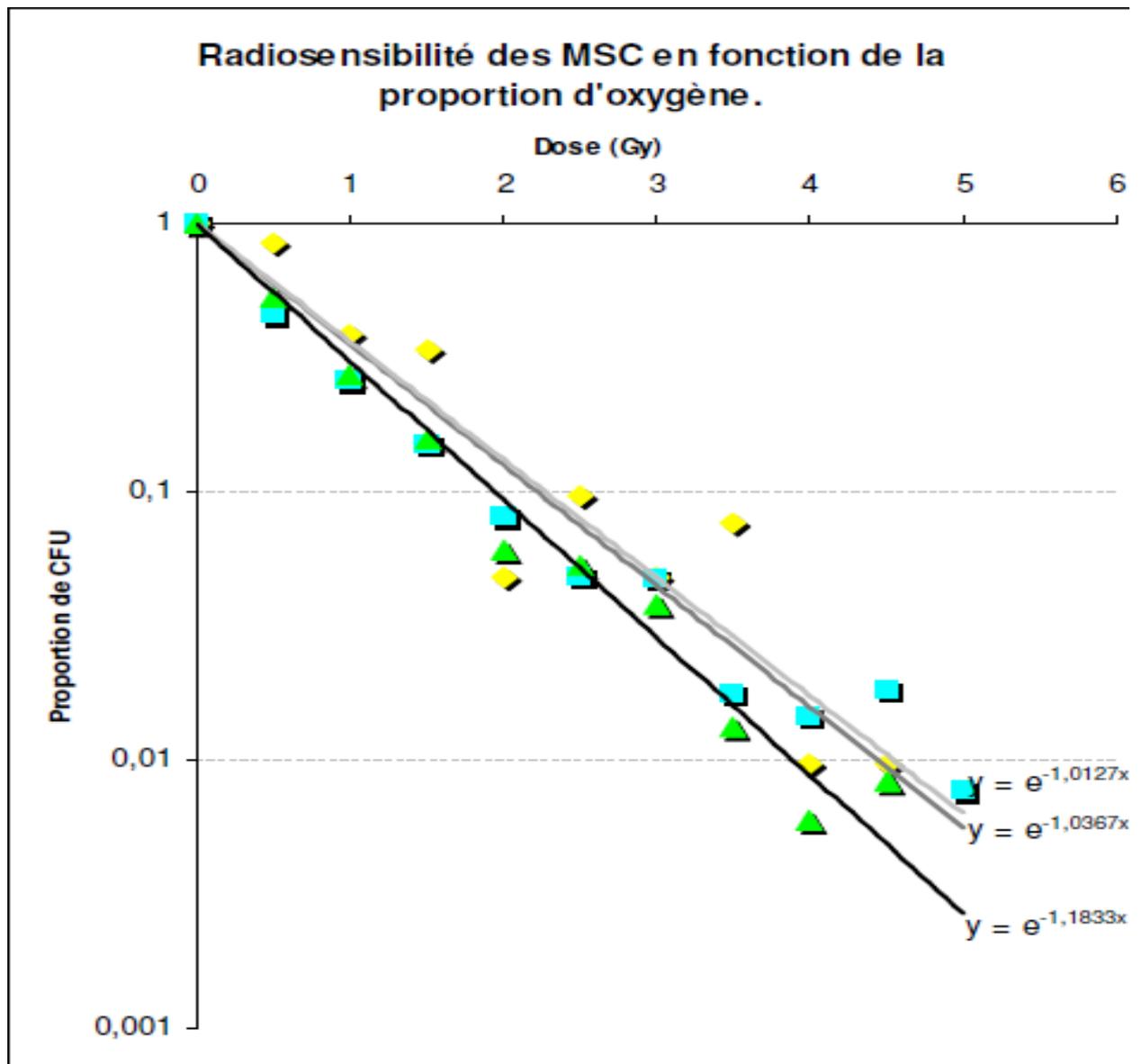
### II.1.1.2 CSM.

L'analyse des CFU-F révèle une courbe de radiosensibilité non linéaire en fonction de la dose de radiations reçue. De plus, la radiosensibilité de ces cellules varie en fonction des conditions d'hypoxie.

En effet, la D<sub>0</sub> observée pour les cellules cultivées à 20% O<sub>2</sub> est de 0,99 Gy, celle des cellules cultivées à 5% O<sub>2</sub> est de 0,96 Gy et celle des cellules cultivées à 1% O<sub>2</sub> est de 0,73 Gy .

La radiosensibilité de ces cellules est augmentée lorsque la concentration en oxygène dans le

milieu diminue. Ces résultats sont similaires à ceux observés pour les HPP-ECFC.



**Illustration 20:** Courbes de radiosensibilité des CSM en fonction de la concentration en oxygène lors de la culture. En jaune 20% O<sub>2</sub>, bleu 5% et vert 1% (n=4).

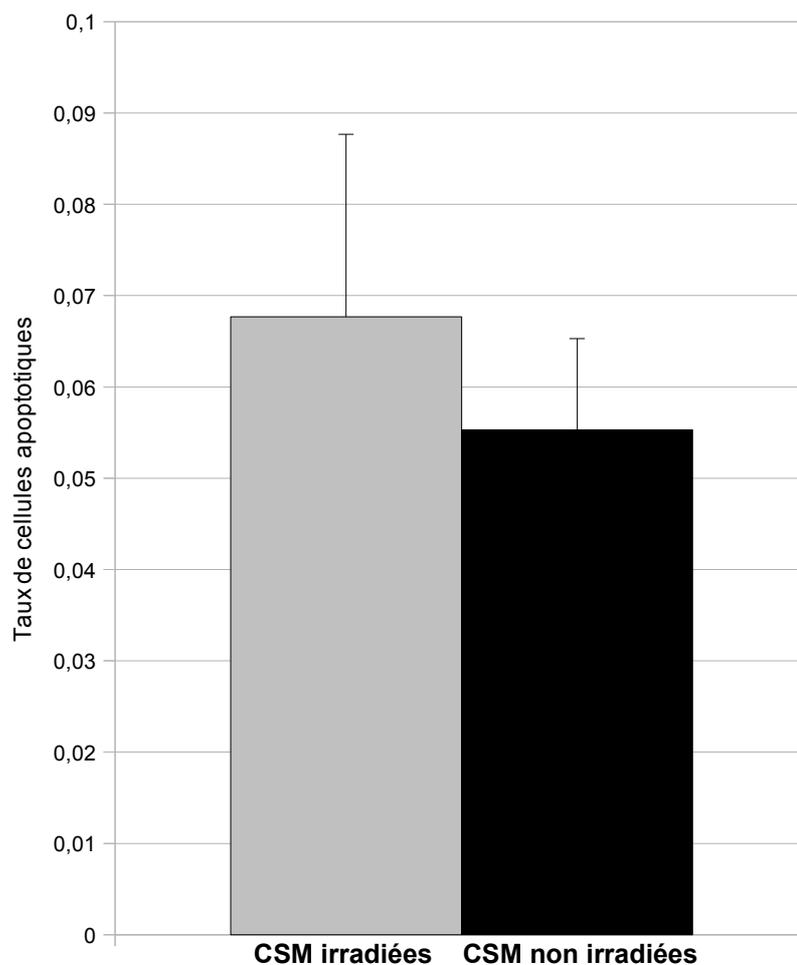
Les CSM de la niche endostéale devraient dans ces conditions être plus radiosensibles que ce qui avait été observé précédemment. En effet, la D<sub>0</sub> des CFU-F issues de la moelle osseuse a précédemment été évaluée à 1,3 Gray (Laver J et al, 1986). Dans notre étude, la valeur inférieure évaluée à 0,99 Gy dans la condition 20% d'oxygène peut s'expliquer par le fait que nous avons utilisé des cellules issues de passages de culture plus tardifs que ceux de l'équipe de Laver *et al.* et dont l'activité proliférative et donc la radiosensibilité pourraient être de ce fait différentes.

Il a également été démontré *in vitro* que l'irradiation des cellules stromales n'entraîne pas de perte de leur capacité de soutien de l'hématopoïèse, notamment au niveau de la formation des CFU-GM (Laver J et al, 1986). Bien que les CSM en condition d'hypoxie apparaissent ici plus radiosensibles que dans des conditions d'oxygénation standard cette donnée n'influencerait donc pas la restauration hématopoïétique.

## II.1.2 Évaluation de la mort cellulaire.

### II.1.2.1 *Évaluation de l'apoptose.*

L'apoptose des CSM et des CSH a été évaluée post-irradiation gamma à une dose de 2,5 Gy par cytométrie en flux.



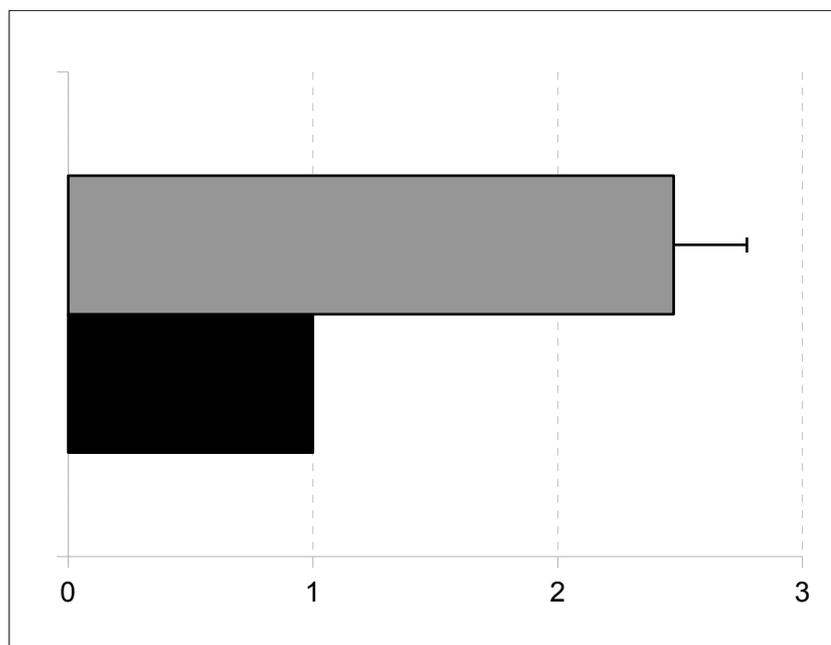
**Illustration 21:** Taux de CSM apoptotiques en fonction de l'irradiation. Marquage FLICA révélé en cytométrie en flux.

Le taux de cellules apoptotiques observé une 24 heures après irradiation n'est pas significativement différent entre les cellules irradiées et les cellules contrôles. Ce taux est de  $6,77 \pm 2\%$  pour le groupe irradié contre  $5,53 \pm 1\%$  pour le groupe contrôle ( $n=4$ ).

Ce résultat met en évidence que les CSM ne subissent pas une mort cellulaire massive par apoptose après irradiation contrairement aux CSH (Drouet M et al, 1999); (Mourcin F et al, 2005).

### II.1.2.2 *Évaluation de la sénescence.*

La sénescence des CSM a été évaluée par détection de l'activité SA- $\beta$ -Galactosidase dans des cultures de CSM, 48 heures après irradiation gamma à 2,5 Gy. L'expérience révèle une proportion de cellules sénescents ( $n=4$ )  $2,5 \pm 0,3$  fois supérieure pour les cultures irradiées par rapport aux cultures non irradiées. Le phénomène de sénescence est donc une voie de mort cellulaire privilégiée pour ces cellules lors d'une irradiation.



**Illustration 22:** Proportion de cellules sénescents dans des cultures de CSM irradiées à 2,5 Gy (en gris) par rapport aux cellules non irradiées ( $n=4$  pour les deux groupes,  $p<0,01$ ).

### II.1.2.3 *Cycle cellulaire.*

Le cycle cellulaire des CSM a également été évalué post irradiation par une technique de

cytométrie en flux. Lors de cette expérience, nous avons comparé la proportion cellulaire pour les différentes phases du cycle en fonction de l'irradiation.

	<b>CSM non irradiées</b>	<b>CSM irradiées</b>
<b>G0/G1</b>	53,00%	77,10%
<b>S</b>	39,00%	13,10%
<b>G2</b>	7,93%	7,75%

**Tableau 8:** Pourcentages de CSM présentes dans chaque phase du cycle cellulaire en fonction de l'irradiation. Etude réalisée en cytométrie en flux par marquage à l'iodure de propidium.

L'étude du cycle cellulaire démontre une accumulation des CSM en phase G0/G1 post irradiation. Ce blocage du cycle est compatible avec l'augmentation du phénomène de sénescence non réplivative observé plus haut et tend à confirmer que, lors d'une ICT, les cellules de soutien ne disparaissent pas immédiatement via la mort cellulaire par apoptose mais persistent plus longtemps dans l'organisme irradié.

Il apparaît au vu des résultats précédents que, lors d'une irradiation gamma, les précurseurs des cellules de soutien de la niche hématopoïétique subissent une réduction de leur activité proliférative, d'une part par l'activation du processus de sénescence non réplivative et, dans une moindre mesure par leur mort par apoptose. Ces résultats *in vitro* nous ont permis d'émettre l'hypothèse que la capacité de soutien de la niche *in vivo* était altérée par ces phénomènes. Cependant, ces résultats sont-ils extrapolables *in vivo*?

Récemment, l'équipe de Jie Ma et al. (Jie Ma et al, 2007) a mis en évidence dans un modèle murin que bien que la capacité clonogénique en termes de CFU-F diminue fortement après une ICT, aucune augmentation dans le processus de sénescence cellulaire ou de blocage du cycle n'a pu être observée. La diminution de la capacité de soutien de l'hématopoïèse des cellules stromales serait donc due d'une part à la mort de ces cellules mais aussi à la diminution de leur capacité de différenciation, notamment en ostéoblastes.

Toujours dans un modèle murin, il a été démontré que la déplétion des ostéoblastes entraîne une diminution de la cellularité globale de la niche, cette diminution comprenant les CSH elles-mêmes (Visnjic D et al, 2004).

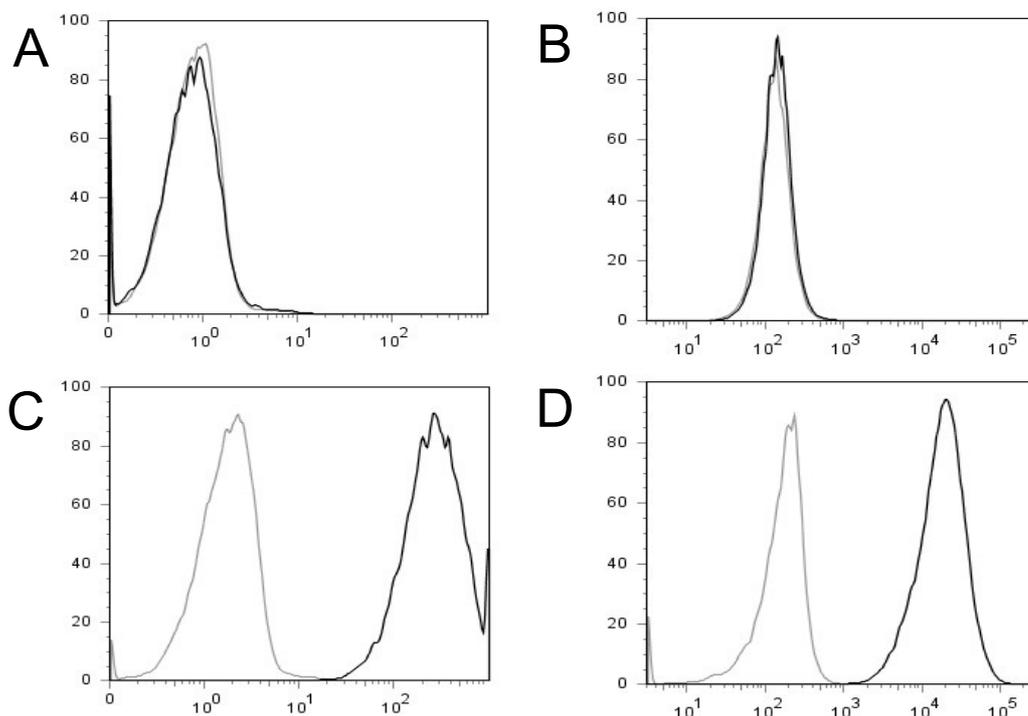
## II.2 Élaboration de l'outil de thérapie génique

### II.2.1 Morphologie et marqueurs de surface.

#### II.2.1.1 *Cytométrie.*

Les ASC en culture possèdent la morphologie caractéristique des fibroblastes en fuseau, la perte de ce phénotype au-delà du huitième passage est le signe d'une dégénérescence cellulaire et du phénomène de sénescence.

