

# Modulation par le cycle cellulaire de l'implantation des cellules souches hématopoïétiques

André Gothot  
Olivier Giet  
Sandra Huygen  
Yves Beguin

En état stationnaire, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) résident en majorité en phase  $G_0$  du cycle cellulaire. Leur progression mitotique peut être induite *in vitro* à l'aide de cytokines activatrices dans le but d'obtenir leur multiplication ou comme étape préparative au transfert génique par vecteur rétroviral. Par rapport aux CSH quiescentes, les CSH activées ont une capacité réduite à soutenir la récupération hématopoïétique d'un hôte conditionné. Ce phénomène n'est pas causé par un phénomène de différenciation irréversible mais est au contraire rythmé par le parcours du cycle cellulaire. En effet, la transplantabilité des CSH activées est ramenée à son niveau initial une fois le cycle cellulaire achevé ou après retrait des stimuli mitogènes. Nous présentons ici les arguments expérimentaux indiquant que l'activation mitotique des CSH et progéniteurs provoque une altération de leur capacité à s'implanter dans la moelle de l'hôte. En premier lieu, l'adhérence au stroma médullaire augmente lors de la progression de progéniteurs en phases actives du cycle. Plus particulièrement, l'adhérence à la fibronectine (Fn) de progéniteurs activés *ex vivo* est stimulée en phase S/ $G_2$ +M. Cette stimulation est réversible après terminaison du cycle. Des deux récepteurs cellulaires à la Fn, les intégrines VLA (very late antigen) -4 et VLA-5, les stimuli mitogènes induisent une inactivation fonctionnelle de VLA-4 et une augmentation de l'affinité de VLA-5. L'accroissement d'adhérence à la Fn est associée à une diminution de motilité cellulaire. Contrairement à la Fn, l'adhérence à VCAM (vascular cell adhesion molecule) -1, autre ligand essentiel du stroma médullaire, diminue de façon réversible lors du parcours du cycle. Enfin, on constate que les progéniteurs activés perdent leur capacité à répondre aux stimuli inhibiteurs déclenchés par l'engagement des récepteurs d'adhérence VLA-4 et PSGL (P-selectin glycoprotein ligand) -1. Des travaux ultérieurs devront préciser le rôle de ces phénomènes dans la transplantabilité inefficace des CSH activées et définir les moyens de surmonter ce qui peut constituer un obstacle majeur à la transplantation clinique de CSH multipliées *ex vivo*.

## ADRESSE

Fonds national de la recherche scientifique et université de Liège, Belgique. Laboratoire d'hématologie, CHU Sart-Tilman B35, 13, avenue de l'Hôpital, B-4000 Liège, Belgique.

**Mots clés :** cellules souches, transplantation, cycle cellulaire, intégrines.  
**Key words:** stem cells, transplantation, cell cycle, integrins.