L'étude par cytométrie en flux nous a permis de confirmer le phénotype antigénique des cellules issues de la fraction stromale vasculaire. Ces cellules arborent des marqueurs de surface très proches de ceux des cellules souches mésenchymateuses. En effet, ces cellules sont positives pour le CD90 et le CD44, faiblement positives pour le CD34 (données non présentées) et négatives pour le CD45 et CD31.



**Illustration 23:** *Phénotypage des ASC par cytométrie en flux. Les courbes épaisses correspondent à l'anticorps spécifique et les courbes fines au contrôle isotypique. A. Marquage CD45. B. Marquage CD31. C. Marquage CD90. D. Marquage CD44*

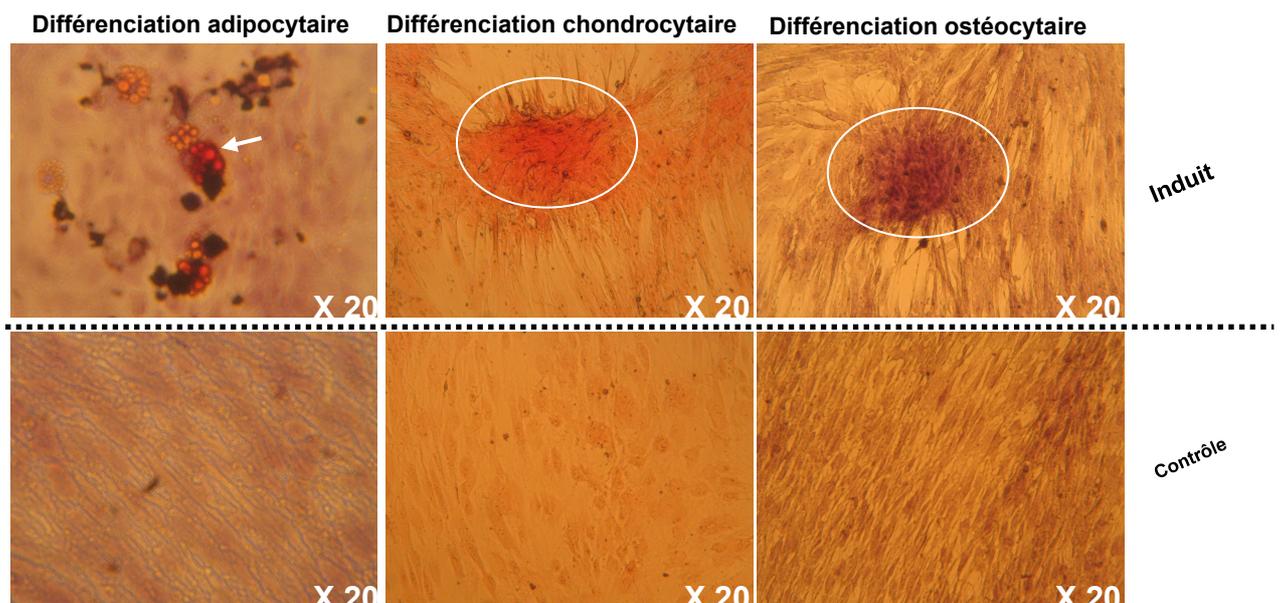
Le phénotype observé pour les ASC est très proche de celui classiquement observé chez les CSM hormis la faible expression du CD34 dans les passages les plus précoces de la culture. Ceci est cohérent avec les données publiées par Kaiser S *et al* (Kaiser S et al, 2007). De plus, il correspond également au phénotype classiquement décrit pour les ASC issues de la fraction stromale vasculaire.

Dans cette expérience les marqueurs CD73 et CD105 les plus représentatifs de cellules mésenchymateuses n'ont pas été décrits du fait de l'absence d'anticorps dirigés ou ayant une réaction croisée contre ces antigènes dans l'espèce étudiée, *Sus scrofa*.

### II.2.1.2 Étude de la différenciation.

Les ASC provenant de la SVF possèdent des capacités de différenciation similaires à celles des CSM. Nous avons pu démontrer que ces cellules étaient capables de se différencier notamment en ostéoblastes, adipocytes qui sont des éléments cellulaires majeurs présents dans la niche endostéale.

## Différenciation des ASC de porc.



**Illustration 24:** Révélation immunocytochimiques de la différenciation des ASC.

### II.2.2 Transfection et culture.

La transfection des ASC a été effectuée à l'aide du système AMAXA™. Cette technique d'électroporation permet de faire migrer le vecteur nucléique dans le noyau des cellules. L'avantage de cette technique est de maintenir l'expression de notre protéine d'intérêt sur quelques générations afin d'amplifier le nombre de cellules efficaces pour obtenir un greffon de taille clinique.

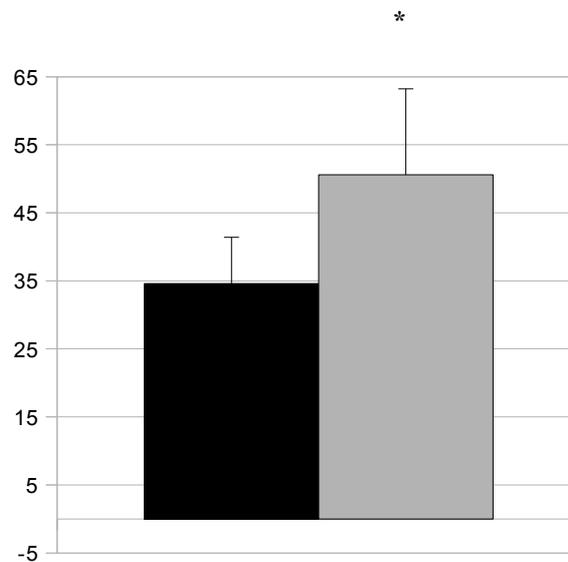
Le taux de transfection moyen observé 24 heures après manipulation est de  $34,61 \pm 6,79\%$ . Après 5 jours de culture, soit à la date où le greffon doit être injecté, le taux de cellules positives pour le gène rapporteur de la GFP est de  $50,59 \pm 12,64\%$ .

Ce résultat nous permet de dégager deux conclusions.

D'une part, les cellules transfectées prolifèrent préférentiellement par rapport à celles qui n'ont pas intégré le plasmide. Cela s'explique soit par une activation de leur activité mitotique soit par une diminution des phénomènes de mort cellulaire.

D'autre part, le gène codé par le plasmide peut continuer à être exprimé dans les cellules-filles après plusieurs divisions.

La technique de transfection utilisée nous permet donc de traiter un grand volume de cellules de départ -en effet les cellules sont transfectées par lots de 10 millions mais aussi d'enrichir la culture en cellules d'intérêt.



**Illustration 25:** Taux de transfection (en %) moyen des ASC observé à J1 après transfection (en noir) et J5 après transfection (en gris). ( $n=3$ , \* =  $p < 0,05$ )

### II.2.3 Activité sécrétoire des cellules transfectées.

Afin de valider notre outil, nous avons réalisé des westerns blots pour détecter les protéines intracellulaires ainsi que celles sécrétées dans le milieu par les ASC transfectées. Il apparaît que Shh est présent dans le milieu de culture aussi bien qu'à l'intérieur des ASC jusqu'à neuf jours après transfection. La diminution de la concentration de la protéine dans le cytosol au bout de dix jours pourrait être due à la consommation de cette protéine par les ASC elle-mêmes ou bien par les inhibitions de contact entre cellules qui entraînerait un arrêt du métabolisme sécrétoire.

Cette expérience nous confirme que la protéine Shh est bien exprimée de manière transitoire dans notre modèle mais peut persister suffisamment pour pouvoir avoir une action biologique *in*



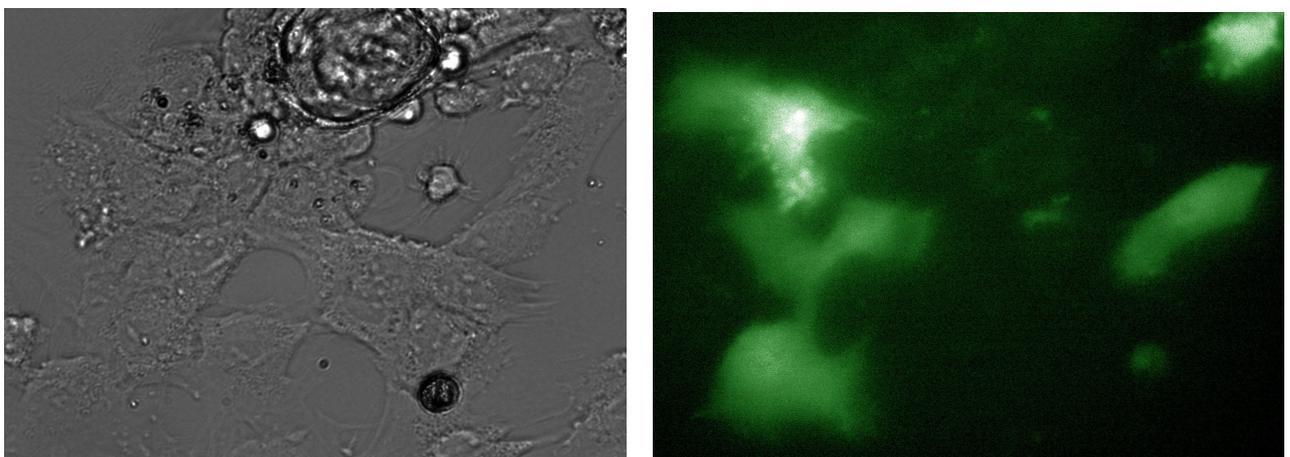
**Illustration 26:** Western Blot de détection de la protéine Shh dans le Cytosol et le milieu de culture des ASC transfectées.

### II.3.1 « Homing » des ASC.

Afin de vérifier la capacité de « homing » de notre modèle cellulaire, nous avons au préalable infecté des cellules avec un lentivirus codant le gène rapporteur de la GFP. L'utilisation de l'infection plutôt que la transfection nous a permis d'une part d'obtenir une expression stable dans le temps du rapporteur et d'autre part que cette expression soit plus intense. En effet, le promoteur inséré dans le lentivirus est un promoteur constitutif beaucoup plus puissant que l'IRES présent dans le plasmide pIRES-2-shh-eGFP. Ceci a pour but de faciliter la détection des cellules *ex vivo*.

Les CFU-F positives pour l'expression de la GFP ont été observées uniquement dans les cultures de moelle osseuse prélevée 3 jours après greffe intra osseuse. Deux colonies fluorescentes ont été révélées pour 70 CFU-F formées à partir de  $3 \times 10^6$  cellules mononucléées mises en culture à partir de la moelle prélevée dans l'humérus greffé. Aucune expression de la GFP a été détectée dans les cultures issues du prélèvement effectué à 15 jours de la greffe, de plus aucune colonie fluorescente n'a pu être détectée au niveau des prélèvements effectués sur la crête iliaque postérieure.

La culture de cellules prélevées dans la moelle osseuse de macaques greffés avec des ASC met en évidence que ces cellules sont capables de se maintenir dans le tissu hématopoïétique *in vivo* malgré leur caractère xénogénique.



**Illustration 27:** CSM issues d'un prélèvement de moelle osseuse 3 jours après greffe. A gauche en fond clair, à droite détection de la fluorescence de l'eGFP dans le canal du FITC.

Il a précédemment été décrit que les CSM ne sont pas réellement privilégiées du point de vue immunitaire lors de leur greffe dans un organisme non immunodéprimé (Ménard C et Tarte K, 2011). Ces cellules sont capables de se maintenir quelques jours (Müller-Ehmsen J et al, 2006) et de produire *in situ* des cytokines immunomodulatrices et anti-inflammatoires. Ce « touch and go » des CSM peut être rallongé dans le cas d'une ICT mais elles finiront par être éliminées par le système immunitaire de l'hôte. Les ASC issues du tissu adipeux ont un fonctionnement proche de celui des CSM et constituent donc un bon vecteur pour une thérapie génique transitoire. En effet, même si l'expression du pIRES-2-Shh-eGFP est programmée pour être de courte durée, la disparition des cellules vectrices offre une deuxième sécurité tout en permettant une durée de sécrétion suffisante.

De plus, l'activité potentiellement cancérogène des ASC greffées (Orimo A et al, 2005) est limitée par le fait de leur disparition rapide.

Parce que les cellules stromales contribuent au développement d'une grande variété de tumeurs, il est important de considérer l'effet de leur implantation sur le développement de cancers avant que ces cellules ne puissent être utilisées en clinique pour la médecine régénérative. Les compartiments où se situent les cellules stromales contiennent une variété de types cellulaires comme les fibroblastes, les péricytes, les myofibroblastes du système vasculaire, et les macrophages, qui forment ensemble un micro-environnement qui contrôle étroitement la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales (Bissell MJ et al, 2002). Lors de l'initiation et la progression du cancer du sein, les cellules tumorales réorganisent le micro-environnement des tissus afin de soutenir leur prolifération et l'invasion dans les tissus environnants (Pupa SM et al, 2002). Les tumeurs stromales recrutent les fibroblastes dans un processus appelé réaction desmoplasmique. Ces fibroblastes associés à la tumeur sont reprogrammés pour produire des facteurs de croissance, des cytokines et des protéines de la matrice extracellulaire et de remodelage (Orimo A et al, 2005).

Des études récentes ont démontré que les CSM recrutées par les cancers du sein activent l'invasion des métastases (Karnoub AE et al, 2007). D'autres études ont établi un lien entre les cellules dérivées du tissu adipeux et le développement de certains cancers. Un modèle murin *in vivo* a permis de démontrer le "homing" des ASC sur les sites tumoraux après injection par voie intraveineuse, de plus, le facteur de croissance dérivé du stroma 1 (SDF-1) et son récepteur CXCR4

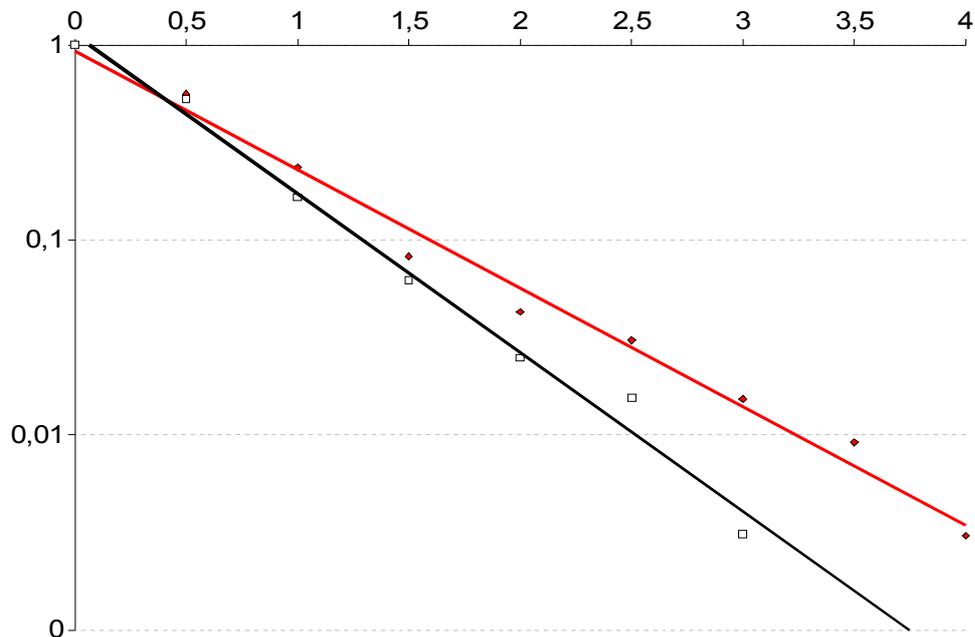
(CXCR4) jouent un rôle important dans la médiation de l'effet de promotion de tumeurs des ASC. (Muehlberg FL et al, 2009) et (Walter M et al, 2009) ont rapporté que l'IL-6 sécrétée par les ASC est liée à la migration et à l'invasion des cellules tumorales mammaires. L'IL-6 est un facteur de croissance essentiel pour plusieurs types de cancer comme le myélome multiple (MM) et le cancer de la prostate (Smith PC et al, 2001). En outre, une étude *in vivo* a montré que le SDF-1 sécrété par les ASC favorisent l'invasion et la métastase du cancer du sein.

Toutefois, l'effet des ASC sur les cellules tumorales du cancer est controversé. Plusieurs études ont rapporté que les ASC greffées inhibent la croissance des métastases du cancer du sein dans un modèle murin (Sun B et al, 2009).

La vraie limite dans l'utilisation de CSM en thérapie cellulaire reste la stabilité génomique de ces cellules. Cette dernière doit être confirmée dans les produits de thérapie cellulaire car il existe un risque de cancérisation direct (Rubio D et al, 2005).

### **II.3.2 Radiosensibilité des ASC manipulées.**

La radiosensibilité des ASC varie en fonction de la transfection de ces cellules avec le plasmide codant la protéine Shh (n=3). En effet nous avons observé une augmentation de la  $D_0$  des cellules transfectées avec le plasmide codant Shh. Cette dernière a été évaluée à  $1,14 \text{ Gy} \pm 0,2 \text{ Gy}$  contre  $1,07 \pm 0,13 \text{ Gy}$  pour les ASC transfectées avec le pIRES-2-eGFP seul ( $p < 0,05$ ).



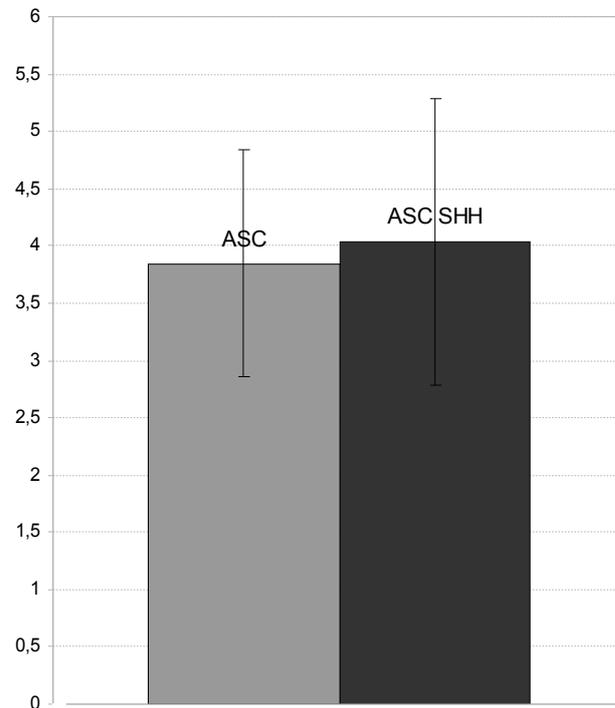
**Illustration 28:** Courbes de radiosensibilité des CSM transfectées. En rouge, CSM transfectées avec le plasmide pIRES-2-Shh-eGFP. En noir, CSM transfectées avec le pIRES-2-eGFP commercial.

Ce résultat suggère une activité radioprotectrice de la protéine Shh cohérente avec l'effet anti-apoptotique autocrine décrit dans la littérature.

### **II.3.3 Étude de l'effet de Sonic Hedgehog sur la prolifération et la différenciation des CSH *in vitro*.**

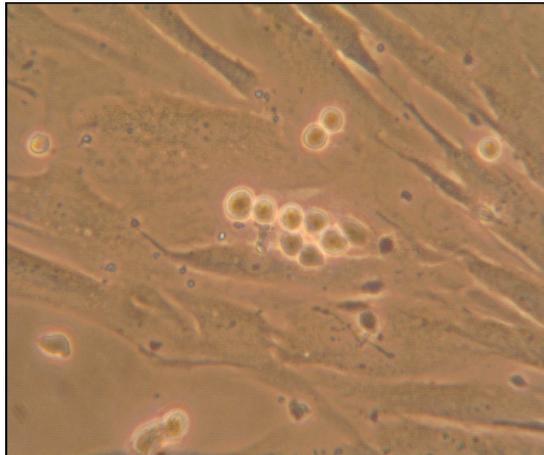
Dans le but de tester notre outil de thérapie génique préalablement aux tests pré-cliniques, nous avons voulu vérifier l'effet des ASC et des ASC sécrétant Shh dans le milieu de culture sur la prolifération et la différenciation de CSH CD34<sup>+</sup>.

Notre système de coculture n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative entre les différents groupes du point de vue de la prolifération cellulaire. Cependant, nous avons observé un net bénéfice de la coculture des CSH avec les ASC transfectées ou non par rapport à la prolifération sans stroma cellulaire.



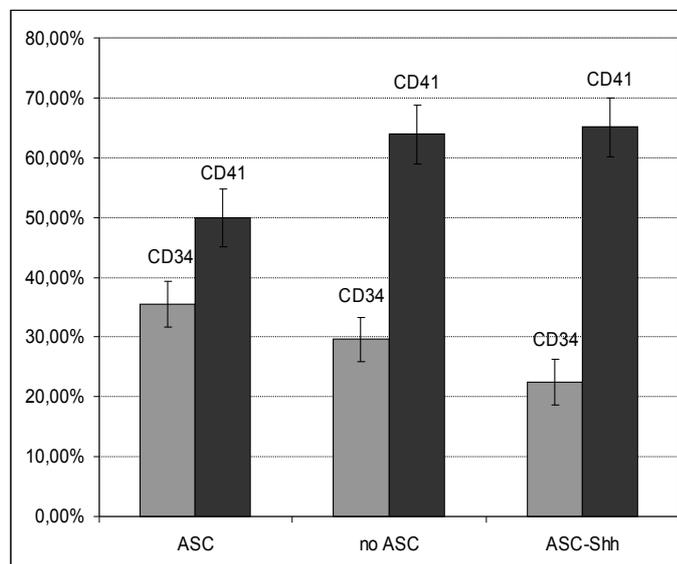
**Illustration 29:** Taux d'amplification de cellules  $CD34^+$  humaines sur un stroma d'ASC (en gris) et d'ASC transfectées avec le pIRES-2-Shh-eGFP (en noir). Aucune différence significative n'est observée ( $n = 5$  pour le groupe ASC,  $n=4$  pour le groupe ASC-Shh)

Après irradiation *in vitro*, les CSH  $CD34^+$  subissent une apoptose et une nécrose massive et présentent un taux d'amplification très limité après 10 jours de culture en présence du cocktail de cytokines SFT3. Le tapis de cellules nourricières augmente de façon significative ce taux; ce dernier est  $3,85 \pm 0,9$  fois supérieur. De plus, de nombreux clusters de cellules hématopoïétiques sont visibles à la surface du stroma (**illustration 30**).



**Illustration 30:** *Cellules en clusters sur un stroma d'ASC.*

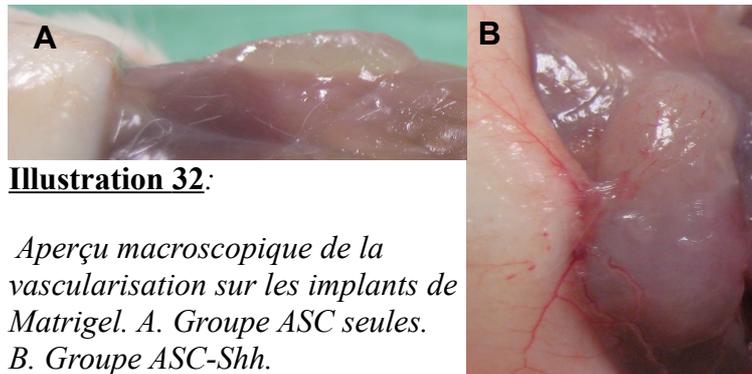
Aucun effet synergique n'a été observé dans les cultures d'ASC-Shh. Environ un tiers des cellules hématopoïétiques possède un taux élevé de l'antigène CD34<sup>+</sup> quelles que soient les conditions de culture; de plus SFT3, induit une différenciation préférentielle vers la lignée mégacaryocytaire dans tous les groupes (**illustration 31**). Ces résultats sont en accord avec les études précédemment publiées au laboratoire (Drouet M et al, 2005).



**Illustration 31:** *Pourcentages d'expression en cytométrie en flux des marqueurs CD34 et CD41 par des CSH humaines après 10 jours de culture sur un stroma cellulaire. (n = 4 pour le groupe ASC-Shh et n = 5 pour les autres groupes)*

### II.3.4 Étude ex vivo de la néovascularisation induite par la sécrétion de SHH par des ASCs transfectées dans un modèle murin.

Les résultats ont montré ici dans un premier temps qu'aucun signe de revascularisation n'est détectable macroscopiquement dans les groupes ASC non transfectées et les groupes Matrigel™ seul (**illustration 32**). Au contraire, de nombreuses connections vasculaires avec les tissus voisins sont visibles dans le groupe de souris ayant reçu les explants d'ASC transfectées avec le plasmide Shh. Ces premières données, sans infirmer le potentiel pro-angiogénique déjà décrit des ASC, (Verseijden F et al, 2001) démontrent qu'une stratégie de surexpression de Shh améliore grandement cet effet.

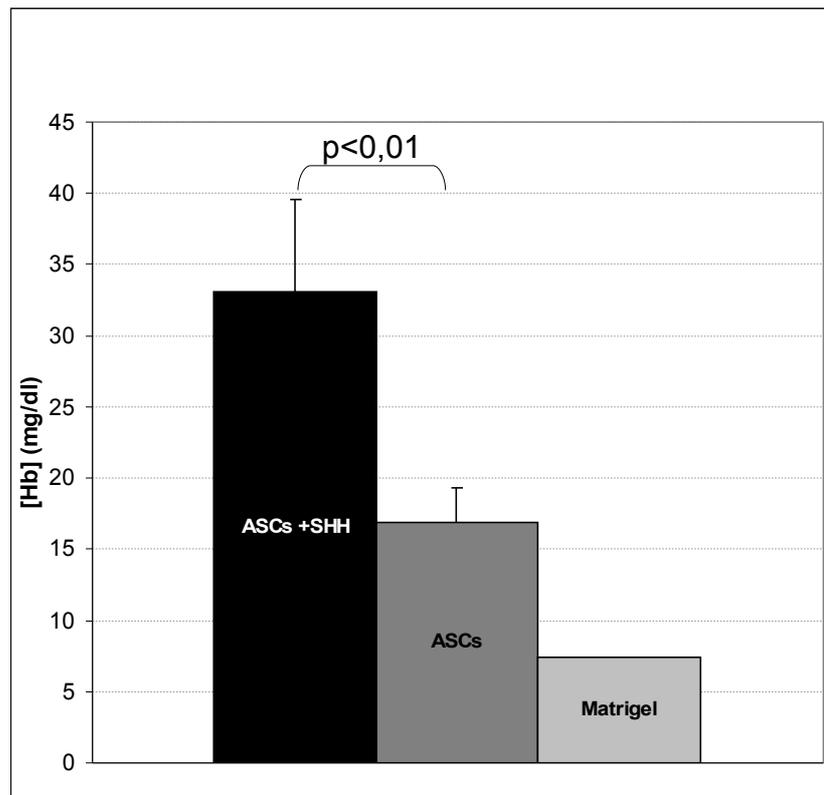


**Illustration 32:**

*Aperçu macroscopique de la vascularisation sur les implants de Matrigel. A. Groupe ASC seules. B. Groupe ASC-Shh.*

De plus l'analyse du contenu en hémoglobine des explants confirme l'activité pro-angiogénique de Shh dans ce système car le groupe ASC-Shh possède une concentration en hémoglobine significativement plus élevée que celle des autres groupes. En effet, le groupe ASC-Shh contient  $33 \pm 6,47$  mgHb/dL contre  $18,9 \pm 2,4$  mgHb/dL pour le groupe ASC seules  $p < 0,01$  ( $n=9$  pour les groupes ASC seules et ASC-Shh).

Le groupe où les explants sont composés de Matrigel™ seul n'est pas assez fourni pour permettre une étude statistique, cependant les premiers résultats vont dans le sens d'une concentration en hémoglobine inférieure à celle du groupe ASC seules, ceci va dans le sens d'un effet pro-angiogénique de ces cellules par elles-mêmes.



**Illustration 33:** Concentration en hémoglobine dans les différents types d'implants de Matrigel™.  $n=9$  pour les groupes ASC seules et ASC-Shh.  $p<0.01$

Les résultats précédents confirment que la stratégie de transfection des ASC par notre plasmide codant Shh est efficace pour activer la néovascularisation de territoires tissulaires. La transposition de cette technique pour tenter de réorganiser la niche hématopoïétique post-ICT semble donc être une perspective thérapeutique intéressante.

Même si nous avons démontré l'activité pro-angiogénique de la protéine Shh dans notre modèle, celle des ASC n'est cependant pas négligeable. En effet, des études récentes ont démontré la capacité de ces cellules à améliorer la néovascularisation par elles-mêmes (Verseijden F et al, 2001). Deux hypothèses sont en discussion pour définir comment ces cellules produisent cet effet. Les ASC pourraient d'une part s'intégrer aux néovaisseaux sous forme de péricytes et ainsi supporter la revascularisation endogène (da Silva Meirelles L et al, 2008), et d'autre part elles seraient capables de se différencier en cellules endothéliales (Planat-Benard V et al, 2004). Comme nous l'avons vu précédemment, la restructuration vasculaire de la niche est un facteur bénéfique de

la régénération du système hématopoïétique. Les cellules pourraient donc agir de manière synergique avec notre protéine d'intérêt sécrétée dans notre modèle de macaque irradié à forte dose.

### **II.4 Modèle clinique de traitement du syndrome hématopoïétique chez le primate non humain.**

#### **II.4.1 Réponse biologique des animaux contrôles.**

Les animaux témoins exposés à 8 Gy ICT (n=4) présentent une période de pancytopenie profonde par la durée de la neutropénie de  $23 \pm 5$  et  $33,1 \pm 9$  jours respectivement pour l'ANC inférieur à  $0,5 \times 10^9 / L$  et  $1 \times 10^9 / L$ . La durée de thrombocytopénie a été de  $25,4 \pm 7,2$  jours pour les plaquettes inférieures à  $20 \times 10^9 / L$ , celle de la lymphopénie de  $41,4 \pm 4,3$  jours, et celle de l'anémie de  $40 \pm 13$  jours. Ces animaux ont nécessité des soins palliatifs et ont reçu  $4,8 \pm 1,8$  unités de transfusion sanguine (45 à 50 mL de sang total prélevées sur un singe donneur). Un animal est mort le 17<sup>e</sup> jour d'aplasie médullaire, et ce, malgré les antibiotiques et les transfusions.