## RÉFÉRENCES

1. Lemischka IR, Raulet DH, Mulligan RC. Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. *Cell* 1986; 45: 917-27.
2. Leemhuis T, Yoder MC, Grigsby S, Agüero B, Eder P, Srour EF. Isolation of primitive human bone marrow hematopoietic progenitor cells using Hoechst 33342 and Rhodamine 123. *Exp Hematol* 1996; 24: 1215-24.
3. Gothot A, Pyatt R, McMahl J, Rice S, Srour EF. Assessment of proliferative and colony-forming capacity after successive *in vitro* divisions of single human CD34<sup>+</sup> cells initially isolated in G<sub>0</sub>. *Exp Hematol* 1998; 26: 562-70.
4. Gothot A, Pyatt R, McMahl J, Rice S, Srour EF. Functional heterogeneity of human CD34<sup>+</sup> cells isolated in subcompartments of the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of the cell cycle. *Blood* 1997; 90: 4384-93.
5. Bradford GB, Williams B, Rossi R, Bertoncello I. Quiescence, cycling and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment. *Exp Hematol* 1997; 25: 445-53.
6. Uchida N, Frieria AM, He D, Reitsma MJ, Tsukamoto AS, Weissman IL. Hydroxyurea can be used to increase mouse c-kit<sup>+</sup>Thy-1<sup>+</sup>. 1(lo)Lin<sup>-</sup>/loSca-1(+) hematopoietic cell number and frequency in cell cycle *in vivo*. *Blood* 1997; 90: 4354-62.
7. Wilpshaar J, Bhatia M, Kanhai HH, Breese R, Heilman DK, Johnson CS, Falkenburg JH, Srour EF. Engraftment potential of human fetal hematopoietic cells in NOD/SCID mice is not restricted to mitotically quiescent cells. *Blood* 2002; 100: 120-7.
8. Fleming WH, Alpern EJ, Uchida N, Ikuta K, Spangrude GJ, Weissman IL. Functional heterogeneity is associated with the cell cycle status of murine hematopoietic stem cells. *J Cell Biol* 1993; 122: 897-902.
9. Orschiell-Traycoff CM, Hiatt K, Dagher RN, Rice S, Yoder MC, Srour EF. Homing and engraftment potential of Sca-1(+)lin(-) cells fractionated on the basis of adhesion molecule expression and position in cell cycle. *Blood* 2000; 96: 1380-7.
10. Peters SO, Kittler EL, Ramshaw HS, Quisenberry PJ. *Ex vivo* expansion of murine marrow cells with interleukin-3 (IL-3), IL-6, IL-11, and stem cell factor leads to impaired engraftment in irradiated hosts. *Blood* 1996; 87: 30-7.

La production des cellules sanguines et lymphoïdes est assurée par le processus de « succession clonale », c'est-à-dire par la prolifération d'une ou de quelques cellules souches hématopoïétiques (CSH) activées de façon séquentielle. Cette théorie a été confirmée expérimentalement à partir de l'observation de la régénération hématopoïétique dérivée de CSH transplantées à un receveur irradié et identifiable individuellement par des marqueurs génétiques transmissibles [1]. Il a été observé dans ces expériences, que de nombreux clones contribuaient à l'hématopoïèse durant une période initiale de régénération médullaire avant d'atteindre un état stationnaire correspondant à une reconstitution oligoclonale à partir d'un petit nombre de CSH. Un corollaire important de ces observations est que la majorité des CSH, à tout instant, est « dormante » et réside en phase G<sub>0</sub> du cycle cellulaire (figure 1). En effet, à partir d'une population hétérogène de cellules médullaires, les CSH peuvent être isolées sur la base de leur quiescence mitotique par fractionnement direct après coloration vitale à la rhodamine [2] ou à la pyronine Y (PY) [3]. Cette dernière coloration permet de mettre en évidence l'ARN cellulaire total et constitue donc un reflet de l'activité métabolique globale cellulaire. Par marquage simultané de l'ADN au Hoechst 33342, il est possible d'isoler au sein d'une population hétérogène de CSH et de progéniteurs exprimant l'antigène CD34, les cellules diploïdes faiblement marquées par la PY,

c'est-à-dire en phase G<sub>0</sub> du cycle cellulaire (figure 2). Comparativement aux cellules CD34<sup>+</sup> isolées en G<sub>1</sub>, les cellules G<sub>0</sub>CD34<sup>+</sup> sont caractérisées par une insensibilité relative aux stimuli mitogènes en culture, des capacités différenciatives et prolifératives les rapprochant de CSH ancestrales et enfin, le maintien de ces caractéristiques primitives après division cellulaire *ex vivo* [3, 4]. Il apparaît donc que les cellules hématopoïétiques sont ordonnées parallèlement selon leurs capacités fonctionnelles et leur degré de quiescence mitotique, les cellules les plus ancestrales étant les plus quiescentes. L'inactivité mitotique est toutefois relative, comme l'ont montré des travaux examinant le marquage *in vivo* de CSH à la bromodéoxyuridine (BrdU). La BrdU est administrée par voie orale et s'incorpore dans l'ADN durant la phase S du cycle cellulaire. La présence de BrdU, révélée par un anticorps spécifique, est donc un reflet du passage préalable de la cellule au travers du cycle cellulaire. Bradford *et al.* ont pu ainsi estimer que les CSH hématopoïétiques murines présentaient un temps de réplication moyen de 19j [5]. Comme dans leur grande majorité les CSH sont mitotiquement inactives à un temps d'observation donné, il semble donc qu'elles parcourent le cycle cellulaire de façon périodique puis retournent en G<sub>0</sub>. La période inter-cycle et par conséquent le nombre de cellules en cycle peuvent s'accroître de façon importante en réponse à une demande cellulaire accrue, par exemple après traitement myéloablatif [6] ou durant l'ontogénèse [7].