Après une longue période de suivi s'étalant au-delà de 180 jours, les neutrophiles, lymphocytes, plaquettes et globules rouges ont atteint respectivement  $77,4 \pm 17,6\%$ ,  $62,3 \pm 9,9\%$ ,  $110,6 \pm 17,6\%$  et  $99,8 \pm 3,8\%$  des valeurs de référence. Le nombre de CFU issues de la moelle osseuse (1 prélèvement huméral et 1 prélèvement au niveau de la crête iliaque postérieure) a montré une récupération partielle 42 jours après le déclin initial et seules les CFU-GEMM ont atteint les valeurs initiales à partir de 180 jours.

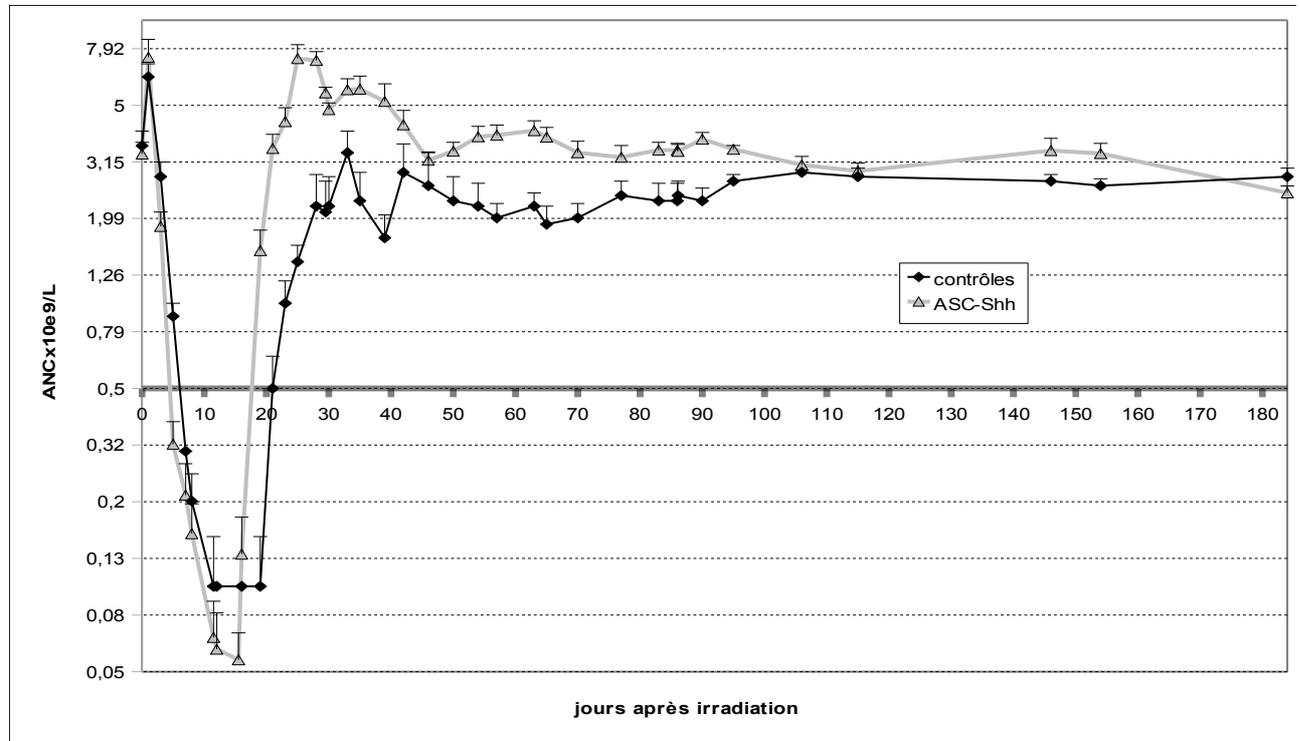
#### **II.4.2 Effet de la greffe des ASC manipulées sur la reconstitution hématopoïétique.**

##### **II.4.2.1 *Évolution des numérations et formules sanguines.***

Les animaux greffés ont présenté une période réduite de neutropénie de  $14,2 \pm 1$  jour pour un ANC inférieur à  $0,5 \times 10^9 / L$  et de  $16,5 \pm 1,3$  jours pour l'ANC à moins de  $1 \times 10^9 / L$  ( $p < 0,05$ ). Une très forte hausse de l'ANC a été observée entre 25 et 40 jours après irradiation. A partir du 2<sup>e</sup> mois l'ANC reste stable au niveau de base enregistré lors du contrôle précédant l'expérimentation.

Conformément à ces résultats l'aire sous la courbe de l'ANC a significativement augmenté

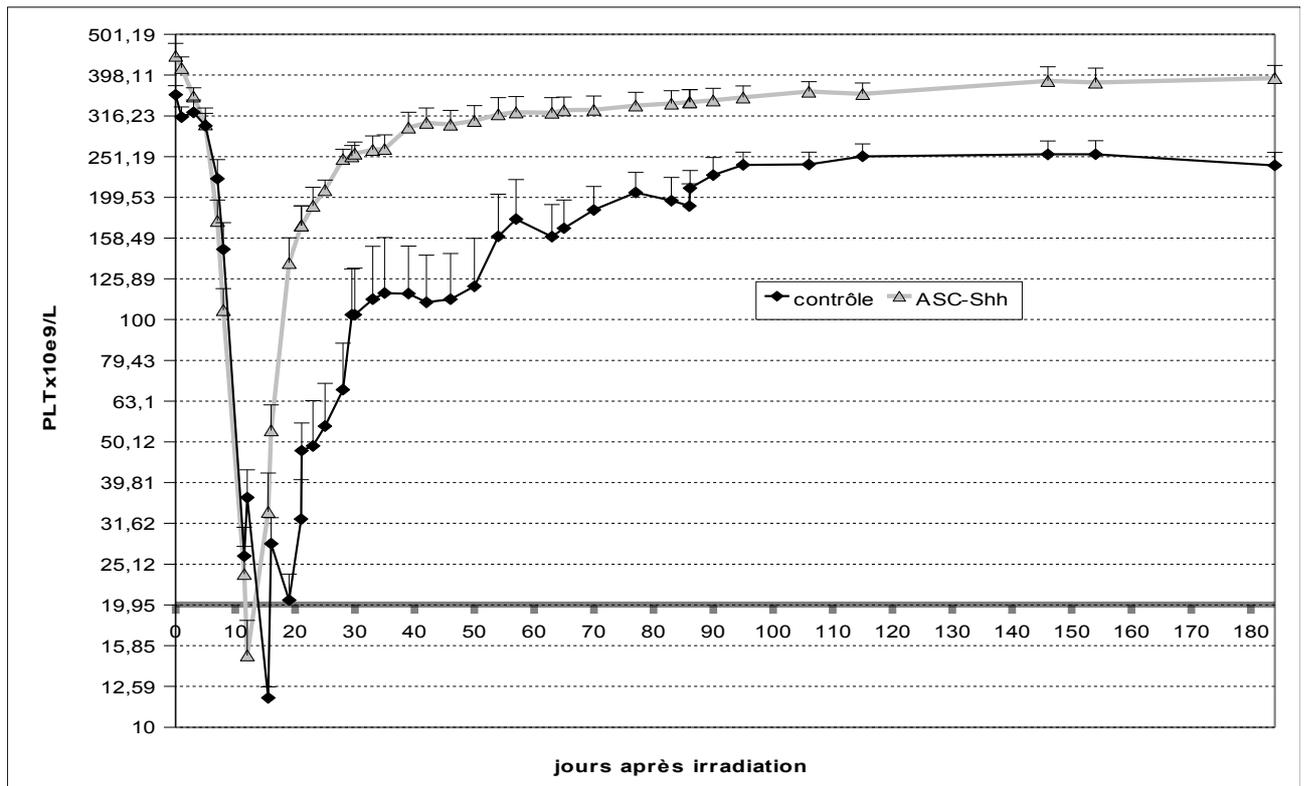
de J0 à J30 et J0 à J90 ( $p < 0,05$ ).



**Illustration 34:** *Évolution de la numération en polynucléaires neutrophiles au cours du temps en échelle semi-logarithmique.*

Les animaux ont présenté une très courte période de thrombocytopenie de  $4,75 \pm 1,8$  jours pour les plaquettes à moins de  $20 \times 10^9/L$ , ( $p < 0,05$ ) et le nombre de plaquettes a considérablement augmenté jusqu'à environ 40 jours.

De même que précédemment l'aire sous la courbe pour les plaquettes a été augmentée de J0 à J30 ( $p < 0,05$ ) et de J0 à J90.



**Illustration 35:** Évolution de la numération plaquettaire au cours du temps en échelle semi-logarithmique .

Les signes cliniques confirment les résultats précédents car aucun animal greffé n'a présenté d'épistaxis. De plus une réduction significative des besoins en transfusion sanguine a été observée par rapport aux témoins ( $p < 0,05$ ).

Cependant, la durée de l'anémie n'a pas été significativement diminuée et les aires sous la courbe de J0 à J30 ou J90 ne diffèrent pas. La durée de la lymphopénie a été réduite et l'aire sous la courbe de J0 à J30 et de J0 à J90 a fortement augmenté.

Paramètres	Groupe greffé Shh, moyenne ± EType (Max-Min)	Groupe contrôle, moyenne ± EType (Max-Min)
Durée de neutropénie ANC inférieur à 0.5 x 10 <sup>9</sup> /L, (en jours)	14,2 ± 1 (13-17)	23 ± 5 (13-40)
Durée de neutropénie ANC inférieur à 1 x 10 <sup>9</sup> /L, (en jours)	16,5 ± 1,3 (14-20)*	33,1 ± 9 (15-65)
Durée de thrombocytopénie PLT inférieures à 20 x 10 <sup>9</sup> /L, (en jours)	4,75 ± 1,8 (0-9)*	25,4 ± 7,2 (0-70)
Durée de thrombocytopénie PLT inférieures à 50 x 10 <sup>9</sup> /L, (en jours)	8 ± 1,3 (5-11)*	32,8 ± 9 (6-53)
Durée d'anémie, concentration en Hb inférieure à 10g/dL, (en jours)	15,5 ± 3,6 (8-25)	40 ± 13 (0-70)
Durée de lymphopénie, LY inférieurs à 1 x 10 <sup>9</sup> /L, (en jours)	27,75 ± 4,2 (21-40)	41,4 ± 4,3 (33-60)
Dépendance transfusionnelle (en unités)	1 ± 0,6 (0-2)*	4,8 ± 1,8 (0-9)

**Tableau 9:** Paramètres hématologiques des macaques irradiés à 8 Gy gamma par une souce de <sup>60</sup>Co. Cohorte pour les deux groupes; n=4 pour le groupe greffé avec les cellules manipulées Sonic Hedgehog (Shh) et n=8 pour le groupe contrôle. \* =Significativité statistique p< 0,05 entre les contrôles et les traités.

Cent quatre-vingts jours plus tard, l'ANC, les plaquettes, les lymphocytes et les globules rouges atteignent respectivement 77,65 ± 9,6%, 88,2 ± 9,9% (taux plasmatiques significativement différents de leur contrepartie non greffé, p<0,05), 126,4 ± 28,8% et 102,3 ± 3% des valeurs de base. Deux des animaux greffés ont présenté une augmentation notable des lymphocytes à 194% et 149% de la valeur de base.

	WBCs	ANCs	Lys	PLTs	RBCs
Groupe contrôle					
J0-J30	50.1 ± 13.7	32.5 ± 11.3	12.9 ± 2.6	31.9 ± 5.9	129.3 ± 20.2
J0-J90	285.7 ± 92.7	139.3 ± 55.9	121.5 ± 34.7	106.5 ± 47.9	315.22 ± 69.8
Groupe greffé Shh					
J0-J30	104.4 ± 10.2*	74.8 ± 9.8*	18.9 ± 1.6*	52.2 ± 4.8*	128.4 ± 4.8
J0-J90	485.7 ± 30.5	311.6 ± 27.4*	125.4 ± 11.4	240.8 ± 32.7	430.5 ± 13.8

**Tableau 10:** Aires sous la courbe pour les éléments figurés totaux (WBC), ANCs, Les lymphocytes (Lys), les plaquettes (PLTs), et les globules rouges (RBCs) pour les macaques contrôles et greffés avec les cellules Shh. Les valeurs présentent les moyennes ± écart-type. Valeurs cumulées exprimées en unités arbitraires basés sur un calcul trapézoïdal.  $P < 0.05$ . \*=Significativement différent des valeurs contrôles.

#### II.4.2.2 Évolution des CFU hématopoïétiques.

Au niveau de la moelle osseuse de l'humérus et de la crête iliaque postérieure, les activités clonogéniques de trois animaux greffés sur quatre ont présenté une augmentation spectaculaire au 42<sup>e</sup> jour.

Le pourcentage d'augmentation pour chaque type de CFU a été de  $70,9 \pm 20,7\%$  du taux de base contre  $17,3 \pm 5,6\%$  pour les CFU-GM,  $92,3 \pm 7\%$  contre  $38,6 \pm 15,4\%$  pour les BFU-E,  $76 \pm 10,5$  contre  $54,9 \pm 23,9\%$  pour les CFU-GEMM et  $83,6 \pm 27,4$  contre  $34,6 \pm 16$  pour les CFU-MK respectivement chez les singes greffés et non greffés. Le suivi à long terme (au-delà de 300 jours pour deux singes, et au delà de 180 jours pour les deux autres) a confirmé une préservation du potentiel hématopoïétique chez les animaux greffés. Les pourcentage du taux de base des CFU dans l'humérus alors ont été de  $59,7 \pm 9\%$  contre  $28,6 \pm 6,8\%$  (CFU-GM),  $84,2 \pm 6,9\%$  contre  $27,4 \pm 3\%$  (BFU-E),  $90,4 \pm 15,4\%$  contre  $33,9 \pm 4,3\%$  (CFU-GEMM) et  $87,1 \pm 9,6\%$  contre  $30,7 \pm 12\%$  (CFU-MK).

Les humérus greffés et non greffés ne diffèrent pas significativement en termes de quantités de clonogènes. Ce résultat suggère que les ASC ont pu migrer d'un humérus à l'autre après l'injection intra-osseuse. Un passage direct des cellules dans le système circulatoire a pu se produire. De façon alternative ce résultat peut rendre compte d'une recirculation des progéniteurs hématopoïétiques ou d'une régulation de l'hématopoïèse à l'échelle de l'organisme *via* des facteurs hormonaux tel que les cytokines.