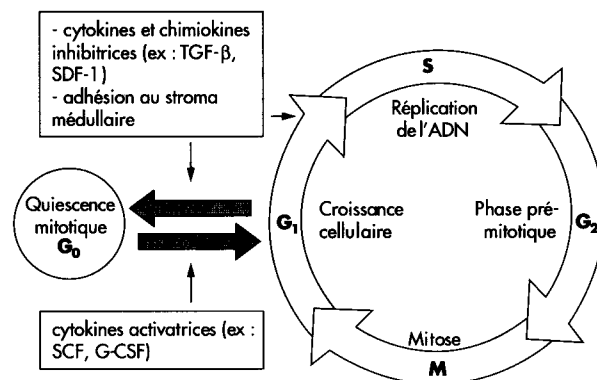


Figure 1. **Représentation du cycle cellulaire.**

Les principaux facteurs responsables des transitions G<sub>0</sub> → G<sub>1</sub> et G<sub>1</sub> → G<sub>0</sub> par les cellules souches sont indiqués. TGF-β: transforming growth factor-β; SDF-1: stromal-derived factor-1; SCF: stem cell factor; G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor.

## RÉFÉRENCES

11. Habibian HK, Peters SO, Hsieh CC, Wu J, Vergilis K, Grimaldi CI, Reilly J, Carlson JE, Frimberger AE, Stewart FM, Quesenberry PJ. The fluctuating phenotype of the lymphohematopoietic stem cell with cell cycle transit. *J Exp Med* 1998; 188: 393-8.
12. Takatoku M, Sellers S, Agricola BA, Metzger ME, Kato I, Donahue RE, Dunbar CE. Avoidance of stimulation improves engraftment of cultured and retrovirally transduced hematopoietic cells in primates. *J Clin Invest* 2001; 108: 447-55.
13. Glimm H, Oh IH, Eaves CJ. Human hematopoietic stem cells stimulated to proliferate *in vitro* lose engraftment potential during their S/G<sub>2</sub>/M transit and do not reenter G<sub>0</sub>. *Blood* 2000; 96: 4185-93.
14. Gothot A, van der Loo JCM, Clapp DW, Srour EF. Cell cycle-related changes in repopulating capacity of human mobilized peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells in NOD/SCID mice. *Blood* 1998; 92: 2641-9.
15. Quesenberry PJ, Colvin GA, Lambert JF. The chiaroscuro stem cell: a unified stem cell theory. *Blood* 2002; 100: 4266-71.
16. Mazo IB, Gutierrez-Ramos JC, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD, von Andrian UH. Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med* 1998; 188: 465-74.
17. Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, Petit I, Franitza S, Grabovsky V, Slav MM, Nagler A, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. The chemokine SDF-1 activates the integrins IFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34<sup>+</sup> cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* 2000; 95: 3289-96.
18. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 1999; 283: 845-8.
19. Williams DA, Rios M, Stephens C, Patel VP. Fibronectin and VLA-4 in hematopoietic stem cell-microenvironment interactions. *Nature* 1991; 352: 438-41.
20. Zanjani ED, Flake AW, Almeida-Porada G, Tran N, Papayannopoulou T. Homing of human cells in the fetal sheep model: modulation by antibodies activating or inhibiting very late activation antigen-4-dependent function. *Blood* 1999; 94: 2515-22.