	Avant irradiation	Jour 1	Jour 42	Jours $\geq 180$
	<b>Humérus</b>			
<b>Animaux contrôles (n=5)</b>				
CFU-GM	425.6 $\pm$ 41**	6.3 $\pm$ 2.5	73.7 $\pm$ 24	121.75 $\pm$ 29
BFU-E	162.5 $\pm$ 25**	0.7 $\pm$ 0.6	62.7 $\pm$ 25	44.5 $\pm$ 5
CFU-GEMM	46 $\pm$ 8.4***	0	25.2 $\pm$ 11	15.6 $\pm$ 2
CFU-MK	174.2 $\pm$ 14**	2 $\pm$ 0.5	60.2 $\pm$ 28	53.7 $\pm$ 21
<b>Animaux greffés Shh (n=4)</b>			Injecté /Non injecté	Injecté /Non injecté
CFU-GM	368.25 $\pm$ 69	ND	261 $\pm$ 76.3	220 $\pm$ 33.2 / 193.2 $\pm$ 58.4
BFU-E	110.7 $\pm$ 23	ND	102.2 $\pm$ 7.8 / 118.5 $\pm$ 7.3	93.25 $\pm$ 7.6 / 75 $\pm$ 21.7*
CFU-GEMM	31.2 $\pm$ 4.7	ND	23.7 $\pm$ 3.3 / 28 $\pm$ 1.6	28.25 $\pm$ 4.8 / 22 $\pm$ 4.6*
CFU-MK	122 $\pm$ 22	ND	102 $\pm$ 33.4/ 108.7 $\pm$ 31.2	106.25 $\pm$ 11.7 / 90.5 $\pm$ 23.2
	<b>Crête iliaque postérieure</b>			
<b>Animaux contrôles (n=5)</b>				
CFU-GM	203 $\pm$ 93\$	5 $\pm$ 2	25.7 $\pm$ 6	98.2 $\pm$ 14
BFU-E	81.6 $\pm$ 30\$	0.7 $\pm$ 0.3	16.2 $\pm$ 2.2	65.7 $\pm$ 26.6
CFU-GEMM	24.4 $\pm$ 7.8	0	6 $\pm$ 2	25 $\pm$ 9.6
CFU-MK	88.4 $\pm$ 37.5\$	1 $\pm$ 0.7	12.2 $\pm$ 5.3	46.2 $\pm$ 10
<b>Animaux greffés Shh (n=4)</b>				
CFU-GM	247.4 $\pm$ 102.3	ND	139 $\pm$ 46.6	138.5 $\pm$ 71
BFU-E	87.4 $\pm$ 30.8	ND	57 $\pm$ 20	61.5 $\pm$ 27.8
CFU-GEMM	18.6 $\pm$ 5.8	ND	13.7 $\pm$ 5	16.25 $\pm$ 5.9
CFU-MK	69.4 $\pm$ 26.3	ND	50.5 $\pm$ 22.7	59.75 $\pm$ 27.9

**Tableau 11:** Activité clonogénique de la moelle osseuse exprimée en CFU pour  $10^5$  cellules mononucléées ensemencées. Les valeurs présentent les moyennes  $\pm$  écart-type. ND: non déterminé. Significativité statistique ( $P < 0.05$ ) entre le groupe greffé et le groupe contrôle (\*), entre les valeurs pré-irradiation et J1 (\*\*), entre les valeurs pré-irradiation et J180 (\*\*\*), entre les valeurs pré-irradiation et J1 / J42 / J180 (\$).

Cette étude établit pour la première fois le potentiel de la thérapie génique basée sur l'expression *in situ* de la sécrétion du morphogène Shh chez les singes fortement irradiés (8 Gy gamma ICT) pour favoriser la réparation de la niche hématopoïétique de cellules souches. Fait intéressant, l'injection intra-osseuse unique d'ASC-Shh a stimulé la reprise hématopoïétique chez les animaux myélosupprimés et le suivi à long terme (180 à 300 jours) a confirmé une reprise stable sans épuisement du pool de CSH résiduelles de la moelle osseuse.

Le groupe d'animaux contrôles ayant reçu des ASC transfectées avec le vecteur plasmidique pIRES-2-eGFP ne contenant pas la séquence permettant l'expression de la protéine Shh est actuellement en cours d'évaluation. Ce contrôle est nécessaire car il est possible que les cellules agissent de façon synergique avec la protéine Shh pour améliorer la restauration de l'hématopoïèse après une exposition aux RI. En effet une étude récente menée chez la souris ont permis de démontrer une reconstitution hématopoïétique accélérée chez des animaux létalement irradiés après une greffe systémique de CSM (Lange C et al, 2011). De plus l'effet pro-angiogénique des ASC (Verseijden F et al, 2001) pourrait également contribuer à la restauration de l'hématopoïèse endogène des animaux traités.

Les conséquences physiopathologiques de l'exposition à une forte dose de rayonnement gamma au niveau de la niche hématopoïétique ont été documentées depuis plusieurs années et sont maintenant mieux comprises (Greenberger JS et Epperly M, 2009). Cependant les différentes interactions entre les différents acteurs de la niche sont encore mal comprises. Les cellules souches hématopoïétiques et les cellules progénitrices, ou du moins leur fraction cyclante sont reconnues comme étant très radio-sensibles; leur exposition directe conduit à une mort massive par apoptose dans les 24 heures (Drouet et al, 2004).

De plus, les dommages des RI sur le microenvironnement sont également préjudiciables pour l'hématopoïèse dans des modèles animaux (Mahmud N et al, 2004).

Il est intéressant de souligner qu'une restauration multilignée a été remarquée chez les animaux greffés par rapport aux témoins PBS avec une forte surproduction des neutrophiles et une réduction significative de la période thrombocytopénique. Bien que ces résultats ne soient pas statistiquement significatifs, les périodes d'anémie et de lymphopénie ont été également réduites. L'effet sur l'anémie serait en accord avec l'étude récemment publiée de Harrandi et al dans un modèle rongeur. Celle-ci suggère qu'une thérapie basée sur l'expression du BMP4 constitue une nouvelle approche thérapeutique pour favoriser le renouvellement des progéniteurs érythroïdes.

(Harandi OF et al, 2010). Cette reprise multilignée résulte de l'activité clonogénique observée au 42<sup>e</sup> jour après irradiation, mais la taille limitée du groupe traité ne permet pas de significativité statistique par rapport à leur homologue non greffé. A l'intérieur du groupe transplanté la réponse hématopoïétique a été assez homogène ce qui indique que le seuil d'efficacité a été dépassé (peut-être  $1-2 \times 10^6$  cellules/kg).

En ce qui concerne les cibles potentielles des morphogènes, plusieurs hypothèses sont encore débattues. Des données contradictoires ont été publiées à ce jour en ce qui concerne les CSH chez la souris. Trowbridge et al (Trowbridge JJ et al, 2006) ont rapporté et l'accroissement du nombre des leucocytes périphériques de sang chez les souris PTC1 +/- injectées avec du 5-FU (5-FluoroUracile) mais Hofman *et al.* n'ont relevé aucune différence entre les souris « knock-out » pour le récepteur Smo et les souris contrôles (Hofman I et al, 2009).

Le traitement de l'ischémie par Shh a déjà conduit à une amélioration clinique et biologique dans des modèles animaux (membre postérieur, muscle squelettique, infarctus du myocarde). Dans leur élégante étude, Siggins *et al.* (Siggins SL et al, 2009) ont mis en évidence la possibilité que l'effet rapporté des protéines de la famille Hedhehog sur les CSH pouvait être indirect par leur effet sur les cellules souches du microenvironnement.

À ce jour, différentes stratégies thérapeutiques se concentrant sur la niche hématopoïétique ont été proposées. L'injection systémique de la PTH chez les souris a contrecarré une exposition répétée à la chimiothérapie cytotoxique et a permis l'expansion des CSPH de la moelle osseuse après ICT (Himburg HA et al, 2010) . En ce qui concerne les approches de thérapie cellulaire, le groupe de Muramoto et Chute a démontré la capacité des cellules endothéliales (MBECs) à favoriser la régénération des CSH irradiées à 4 Gy in vitro et d'améliorer la récupération hématopoïétique et la survie des souris irradiées (Muramoto GG et al, 2006); (Chute JP et al, 2007). Selon les auteurs, cet effet serait lié à la libération du facteur soluble et n'impliquent pas de prise de greffe de moelle osseuse. L'activité antiapoptotique de CSM issues de la moelle osseuse a également été démontrée dans le cas des cellules CD34<sup>+</sup> en co-culture, mais l'injection intra-osseuse de CSM en un seul traitement n'améliore cependant pas la restauration hématopoïétique chez les singes fortement irradiés (Drouet al, 2005).



# **T**roisième Partie



---

## **Conclusions et perspectives**

---

## I. Conclusion.

La plupart des études récemment menées sur les traitements du syndrome hématologique faisant suite à une irradiation corporelle totale se sont concentrées sur la cellule souche hématopoïétique elle-même. En effet, la principale cause de ce syndrome est le non-renouvellement des éléments figurés du sang dû à une destruction par apoptose des cellules progénitrices et des cellules souches hématopoïétiques. Cependant, comme nous l'avons décrit précédemment, le processus hématopoïétique met en jeu différents acteurs cellulaires et moléculaires tout aussi importants que la CSH pour assurer l'homéostasie du système. Ces éléments ont une fonction de soutien en termes de structure du tissu, de fonctionnalité vasculaire et de stimulation des CSH par leur activité sécrétoire (Dominici M et al, 2009).

La question fondamentale, déjà abordée dans ce manuscrit, qui se pose au thérapeute, est le choix entre une approche autologue et une approche allogénique. Certes, dans le cadre d'une irradiation accidentelle, seule l'approche allogénique apparaît réaliste (à moins de repenser la question de la cryoconservation préventive des CSH mobilisées de personnels ciblés en fonction de leur risque d'exposition aux RI). Cependant, nous avons souligné les résultats mitigés de ces greffes puisque la majorité des victimes irradiées greffées a montré une reprise hématopoïétique autologue après une prise de greffe transitoire (la possible stimulation de la reprise autologue par le greffon reste une question débattue) et qu'un certain nombre d'entre elles ont évolué vers une défaillance multi-viscérale plus ou moins tardive liée notamment aux conflits immunitaires dus au greffon. Parallèlement, aucun irradié accidentel n'a reçu de CSM conjointement à une greffe allogénique et le bénéfice attendu d'une co-greffe (en termes de tolérance du greffon et de prévention de la toxicité retardée des RI) repose sur les essais cliniques en onco-hématologie.

D'un autre côté, l'approche autologue simple, appelée TCA, n'a pas été développée sur le plan clinique car les modèles animaux de collecte de CSH post-irradiation se sont montrés décevants. C'est pourquoi nous avons proposé une stratégie favorisant la reconstitution autologue post-irradiation sans recours à des CSH allogéniques, en utilisant des ASC comme vecteur d'une thérapie génique. Les ASC ont des caractéristiques très similaires à celles des CSM du point de vue de l'immunogénicité et de leur capacité de "homing" au niveau des foyers d'inflammation. De plus, le prélèvement de ces cellules en grande quantité dans le tissu adipeux peut permettre l'élaboration rapide d'un greffon de taille clinique.

L'utilisation de facteurs pléiotropes tels que Sonic Hedgehog semble être la suite logique aux thérapies spécifiques anti-apoptotiques de la cellule souche hématopoïétique. Cette stratégie vise à obtenir un effet global sur la niche hématopoïétique sans toutefois avoir recours à la greffe allogénique et les importantes contraintes qu'elle implique. Cependant, l'utilisation de tels facteurs comporte elle aussi des limites. En effet, les morphogènes sont des gènes impliqués dans le développement embryonnaire et leur expression dans un organisme adulte n'est que rarement observée à l'état normal. De plus, ces gènes sont souvent impliqués dans le développement de pathologies cancéreuses. Leur forte capacité de stimulation sur de nombreux types cellulaires peut donc s'avérer bénéfique à court terme mais risquerait d'entraîner des complications sévères dans le cadre d'une utilisation prolongée.

Le travail de thèse présenté ici a contribué à approfondir la compréhension de l'influence des RI sur les progéniteurs mésenchymateux et endothéliaux de la niche hématopoïétique, et a permis l'élaboration d'un outil de thérapie cellulaire et génique visant à améliorer la reconstitution hématopoïétique dans un modèle de syndrome aigu d'irradiation chez le primate. La cible de notre traitement a été la niche hématopoïétique dans sa globalité. Notre stratégie a été divisée en deux points :

- Maintenir la cohérence structurelle de la niche par l'apport de cellules nouvelles et le maintien des cellules résiduelles.
- Améliorer la fonctionnalité de la niche en la revascularisant plus rapidement.

L'action de notre traitement sur la niche hématopoïétique *in vivo* est actuellement en cours d'évaluation par l'étude histologique de biopsies médullaires chez la souris létalement irradiée.

### **I.1 Élaboration du vecteur.**

Lors de notre étude nous avons tenté d'une part de décrypter les dommages de l'irradiation sur les différents éléments cellulaires de la niche hématopoïétique, et d'autre part de construire un outil qui aurait un effet positif sur la reconstruction de cette niche.

Nous avons tout d'abord isolé les ASC du tissu adipeux porcin afin d'en faire une source de cellules capable de proliférer en quantités suffisantes pour constituer un greffon de taille clinique d'environ 100 000 cellules. Ces cellules ont par la suite été caractérisées comme étant des ASC. Ces dernières, bien que d'origine xénogénique, possèdent des capacités de « homing » au niveau des niches intra-osseuses chez le macaque et sont capables de se maintenir dans leur organisme-hôte pendant plusieurs jours (trois). Ce délai semble raisonnable pour que notre outil de thérapie génique ait un effet sur la reconstitution hématopoïétique des animaux mais n'entraîne pas d'effets secondaires délétères.

Le clonage de la partie active N-terminale du morphogène Sonic Hedgehog a par la suite été réalisé dans un vecteur d'expression plasmidique. Ce dernier a montré des taux de transfection de 50% dans nos ASC, ce qui a assuré par la suite une bonne capacité de sécrétion de ces cellules dans l'organisme. L'étude par Western Blot a confirmé que ces cellules pouvaient sécréter la protéine Shh pendant 9 jours dans leur milieu de culture.

### **1.2 Tests fonctionnels.**

Les études précédentes ont démontré la forte radiosensibilité des CSH à l'irradiation. Ces dernières disparaissent rapidement de l'organisme *in vivo* par le phénomène d'apoptose. Cependant, comme l'ont révélé les études de marquages  $\beta$ -galactosidase et celles de cycle cellulaire, les CSM issues de la moelle osseuse sont préférentiellement soumises au phénomène de sénescence *in vitro*.

Cependant, l'équipe de Ma. J *et al.* a démontré que l'exposition aux radiations ionisantes *in vivo* induisait la mort des cellules souches mésenchymateuses par un mécanisme différent de la sénescence et que cette perte cellulaire est liée à la diminution de la capacité de soutien de la niche endostéale.

Des résultats récents obtenus dans notre équipe font état d'une diminution du nombre de clonogènes mésenchymateux et du nombre de cellules mononucléées issues des têtes humérales de babouins irradiés, vraisemblablement par apoptose. De plus, la radiosensibilité des CSM et des cellules endothéliales augmente avec l'hypoxie. La perte de capacité proliférative de ces cellules serait donc plus importante au niveau des zones fortement hypoxiques de la niche endostéale (Ma J *et al.*, 2007).

---

La transfection des ASC avec notre plasmide codant la protéine Shh a permis d'augmenter leur radiorésistance. Shh augmenterait donc leur capacité clonogène post-irradiation. Ce résultat suggère que notre outil pourrait lutter contre la mort des cellules de soutien résiduelles de la niche hématopoïétique.

Bien qu'aucun effet significatif des cellules transfectées n'ait été observé sur la différenciation des CSH lors de leur co-culture, nous avons cependant décelé une tendance à la différenciation mégacaryocytaire associée à une diminution de l'expression du CD34 dans les co-cultures en présence d'ASC-Shh. Cette tendance à la différenciation va dans le sens de la diminution de la durée de thrombocytopénie des animaux traités. De plus, la présence d'ASC transfectées ou non a bien un effet positif sur la capacité de prolifération des CSH relativement à la culture sans stroma. L'effet principal recherché par notre outil de thérapie génique était d'augmenter la revascularisation de la niche.

La néovascularisation des implants de Matrigel™ greffés aux souris NOD-SCID a été doublée dans les groupes ayant reçu des ASC transfectées avec le pIRES-2-Shh-eGFP par rapport au groupe ayant reçu des ASC non manipulées. L'effet pro-angiogénique de notre outil dans ce modèle de petit animal nous a encouragés à l'utiliser dans notre modèle de macaque irradié a forte dose.

### **1.3 Étude de thérapie génique.**

Lors de notre étude de greffe xénogénique, nous avons observé différents paramètres sur les animaux des différents groupes.

Concernant les paramètres hématologiques, les animaux traités avec le greffon d'ASC manipulées ont subi une réduction significative de la durée de la neutropénie et de la thrombocytopénie ainsi que de leur dépendance transfusionnelle après irradiation. La durée de neutropénie a en effet été divisée par deux en passant de 33 jours à 16 jours et la durée de thrombocytopénie a été divisée par quatre en passant de 32 jours à 8 jours. L'effet le plus significatif de notre traitement a été l'amélioration des concentrations plaquettaires sanguines, cette action peut être corrélée à la disparition rapide des pétéchies chez les animaux traités. La faible dépendance

transfusionnelle des animaux greffés Shh met également en évidence une amélioration du statut clinique de ces animaux

De plus, les aires sous la courbe sont significativement plus importantes chez les animaux traités pour ce qui est du nombre d'éléments figurés totaux dans le premier mois suivant l'irradiation. La reconstitution des différents éléments figurés du sang est donc grandement améliorée par notre traitement. Les taux plaquettaires sanguins sont les plus affectés par cette reconstitution, qui plus est au delà de 180 jours de suivi ces taux retrouvent ceux de la ligne de base ce qui n'est pas le cas chez les animaux contrôles.

L'activité clonogénique de la moelle osseuse des animaux traités a été supérieure à celle des animaux contrôles. Ce résultat est cohérent avec l'augmentation des taux plasmatiques des différents éléments figurés du sang.

Notre étude a donc permis de réaliser un outil de thérapie génique permettant une amélioration du profil clinique et de l'évolution des constantes sanguines lors du syndrome hémato-poïétique chez le macaque irradié a forte dose. Nos cellules transfectées ont permis une reconstitution hémato-poïétique anticipée chez ces animaux. Cet effet global passe probablement par plusieurs phénomènes à l'échelle de la niche hémato-poïétique :

- Une limitation de la sénescence des cellules de soutien de la niche.
- Une activation directe des CSPH résiduels, notamment les progéniteurs mégacaryocytaires.
- Une restructuration de la niche par l'intermédiaire de sa revascularisation.

Cependant notre étude comporte des limites. En effet, l'étude *in vitro* ne nous permet pas de conclure sur les effets biologiques de l'irradiation *in vivo*. Nous n'avons étudié qu'une partie des éléments cellulaires de la niche et les résultats présentés ne décrivent pas l'effet global de l'irradiation sur la niche hémato-poïétique ni son influence sur les communications cellulaires aboutissant à la régulation de la CSH, élément primordial de la restauration hémato-poïétique. Ce point pourrait être étudié par des techniques histologiques visant à détecter les différentes populations cellulaires au niveau de la moelle osseuse irradiée dans un modèle murin. De plus, les effets biologiques négatifs à long terme de notre traitement peuvent également constituer une limite. Bien

---

que notre modèle propose un système où la présence des ASC et l'expression de la protéine Shh sont transitoires, ces deux paramètres peuvent aboutir à un processus de cancérisation (Karnoub AE et al, 2007, (Dormoy V et al, 2009).

Ces limites concernant des effets stochastiques à long terme ne doivent pourtant pas mettre en doute la nécessité de traiter les effets déterministes précoces qui mettent directement en péril le pronostic vital. Dans le cas de notre étude, la balance risque-bénéfice va dans le sens d'une nette amélioration du statut clinique des animaux traités.

## **II. Perspectives.**

Bien que notre protocole de thérapie cellulaire ait permis d'améliorer la reconstitution hématopoïétique dans notre modèle de macaque irradié à 8 Gy, il serait intéressant de vérifier si une synergie entre notre protocole de greffe et une cytokinothérapie n'apporterait pas un gain substantiel sur la durée de diminution des constantes sanguines, l'aplasie médullaire ou le profil clinique des animaux. De plus nous pourrions étudier l'efficacité de notre traitement sur des animaux irradiés à plus forte dose (10 Gy) pour déterminer s'il améliore également la restauration hématopoïétique et la survie. L'analyse histologique de différents organes tels que ceux du système digestif nous permettrait également d'avoir un aperçu de l'effet de notre traitement sur le syndrome gastro-intestinal et sur le MOF.

Afin de décrypter plus en profondeur les mécanismes moléculaires mis en jeu dans les différents acteurs cellulaires de la niche hématopoïétique, une étude du transcriptome des CSM et des CSH CD34<sup>+</sup> par une technique de microarrays a été débuté au laboratoire. Cette étude devrait permettre de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques du SAI.

Notre protocole de greffe d'ASC manipulées ouvre le champ à des perspectives pour le traitement d'autres pathologies radio-induites ou non. En effet, il a également été débuté au sein de l'unité une étude de traitement de la brûlure radiologique dans un modèle porcin visant à améliorer la régénération de la peau. La possibilité d'insertion dans notre vecteur cellulaire de différents plasmides codant d'autres protéines potentiellement thérapeutiques permettra de décliner notre étude

en se focalisant sur d'autres phénomènes que la régénération de la vascularisation (**tableau 12**). De plus, une technique de thérapie génique transitoire de répression de l'expression de gènes par des ARN interférents (SiRNA) a également été mise en place au laboratoire. La possibilité de surexprimer ou réprimer des gènes *in situ* constitue un atout pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans le SAI et proposer de nouveaux traitements.

Molécule	Action	Références
<b>SDF-1 alpha</b>	Rétention des CSH dans la niche; prolifération, différenciation des CSH et régénération de l'hématopoïèse. Promotion de l'angiogenèse.	(Landry Yfor et al, 2010), (Majka M et Ratajczak MZ, 2006)
<b>BMP-2, 4, 7.</b>	Régénération des ostéoblastes. Préservation du pool des CSH. Thrombopoïèse.	(Grassinger J et al, 2007), (Jeanpierre S et al, 2008), ( Park KH et al, 2009)
<b>Klotho</b>	Facteur pléiotrope agissant sur la sénescence, le stress oxydatif, et potentiellement sur les facteurs de croissance de l'hématopoïèse.	(Kuro-o M, 2008)
<b>Wnt10b</b>	Prolifération des CSH résiduelles.	(Kendra L et al, 2008)
<b>Hoxa3</b>	Activation de la néovascularisation, réduction de l'inflammation.	(Mahdipour E et al,2011)
<b>Nogo-B</b>	Revascularisation, homing des macrophages.	(Yu J et al, 2009)
<b>Connexine 43</b>	Interactions entre les cellules stromales de la niche et les CSH. Action positive sur la régénération de la niche hématopoïétique après un dommage.	(Presley CA et al, 2005), (Rosselló RA et al, 2009)

**Tableau 12:** *Candidats potentiels pour la mise en place d'une thérapie génique transitoire.*

## Valorisation du travail.

### Publications internationales

**SHORT-TERM SONIC HEDGEHOG GENE THERAPY MITIGATES MYELO SUPPRESSION IN HIGHLY IRRADIATED MONKEYS WITHOUT COMPROMISING LONG TERM HEMATOPOIESIS.**

DROUET M., GARRIGOU P., GRENIER N., BALLESTER B., RICCOBONO D., FORCHERON F., PEINNEQUIN A., AGAY D., HERODIN F. (*article en révision*)

**CYTOKINES IN COMBINATION TO TREAT RADIATION-INDUCED MYELOSUPPRESSION : EVALUATION OF SCF + GLYCOSYLATED EPO + PEGYLATED G-CSF AS AN EMERGENCY TREATMENT IN HIGHLY IRRADIATED MONKEYS.**

DROUET M., DELAUNAY C., GRENIER N., GARRIGOU P., MAYOL JF., HERODIN F.  
Haematologica. 2008 Mar;93(3):465-6.

### Posters

**SONIC HEDGEHOG TRANSIENT GENE THERAPY TO COUNTERACT RADIATION-INDUCED MYELOSUPPRESSION : DEVELOPMENT OF A NON HUMAN PRIMATE MODEL**

DROUET M., AGAY D., GARRIGOU P., FORCHERON F., BALLESTER B., GRENIER N., MAYOL J.F., HERODIN F.

Congrès de l'EBMT en 2010

**ADIPOSE TISSUE DERIVED STEM CELLS TO TREAT SEVERE CUTANEOUS RADIATION SYNDROME : PRELEMINARY STUDY IN RAT MODEL.**

AGAY D., GARRIGOU P., FORCHERON F., GRENIER N., TOUVARD L., CHANCERELLE Y., MEINEKE V., HERODIN F., DROUET M.

Congrès de l'EBMT en 2009

**ERYTHROPOIETIN IN COMBINATION WITH STEM CELL FACTOR, FLT3-LIGAND, THROMBOPOITIN AND INTERLEUKIN-3 PROMOTES SURVIVAL OF LETHALLY IRRADIATED MICE: A PLEIOTROPIC CYTOKINE TO MITIGATE RADIATION-INDUCED DAMAGES ?**

DROUET M., GARRIGOU P., COLLOMBET J.M., GRENIER N., DELAUNAY C., MAYOL J.F., HERODIN F.

Congrès de l'ISEH en 2008

### Communication orale

**MICROENVIRONNEMENT HEMATOPOIETIQUE ET IRRADIATION  
GARRIGOU P.**

Journées stéphanoises de cytométrie, 18 Juin 2009.

### Abstract 50<sup>e</sup> congrès de l'ASH

**IN VIVO INJECTION OF SYNTHETIC SMALL INTERFERING RNA TO LETHALLY IRRADIATED MICE AS A NEW MODEL TO STUDY APOPTOTIC PATHWAYS .**

DROUET M., GARRIGOU P., MAYOL J.F., DELAUNAY C., PEINNEQUIN A. and HERODIN F.  
Blood 2008 112(1) :482

## Index des illustrations.

Illustration 1: Part des différentes sources de radiations ionisantes naturelles et artificielles dans l'irradiation moyenne annuelle d'un individu. (source : <a href="http://installationsclassees.ecologie.gouv.fr">http://installationsclassees.ecologie.gouv.fr</a> ).	14
Illustration 2: Présentation de trois phases du SAI : Prodrome, phase de latence et phase clinique. Le décès probable des individus est indiqué par les zones noires. Illustration issue de (Young RW, 1987).	17
Illustration 3: Effets d'une irradiation corporelle totale à 3 Gy sur le système hématopoïétique (Cervený T J et al, 1989).	23
Illustration 4: Répartition de la moelle osseuse fonctionnelle dans le squelette d'un homme de 30 ans environ. Les zones d'hématopoïèse sont indiquées en gris foncé. D'après les données de Cristy (1981). Illustration issue de (Bertho JM, 2006).	24
Illustration 5: Représentation schématique de l'hématopoïèse. La CS hématopoïétique est capable de s'auto-renouveler et d'assurer la production des cellules matures et des éléments figurés du sang. A chaque stade est associé le test fonctionnel permettant de les identifier.	25
Illustration 6: La niche ostéoblastique et la niche vasculaire dans la moelle osseuse. La niche ostéoblastique permet de maintenir quiescentes les CSH et leur permet ainsi de conserver leur immaturité. Seuls quelques ostéoblastes (en vert) ont la capacité de former une niche pour les CSH. La niche vasculaire participe à la migration transendothéliale des CSH (lors de la mobilisation ou de la re-médullarisation) et favorise leur prolifération et leur différenciation. (Yin T et Li L, 2006).	31
Illustration 7: Niches hématopoïétiques et ostéoblastiques. Fonctions et mobilité des CSH en fonction du gradient de SDF-1.	32
Illustration 8: Potentialité de différenciation des CSM.	42
Illustration 9: Phénomènes inductifs et conséquences de la sénescence cellulaire. D'après (Judith Campisi et Fabrizio d'Adda di Fagagna, 2007).	50
Illustration 10: Voie de signalisation de Sonic Hedgehog permettant l'activation de la transcription par l'intermédiaire du facteur Gli.	63
Illustration 11: Amorces utilisées pour le clonage du gène humain Sonic Hedgehog.	71
Illustration 12: Carte du plasmide commercial pDRIVE.	73
Illustration 13: Carte du plasmide commercial pIRES2-eGFP et séquence du site multiple de clonage.	74
Illustration 14: Protocole d'extraction de plasmide à partir de culture bactérienne. ( <a href="http://www.qiagen.com">http://www.qiagen.com</a> ).	77
Illustration 15: Séparation des ASC issue de la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux (Brayfield C et al, 2010).	78
Illustration 16: Macaque rhésus. ( <i>Macaca mulatta</i> ).	87
Illustration 17: Macaque cynomolgus. ( <i>Macaca fascicularis</i> ).	87
Illustration 18: CFU-endothéliale observée au microscope optique inversé (x40). Marquage au cristal violet.	90
Illustration 19: Courbes de radiosensibilité des HPP-ECFC en fonction de la concentration en oxygène lors de la culture. En jaune 20% O <sub>2</sub> , bleu 5% et vert 1% (n=3).	91
Illustration 20: Courbes de radiosensibilité des CSM en fonction de la concentration en oxygène lors de la culture. En jaune 20% O <sub>2</sub> , bleu 5% et vert 1% (n=4).	92
Illustration 21: Taux de CSM apoptotiques en fonction de l'irradiation. Marquage FLICA révélé en cytométrie en flux.	93
Illustration 22: Proportion de cellules sénescents dans des cultures de CSM irradiées à 2,5 Gy (en	

gris) par rapport aux cellules non irradiées (n=4 pour les deux groupes, p<0,01).....	94
Illustration 23: Phénotypage des ASC par cytométrie en flux. Les courbes épaisses correspondent à l'anticorps spécifique et les courbes fines au contrôle isotypique. A. Marquage CD45. B. Marquage CD31. C. Marquage CD90. D. Marquage CD44.....	96
Illustration 24: Révélations immunocytochimiques de la différenciation des ASC.....	97
Illustration 25: Taux de transfection (en %) moyen des ASC observé à J1 après transfection (en noir) et J5 après transfection (en gris). (n=3, * = p<0,05).....	99
Illustration 26: Western Blot de détection de la protéine Shh dans le Cytosol et le milieu de culture des ASC transfectées.....	99
Illustration 27: CSM issues d'un prélèvement de moelle osseuse 3 jours après greffe. A gauche en fond clair, à droite détection de la fluorescence de l'eGFP dans le canal du FITC.....	100
Illustration 28: Courbes de radiosensibilité des CSM transfectées. En rouge, CSM transfectées avec le plasmide pIRES-2-Shh-eGFP. En noir, CSM transfectées avec le pIRES-2-eGFP commercial..	103
Illustration 29: Taux d'amplification de cellules CD34+ humaines sur un stroma d'ASC (en gris) et d'ASC transfectées avec le pIRES-2-Shh-eGFP (en noir). Aucune différence significative n'est observée (n = 5 pour le groupe ASC, n=4 pour le groupe ASC-Shh).....	104
Illustration 30: Cellules en clusters sur un stroma d'ASC.....	105
Illustration 31: Pourcentages d'expression en cytométrie en flux des marqueurs CD34 et CD41 par des CSH humaines après 10 jours de culture sur un stroma cellulaire.(n = 4 pour le groupe ASC-Shh et n = 5 pour les autres groupes).....	105
Illustration 32:.....	106
Illustration 33: Concentration en hémoglobine dans les différents types d'implants de Matrigel™. n=9 pour les groupes ASC seules et ASC-Shh. p<0.01.....	107
Illustration 34: Évolution de la numération en polynucléaires neutrophiles au cours du temps en échelle semi-logarithmique.....	109
Illustration 35: Évolution de la numération plaquettaire au cours du temps en échelle semi-logarithmique .	110

## Index des tables

Tableau 1: Évolution clinique d'un individu en fonction de la dose de radiations ionisantes reçue en irradiation corporelle totale (en rose, effets pour des doses dites infracliniques).....	20
Tableau 2: Atteintes morphologiques et fonctionnelles en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les fonctions hématopoïétique, gastro-intestinale et neurologique.....	21
Tableau 3: Marqueurs antigéniques utilisés pour la discrimination des CSM en cytométrie en flux.....	40
Tableau 4: Chimiokines et récepteurs associés exprimés par les CSM.....	41
Tableau 5: Cinétique d'expression des marqueurs de surface des EPC.....	43
Tableau 6: Tableau récapitulatif des cytokines sécrétées par les ASC.....	58
Tableau 7: Récapitulatif des greffes.....	87
Tableau 8: Pourcentages de CSM présentes dans chaque phase du cycle cellulaire en fonction de l'irradiation. Etude réalisée en cytométrie en flux par marquage à l'iodure de propidium.....	95
Tableau 9: Paramètres hématologiques des macaques irradiés à 8 Gy gamma par une source de <sup>60</sup> Co. Cohorte pour les deux groupes; n=4 pour le groupe greffé avec les cellules manipulées Sonic Hedgehog (Shh) et n=8 pour le groupe contrôle. * =Significativité statistique p< 0,05 entre les contrôles et les traités.....	111
Tableau 10: Aires sous la courbe pour les éléments figurés totaux (WBC), ANCs, Les lymphocytes	

---

(Lys), les plaquettes (PLTs), et les globules rouges (RBCs) pour les macaques contrôles et greffés avec les cellules Shh. Les valeurs présentent les moyennes + écart-type. Valeurs cumulées exprimées en unités arbitraires basés sur un calcul trapézoïdal. $P < 0.05$ . *=Significativement différent des valeurs contrôles.....	112
Tableau 11: Activité clonogénique de la moelle osseuse exprimée en CFU pour 105 cellules mononucléées ensemencées. Les valeurs présentent les moyennes + écart-type. ND: non déterminé. Significativité statistique ( $P < 0.05$ ) entre le groupe greffé et le groupe contrôle (*), entre les valeurs pré-irradiation et J1 (**), entre les valeurs pré-irradiation et J180 (***), entre les valeurs pré-irradiation et J1 / J42 / J180 (\$)......	113
Tableau 12: Candidats potentiels pour la mise en place d'une thérapie génique transitoire.....	123



# Bibliographie.



---

# Bibliographie

- Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, Tejada R, Liao F, Shido K, Jin DK, Dias S, Zhang F, Hartman TE, Hackett NR, Crystal RG, Witte L, Hicklin DJ, Bohlen P, Eaton D, Lyden D, de Sauvage F, Rafii S. ( ), *Nat Med* 10:64-71
- Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Mesenchymal stem cells and the artery wall. (2004), *Circ Res* 95:671-676
- Amos PJ, Shang H, Bailey AM, Taylor A, Katz AJ, Peirce SM. The role of human adipose-derived stromal cells in inflammatory microvascular remodeling and evidence of a perivascular phenotype. (2008), *Stem Cells* 26:2682-2690
- Andrews RG, Briddell RA, Hill R, Gough M, McNiece IK. Engraftment of primates with G-CSF mobilized peripheral blood CD34+ progenitor cells expanded in G-CSF, SCF and MGFDF decreases the duration and severity of neutropenia. (1999), *Stem Cells* 17:210-218
- Antoniou ES, Sund S, Homsy EN, Challenger LF, Rameshwar P. A theoretical simulation of hematopoietic stem cells during oxygen fluctuations: prediction of bonemarrow responses during hemorrhagic shock. (2004), *Shock* 22:15-422
- Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bonemarrow niche. (2004), *Cell* 118:149-161
- Arrigoni E, Lopa S, de Girolamo L, Stanco D, Brini AT. Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells: from small to large animal models. (2009), *Cell Tissue Res* 338:401-411
- Badillo AT, Redden RA, Zhang L, Doolin EJ, Liechty KW. Treatment of diabetic wounds with fetal murine mesenchymal stromal cells enhances wound closure. (2007), *Cell Tissue Res* 329:301-311
- Bai X, Alt E. Myocardial regeneration potential of adipose tissue-derived stem cells. (2010), *Biochem Biophys Res Commun* 401:321-326
- Baranov AE, Selidovkin GD, Butturini A, Gale RP. Hematopoietic recovery after 10-Gy acute total body radiation. (1994), *Blood* 83:596-599
- Becker AJ, Mc CE, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. (1963), *Nature* 197:452-454
- Bergonié J and L Tribondeau. De quelques résultats de la radiothérapie et essai de fixation d'une technique rationnelle (1906), *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences* 143:983-985
- Bertho JM, Frick J, Prat M, Demarquay C, Dudoignon N, Trompier F, Gorin NC, Thierry D, Gourmelon P. Comparison of autologous cell therapy and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) injection vs. G-CSF injection alone for the treatment of acute radiation syndrome in a non-human primate model. (2005), *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 63:911-920
- Bertho JM. Le syndrome hématopoïétique induit par une irradiation accidentelle : évaluation et traitements possibles (2006), *Radioprotection* 41:215-227
- 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. (2001), *Nat Immunol* 2:172-180

- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. (2001), *Stem Cells* 19:180-192
- Bissell MJ, Radisky DC, Rizki A, Weaver VM, Petersen OW. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. (2002), *Differentiation* 70:537-546
- Blanton MW, Hadad I, Johnstone BH, Mund JA, Rogers PI, Eppley BL, March KL. Adipose stromal cells and platelet-rich plasma therapies synergistically increase revascularization during wound healing. (2009), *Plast Reconstr Surg* 123(Suppl 2):56S-64S
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. (1998), *Science* 279:349-352
- Bradley TR, Hodgson GS. Detection of primitive macrophage progenitor cells in mouse bone marrow. (1979), *Blood* 54:1446-1450
- Brayfield C, Marra K, Rubin JP. Adipose stem cells for soft tissue regeneration. (2010), *Handchir Mikrochir Plast Chir* 42:124-128
- Brighton CT, Lorich DG, Kupcha R, Reilly TM, Jones AR, Woodbury RA 2nd. The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. (1992), *Clin Orthop Relat Res* 275:287-299
- Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, Arny M, Thomas L, Boyse EA. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. (1989), *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:3828-3832
- Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Liang Z, Traktuev D, Cornetta K, Ingram DA, Rosen ED, March KL. Suppression of hepatocyte growth factor production impairs the ability of adipose-derived stem cells to promote ischemic tissue revascularization. (2007), *Stem Cells* 25:3234-3243
- Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringham FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. (2003), *Nature* 425:841-846
- Canfield AE, Doherty MJ, Wood AC, Farrington C, Ashton B, Begum N, Harvey B, Poole A, Grant ME, Boot-Handford RP. Role of pericytes in vascular calcification: a review. (2000), *Z Kardiol* 89(Suppl 2):II20-II27
- Caplan AL. Mesenchymal stem cells. (1991), *J Orthop Res* 9:641-650
- Caplan AL. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. (2007), *J Cell Physiol* 213:341-347
- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. (2004), *Oncogene* 23:2825-2837
- T. JAN CERVENY, THOMAS J. MacVITTIE, and ROBERT W. YOUNG. Medical Consequences of Nuclear Warfare, Chapter 2 (1989), Office of the Surgeon General Department of the Army, United States of America :19
- Chamoun Z, Mann RK, Nellen D, von Kessler DP, Bellotto M, Beachy PA, Basler K. Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal. (2001), *Science* 103:1181-1188
- Chen CW, Montelatici E, Crisan M, Corselli M, Huard J, Lazzari L, Péault B. Perivascular multi-lineage progenitor cells in human organs: regenerative units, cytokine sources or both? (2009), *Cytokine Growth Factor Rev* 20:429-434
- Cherubino M, Marra KG. Adipose-derived stem cells for soft tissue reconstruction. (2009), *Regen Med* 4:109-117

- Chinchilla P, Xiao L, Kazanietz MG, Riobo NA. Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways. (2010), *Cell Cycle* 9:570-779
- Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. Modeling pO(2) distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. (2001), *Biophys J* 81:685-696
- Chute JP, Muramoto GG, Salter AB. Transplantation of vascular endothelial cells mediate the hematopoietic recovery and survival of lethally irradiated mice. (2007), *Blood* 109:2365-2372
- Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. (2008), *Cell Stem Cell* 3:301-313
- D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA, Schiller PC. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. (2004), *J Cell Sci* 117:1193-1198
- da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. (2008), *Stem Cells* 26:2287-2299
- Dainiak N et Ricks RC. The evolving role of haematopoietic cell transplantation in radiation injury: potentials and limitations. (2005), *BJR* 27:169-174
- Daldrup HE, Link TM, Blasius S, Strozzyk A, Könemann S, Jürgens H, Rummeny EJ. Monitoring radiation-induced changes in bone marrow histopathology with ultra-small superparamagnetic iron oxide (USPIO)-enhanced MRI. (1999), *J Magn Reson Imaging* 9:643-652
- de Revel T, Gourmelon P, Vidal D, Renaudeau C. Menace terroriste approche médicale (2005), Ouvrage paru chez John Libbey Eurotext :77
- Dewey WC, Ling CC, Meyn RE. Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. (1995), *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 33:781-796
- Dohle E, Fuchs S, Kolbe M, Hofmann A, Schmidt H, Kirkpatrick CJ. Sonic hedgehog promotes angiogenesis and osteogenesis in a coculture system consisting of primary osteoblasts and outgrowth endothelial cells. (2010), *Tissue Eng Part A* 4:1235-1237
- Dominici M, Rasini V, Bussolari R, Chen X, Hofmann TJ, Spano C, Bernabei D, Veronesi E, Bertoni F, Paolucci P, Conte P, Horwitz EM. Restoration and reversible expansion of the osteoblastic hematopoietic stem cell niche after marrow radioablation. (2009), *Blood* 114:2333-2343
- Dormoy V, Danilin S, Lindner V, Thomas L, Rothhut S, Coquard C, Helwig JJ, Jacqmin D, Lang H, Massfelder T. The sonic hedgehog signaling pathway is reactivated in human renal cell carcinoma and plays orchestral role in tumor growth. (2009), *Mol Cancer* 16:123
- Drouet M, Mourcin F, Grenier N, Delaunay C, Mayol JF, Lataillade JJ, Peinnequin A, Hérodin F. Mesenchymal stem cells rescue CD34+ cells from radiation-induced apoptosis and sustain hematopoietic reconstitution after coculture and cografing in lethally irradiated baboons: is autologous stem cell therapy in nuclear accident settings hype or reality? (2005), *Bone Marrow Transplant* 35:1201-1209
- Drouet M, Mourcin F, Grenier N, Leroux V, Denis J, Mayol JF, Thullier P, Lataillade JJ, Hérodin F. Single administration of stem cell factor, FLT-3 ligand, megakaryocyte growth and development factor, and interleukin-3 in combination soon after irradiation prevents

- nonhuman primates from myelosuppression: long-term follow-up of hematopoiesis. (2004), *Blood* 103:878-885
- Drouet M, Mathieu J, Grenier N, Multon E, Sotto JJ, Herodin F. The reduction of in vitro radiation-induced Fas-related apoptosis in CD34+ progenitor cells by SCF, FLT-3 ligand, TPO, and IL-3 in combination resulted in CD34+ cell proliferation and differentiation. (1999), *Stem Cells* 17:273-285
- Drouet M, Mourcin F, Grenier N, Delaunay C, Mayol JF, Lataillade JJ, Peinnequin A, Hérodin F. Mesenchymal stem cells rescue CD34+ cells from radiation-induced apoptosis and sustain hematopoietic reconstitution after coculture and cograftering in lethally irradiated baboons: is autologous stem cell therapy in nuclear accident settings hype or reality? (2005), *Bone Marrow Transplant* 35:1201-1209
- Ebrahimian TG, Pouzoulet F, Squiban C, Buard V, André M, Cousin B, Gourmelon P, Benderitter M, Casteilla L, Tamarat R. Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. (2009), *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:503-510
- Fauser AA, Messner HA. Granuloerythropoietic colonies in human bone marrow, peripheral blood, and cord blood. (1978), *Blood* 52:1243-1248
- Flüry-Herard A. Dosirnétrie hématologique. (1991), *Radioprotection* 26:159-170
- Ford CE, Hamerton JL, Barnes DW, Loutit JF. Cytological identification of radiation chimaeras. (1956), *Nature* 177:452-454
- Fortunel NO, Otu HH, Ng HH, Chen J, Mu X, Chevassut T, Li X, Joseph M, Bailey C, Hatzfeld JA, Hatzfeld A, Usta F, Vega VB, Long PM, Libermann TA, Lim B. Comment on " 'Stemness': transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells" and "a stem cell molecular signature". (2003), *Science* 302:393
- Frerich B, Kurtz-Hoffmann J, Lindemann N. Influence of growth hormone on maintenance of capillary-like structures in an in vitro model of stromal vascular tissue — results from morphometric analysis. (2005), *Artif Organs* 29:338-341
- Friedenstein A, Kuralesova AI. Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimeras. (1971), *Transplantation*. 12:99-108
- Fujii T, Kuwano H. Regulation of the expression balance of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 by Shh and FGF-2. (2010), *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 46:487-491
- Gage FH. Mammalian neural stem cells. (2000), *Science* 287:1433-1438
- Gale RP. Fetal liver transplants. (1992), *Bone Marrow Transplant* 9 Suppl 1:118-120
- Gerber HP, Malik AK, Solar GP, Sherman D, Liang XH, Meng G, Hong K, Marsters JC, Ferrara N. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. (2002), *Nature* 417:954-958
- Gomei Y, Nakamura Y, Yoshihara H, Hosokawa K, Iwasaki H, Suda T, Arai F. Functional differences between two Tie2 ligands, angiopoietin-1 and -2, in regulation of adult bone marrow hematopoietic stem cells. (2010), *Exp Hematol* 38:82-89
- Gothot A, Pyatt R, McMahl J, Rice S, Srour EF. Functional heterogeneity of human CD34(+) cells isolated in subcompartments of the G0 /G1 phase of the cell cycle. (1997), *Blood* 90:4384-4393
- Gothot A, van der Loo JC, Clapp DW, Srour EF. Cell cycle-related changes in repopulating capacity of human mobilized peripheral blood CD34(+) cells in nonobese diabetic/severe combined immune-deficient mice. (1998), *Blood* 92:2641-2649
- Graf L, Heimfeld S, Torok-Storb B. Comparison of gene expression in CD34+ cells from bone marrow and G-CSF-mobilized peripheral blood by high-density oligonucleotide array

- analysis. (), *Biol Blood Marrow Transplant* 7:486-194
- Greenberger JS, Epperly M. Bone marrow-derived stem cells and radiation response. (2009), *Semin Radiat Oncol* 19:133-139
- Guo Y, Lubbert M, Engelhardt M. CD34(-) Hematopoietic Stem Cells: Current Concepts and Controversies. (2003), *Stem Cells* 21:15-20
- Harandi OF, Hedge S, Wu DC, McKeone D, Paulson RF. Murine erythroid short-term radioprotection requires a BMP4-dependent, self-renewing population of stress erythroid progenitors. (2010), *J Clin Invest* 120:4507-4519
- Hattori K, Heissig B, Rafii S. The regulation of hematopoietic stem cell and progenitor mobilization by chemokine SDF-1. (2003), *Leuk Lymphoma* 44:575-582
- Hatzfeld J, Li ML, Brown EL, Sookdeo H, Levesque JP, O'Toole T, Gurney C, Clark SC, Hatzfeld A. Release of early human hematopoietic progenitors from quiescence by antisense transforming growth factor beta 1 or Rb oligonucleotides. (1991), *J Exp Med* 174:925-929
- Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. (1961), *Exp Cell Res* 25:585-621
- Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. (2002), *Cell* 109:625-637
- Hermitte F, Brunet de la Grange P, Belloc F, Praloran V, Ivanovic Z. Very Low O<sub>2</sub> Concentration (0.1%) Favors G<sub>0</sub> Return of Dividing CD34+ Cells. (2006), *Stem Cells* 24:65-73
- Herodin F, Mestries JC, Janodet D, Martin S, Mathieu J, Gascon MP, Pernin MO, Ythier A. Recombinant glycosylated human interleukin-6 accelerates peripheral blood platelet count recovery in radiation-induced bone marrow depression in baboons. (1992), *Blood* 80:688-695
- Hilfiker A, Kasper C, Hass R, Haverich A. Mesenchymal stem cells and progenitor cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: is there a future for transplantation? (2011), *Langenbecks Arch Surg* 396:489-497
- Hillyer CD, Wells SJ. Alternative sources of hematopoietic stem cells for bone marrow transplantation and rescue. (1993), *J Hematother* 2:91-499
- Himburg HA, Muramoto GG, Daher P. Pleiotrophin regulates the expansion and regeneration of hematopoietic stem cells. (2010), *Nat Med* 16:475-483
- Hofman I, Stover EH, Cullen DE. Hedgehog signaling is dispensable for adult murine hematopoietic stem cell function and hematopoiesis. (2009), *Cell stem cell* 4:559-567
- Hooper AT, Butler JM, Nolan DJ, Kranz A, Iida K, Kobayashi M, Kopp HG, Shido K, Petit I, Yanger K, James D, Witte L, Zhu Z, Wu Y, Pytowski B, Rosenwaks Z, Mittal V, Sato TN, Rafii S. Engraftment and reconstitution of hematopoiesis is dependent on VEGFR2-mediated regeneration of sinusoidal endothelial cells. (2009), *Cell Stem Cell* 4:263-274
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. (1995), *J Clin Invest* 95:2409-2415
- Hwang JH, Shim SS, Seok OS, Lee HY, Woo SK, Kim BH, Song HR, Lee JK, Park YK. Comparison of cytokine expression in mesenchymal stem cells from human placenta, cord blood, and bone marrow. (2009), *J Korean Med Sci* 24:547-554
- Ingham PW. Hedgehog signaling: a tale of two lipids. (2001), *Science* 294:1879-1881
- Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR. A stemcell molecular

- signature. (2002), *Science* 298:601-604
- Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, Bunnell BA. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. (2006), *J Cell Biochem* 99:1285-1297
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow (2002), *Nature* 418:41-49
- Jie Ma, Mingxia Shi, Jing Li, Bin Chen, Honglan Wang, Bingzong Li, Jianli Hu, Ying Cao, Baijun Fang, Robert Chunhua Zhao. Senescence-unrelated impediment of osteogenesis from Flk1+ bone marrow mesenchymal stem cells induced by total body irradiation and its contribution to long-term bone and hematopoietic injury (2007), *Haematologica* 92:889-896
- Judith Campisi, Fabrizio d'Adda di Fagagna. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. (2007), *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8:729-740
- Kaiser S, Hackanson B, Follo M, Mehlhorn A, Geiger K, Ihorst G, Kapp U. BM cells giving rise to MSC in culture have a heterogeneous CD34 and CD45 phenotype. (2007), *Cytherapy* 9:439-450
- Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. (2007), *Nature* 449:557-563
- Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, Frenette PS. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. (2006), *Cell* 124:261-271
- Kilroy GE, Foster SJ, Wu X, Ruiz J, Sherwood S, Heifetz A, Ludlow JW, Stricker DM, Potiny S, Green P, Halvorsen YD, Cheatham B, Storms RW, Gimble JM. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors (2007), *J Cell Physiol* 212:702-709
- Kim WS, Park BS, Sung JH, Yang JM, Park SB, Kwak SJ, Park JS. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. (2007), *J Dermatol Sci* 48:15-24
- Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Muller HW, Zanjani E, Wernet P. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. (2004), *J Exp Med* 200:123-135
- Konchalovsky MV, Baranov AE, Kolganov AV. Multiple organ involvement and failure: selected Russian radiation accident cases re-visited. (2005), *BJR Suppl* 27:26-29
- Land H, Parada LF, Weinberg RA. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. (1998), *Nature* 304:596-602
- Lange C, Brunswig-Spickenheier B, Cappallo-Obermann H, Eggert K, Gehling UM, Rudolph C, Schlegelberger B, Cornils K, Zustin J, Spiess AN, Zander AR. Radiation rescue: mesenchymal stromal cells protect from lethal irradiation. (2011), *PLoS One* 6:e14486
- Laver J, Ebell W, Castro-Malaspina H. Radiobiological properties of the human hematopoietic microenvironment: contrasting sensitivities of proliferative capacity and hematopoietic function to in vitro irradiation. (1986), *Blood* 67:1090-1097
- Lawson DA, Xin L, Lukacs RU, Cheng D, Witte ON. Isolation and functional characterization of

- murine prostate stem cells. (2007), *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:181-186
- Leary AG, Ogawa M. Blast cell colony assay for umbilical cord blood and adult bone marrow progenitors. (1987), *Blood* 69:953-956
- Lee EY, Xia Y, Kim WS, Kim MH, Kim TH, Kim KJ, Park BS, Sung JH. Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. (2009), *Wound Repair Regen* 17:540-547
- Lendeckel S, Jödicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, Fraser JK, Hedrick MH, Berthold L, Howaldt HP. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. (2004), *J Craniomaxillofac Surg* 32:370-373
- Lin G, Garcia M, Ning H, Banie L, Guo YL, Lue TF, Lin CS. . Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. (2008), *Stem Cells Dev* 17:1053-1063
- Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. (2009), *J Cell Biochem* 106:984-991
- Lorens HP, Longaker MT. Wound healing: repair biology and wound and scar treatment. (2006), *Plastic Surgery*, 2nd ed Mathes SJ (ed.):209-232
- Ma J, Shi M, Li J, Chen B, Wang H, Li B, Hu J, Cao Y, Fang B, Zhao RC. Senescence-unrelated impediment of osteogenesis from Flk1+ bone marrow mesenchymal stem cells induced by total body irradiation and its contribution to long-term bone and hematopoietic injury. (2007), *Haematologica* 92:889-896
- Mac Vittie TJ et Farese AM. Radiation toxicology, bone marrow and leukemia (1995), J.H. et B.I. Lords, Eds :141-193
- MacVittie TJ. Cytokines in the Treatment of Radiation Injury (2011), *RadiationCountermeasuresSymposium 50th anniversary AFRRRI*:
- Mahmud N, Pang W, Cobbs C. Studies of the route of administration and role of conditioning with radiation on unrelated allogeneic mismatched mesenchymal stem cell engraftment in a non human primate model. (2004), *Exp hematol* 32:494-501
- Mathé G, Amiel J-L, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M. Haematopoietic chimera in man after allogeneic (homologous) bone-marrow transplantation : control of the secondary syndrome, specific tolerance due to the chimerism. (1963), *British Medical Journal* 28:1633-1635
- Ménard C, Tarte K. [Immunosuppression and mesenchymal stem cells: back to the future.] (2001), *Med Sci (Paris)* 27:269-274
- Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. (2010), *Nature* 466:829-834
- Merritt AJ, Allen TD, Potten CS, Hickman JA. Apoptosis in small intestinal epithelial from p53-null mice: evidence for a delayed, p53-independent G2/M-associated cell death after gamma-irradiation. (1997), *Oncogene* 14:2759-2766
- Mimeault M, Hauke R, Batra SK. Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. (2007), *Clin Pharmacol Ther* 82:252-264
- Minn KW, Min KH, Chang H, Kim S, Heo EJ. Effects of fat preparation methods on the viabilities of autologous fat grafts. (2010), *Epub* 34:626-631
- Mole RH. The LD50 for uniform low LET irradiation of man. (1984), *Br J Radiol* 57:355-369
- Monti P, Wysocki J, van der Meeren A, Griffiths NM. The contribution of radiation-induced injury to the gastrointestinal tract in the development of multi-organ dysfunction syndrome or failure. (2005), *BJR Suppl* 27:89-94

- Mourcin F, Grenier N, Mayol JF, Lataillade JJ, Sotto JJ, Hérodin F, Drouet M. Mesenchymal stem cells support expansion of in vitro irradiated CD34(+) cells in the presence of SCF, FLT3 ligand, TPO and IL3: potential application to autologous cell therapy in accidentally irradiated victims. (2005), *Radiat Res* 164:1-9
- Müller-Ehmsen J, Krausgrill B, Burst V, Schenk K, Neisen UC, Fries JW, Fleischmann BK, Hescheler J, Schwinger RH. Effective engraftment but poor mid-term persistence of mononuclear and mesenchymal bone marrow cells in acute and chronic rat myocardial infarction. (2006), *J Mol Cell Cardiol* 41:876-884
- Muramoto GG, Chen B, Chao NJ, Chute JP. Vascular endothelial cells produce soluble factor that mediate the recovery of human hematopoietic stem cells after radiation injury. (2006), *Biol Blood Marrow Transplant* 12:530-540
- Murphy M, Bartlett PF. Molecular regulation of neural crest development. (1993), *Mol Neurobiol* 7:11-135
- Musina RA, Bekchanova ES, Sukhikh GT. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. (2005), *Bull Exp Biol Med* 139:504-509
- Nagy K, Sung HK, Zhang P, Laflamme S, Vincent P, Agha-Mohammadi S, Woltjen K, Monetti C, Michael IP, Smith LC, Nagy A. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Equine Fibroblasts (2011), *Stem Cell Rev Online*:
- Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA. Spatial localization of transplantedhemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. (2001), *Blood* 97:2293-2299
- Norol F, Drouet M, Debili N, Vainchenker W, Herodin F. [Ex-vivo expansion of hematopoietic stem cells: study in the primate model]. (1999), *Hematol Cell Ther* 41:75-77
- Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. (2005), *Cell* 121:335-348
- Palis J, Yoder MC. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. (2001), *Exp Hematol* 29:927-936
- Pepinsky RB, Zeng C, Wen D, Rayhorn P, Baker DP, Williams KP, Bixler SA, Ambrose CM, Garber EA, Miatkowski K, Taylor FR, Wang EA, Galdes A. Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. (1998), *J Biol Chem.* 273:14037-14045
- Pevny L, Rao MS. The stem-cell menagerie. (2003), *Trends Neurosci* 26:351-359
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. (1999), *Science* 284:143-147
- Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Pénicaud L, Casteilla L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. (2004), *Circulation* 109:656-663
- Porter JA, von Kessler DP, Ekker SC, Young KE, Lee JJ, Moses K, Beachy PA. The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. (1995), *Nature* 374:363-366
- Porwol T, Ehleben W, Brand V, Acker H. Tissue oxygen sensor function of NADPHoxidase isoforms, an unusual cytochrome aa3 and reactive oxygen species. (2001), *Respir Physiol* 128:331-348
- Pupa SM, Menard S, Forti S, Tagliabue E. New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. (2002), *J Cell Physiol* 192:259-267

- Radford IR, Murphy TK, Radley JM, Ellis SL. Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part II. Apoptotic death is shown by all lines examined. (1994), *Int J Radiat Biol* 65:217-227
- Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, Heissig B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? (2002), *Nat Rev Cancer* 2:826-835
- Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem. (2002), *Science* 298:597-600
- Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. (2004), *Circulation* 109:1292-1298
- Reiffers J, Cailliot C, Dazey B, Attal M, Caraux J, Boiron JM. Abrogation of post-myeloablative chemotherapy neutropenia by ex-vivo expanded autologous CD34-positive cells. (1999), *Lancet* 354:1092-1093
- Renault MA, Roncalli J, Tongers J, Thorne T, Klyachko E, Misener S, Volpert OV, Mehta S, Burg A, Luedemann C, Qin G, Kishore R, Losordo DW. Sonic hedgehog induces angiogenesis via Rho kinase-dependent signaling in endothelial cells. (2010), *J Mol Cell Cardiol* 49:490-498
- Rigotti G, Marchi A, Galiè M, Baroni G, Benati D, Krampera M, Pasini A, Sbarbati A. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. (2007), *Plast Reconstr Surg* 119:1409-1422
- Rodríguez LV, Alfonso Z, Zhang R, Leung J, Wu B, Ignarro LJ.. Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells. (2006), *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12167-12172
- Romanov YA, Darevskaya AN, Merzlikina NV, Buravkova LB. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. (2005), *Bull Exp Biol Med* 140:138-143
- Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A. Spontaneous human adult stem cell transformation. (2005), *Cancer Res* 65:3035-3039
- Salter AB, Meadows SK, Muramoto GG, Himburg H, Doan P, Daher P, Russell L, Chen B, Chao NJ, Chute JP. Endothelial progenitor cell infusion induces hematopoietic stem cell reconstitution in vivo. (2009), *Blood* 113:2104-2017
- Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells—basic and clinical implications for novel cell-based therapies. (2007), *Stem Cells* 25:818-827
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. (1997), *Cell* 88:593-602
- Siggins SL, Nguyen NYN, McCormack M. The hedgehog receptor patched1 regulates myeloid and lymphoid progenitors by distinct cell-extrinsic mechanisms. (2009), *Blood* 114:995-1004
- Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. (1963), *J Cell Physiol* 62:327-336
- Smith PC, Hobisch A, Lin DL, Culig Z, Keller ET. Interleukin-6 and prostate cancer progression. (2001), *Cytokine Growth Factor Rev* 12:33-40
- Sugiyama T, Rodriguez RT, McLean GW, Kim SK. Conserved markers of fetal pancreatic epithelium permit prospective isolation of islet progenitor cells by FACS. (2007), *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:175-180

- Sun B, Roh KH, Park JR, Lee SR, Park SB, Jung JW, Kang SK, Lee YS, Kang KS. Therapeutic potential of mesenchymal stromal cells in a mouse breast cancer metastasis model. (2009), *Cytotherapy* 11:289-298
- Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. (2005), *Blood* 105:2631-2639
- Thorén LA, Liuba K, Bryder D, Nygren JM, Jensen CT, Qian H, Antonchuk J, Jacobsen SE. Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells (2008), *J Immunol* 15:2045-2053
- Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. (1961), *Radiat Res* 14:213-222
- Tintut Y, Alfonso Z, Saini T, Radcliff K, Watson K, Boström K, Demer LL. Multilineage potential of cells from the artery wall (2003), *Circulation* 108:2505-2510
- Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W, Pasqualini R, Johnstone BH, March KL. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. (2008), *Circ Res* 102:77-85
- Trowbridge JJ, Scott MP, Bhatia M. Hedgehog modulates cell cycle regulators in stem cells to control hematopoietic regeneration. (2006), *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:14134-14139
- Vaziri H, Benchimol S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. (1998), *Curr Biol* 8:279-282
- Verseijden F, Posthumus-van Sluijs SJ, van Neck JW, Hofer SO, Hovius SE, van Osch GJ. Vascularization of prevascularized and non-prevascularized fibrin-based human adipose tissue constructs after implantation in nude mice. (2011), *J Tissue Eng Regen Med* :
- Villinger F, Brar SS, Mayne A, Chikkala N, Ansari AA. Comparative sequence analysis of cytokine genes from human and nonhuman primates. (1995), *J Immunol* 15:3946-3954
- Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J, Aguila HL. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. (2004), *Blood* 103:3258-3264
- Marius Wernig, Alexander Meissner, Ruth Foreman, Tobias Brambrink, Manching Ku, Konrad Hochedlinger, Bradley E. Bernstein et Rudolf Jaenisch. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. (2007), *Nature* 448:318-324
- Yanagihara K, Nii M, Numoto M, Kamiya K, Tauchi H, Sawada S, Seito T. Radiation-induced apoptotic cell death in human gastric epithelial tumour cells; correlation between mitotic death and apoptosis. (1995), *Int J Radiat Biol* 67:677-685
- Yin T, Li L. The stem cell niches in bone (2006), *J Clin Invest* 116:1195-1201
- Young RW. *Military radiobiology* (1987), J.J.C Walker RL, editor :165-190
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. (2007), *Science* 318:1917-1920
- Zannettino AC, Paton S, Arthur A, Khor F, Itescu S, Gimble JM, Gronthos S. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. (2008), *J Cell Physiol* 214:413-421
- Zaragosi LE, Billon N, Ailhaud G, Dani C. Nucleofection is a valuable transfection method for transient and stable transgene expression in adipose tissue-derived stem cells. (2007), *Stem Cells* 25:790-797
- Zavros Y, Orr MA, Xiao C, Malinowska DH. Sonic hedgehog is associated with H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-containing membranes in gastric parietal cells and secreted with histamine stimulation. (2008), *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295:G99-G111

- 
- Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. (2003), *Nature* 425:836-841
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. (2001), *Tissue Eng* 7:221-228
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. (2002), *Mol Biol Cell* 13:4279-4295