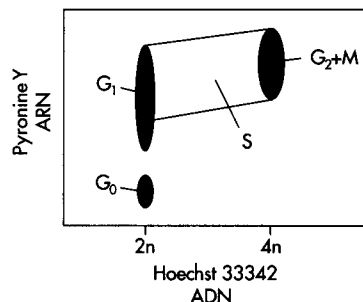


Figure 2. **Analyse bi-paramétrique du cycle cellulaire par cytométrie en flux.** Représentation schématique de cellules CD34<sup>+</sup> marquées au Hoechst 33342 et à la PY. On distingue parmi les cellules diploïdes les phases G<sub>0</sub> et G<sub>1</sub>, suivant la quantité d'ARN par cellule. Les phases S et G<sub>2</sub>+M sont caractérisées par l'accroissement de la quantité d'ADN cellulaire total.

Récemment, de nombreux travaux ont permis d'établir un lien entre les capacités reconstitutives de CSH transplantées chez un hôte irradié et leur position dans le cycle cellulaire. En particulier, en fractionnant des populations cellulaires enrichies en CSH par un colorant de l'ADN, le Hoechst 33342, il a été montré que les cellules résidant en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> possédaient des capacités régénératrices à long terme supérieures à celles de cellules isolées en S/G<sub>2</sub>+M [8, 9]. Les conclusions de telles observations doivent néanmoins être tempérées par le fait que dans des fractions de cellules isolées par phénotype et fonctionnellement hétérogènes, il est probable que les CSH les plus primitives résident plus fréquemment en phase inactive (G<sub>0</sub>) ou préparatoire (G<sub>1</sub>) du cycle cellulaire tandis que les progéniteurs plus différenciés auront un rythme de prolifération plus élevé et seront plus fréquemment en S/G<sub>2</sub>+M. Les travaux réalisés au laboratoire de P. Quesenberry ont permis de mieux établir un lien entre la mise en cycle de CSH murines et une diminution de leur transplantabilité. Cet effet était observé après stimulation des cellules médullaires *ex vivo* par des cytokines

activatrices [10]: le taux de chimérisme atteint après transplantation de CSH mitotiquement actives était nettement inférieur à celui observé après greffe d'un nombre similaire de cellules non stimulées. Cet effet n'était pas dû à la différenciation irréversible des CSH stimulées après division cellulaire: en examinant des cellules progressant de façon synchronisée dans le cycle cellulaire, ces mêmes auteurs ont observé que la capacité régénératrice diminuait lors du passage en phase S du cycle puis retournait à son niveau de départ après mitose et retour en phase G<sub>1</sub> du cycle suivant [11]. Ces observations ont été confirmées en montrant que la transplantabilité médiocre de CSH induites à proliférer pouvait être améliorée en les transférant préalablement dans des conditions favorisant leur retour en phase quiescente [12].

En ce qui concerne les CSH humaines, Glimm *et al.* ont pu montrer qu'au sein d'une population cellulaire proliférant de façon asynchrone et ayant exécuté de multiples divisions cellulaires *ex vivo*, l'activité hématopoïétique transplantable à la souris immuno-déficiente résidait exclusivement dans la fraction cellulaire résidant en G<sub>1</sub>, tandis que les cellules en répllication active en S/G<sub>2</sub>+M ne présentaient aucune activité régénératrice [13]. Enfin, nous avons montré que la progression de cellules CD34<sup>+</sup> isolées en phase G<sub>0</sub> et stimulées à progresser en phase G<sub>1</sub> du cycle cellulaire, et ce précédemment à toute division, menait à une perte de la capacité de ces cellules à repeupler la moelle de souris immuno-déficientes [14]. Ces dernières observations ainsi que celles d'Habibian *et al.* mettent en lumière des fluctuations fonctionnelles de cellules hématopoïétiques primitives lors du parcours d'un cycle cellulaire unique et intervenant même avant toute division cellulaire. Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliciter ces phénomènes. D'une part, il est envisageable que les CSH subissent une différenciation réversible en progéniteurs plus différenciés au cours du cycle cellulaire, en particulier en phase G<sub>1</sub> et S, avant de retrouver leurs propriétés fonctionnelles initiales au cours de la phase G<sub>1</sub> suivante. Il existe actuellement peu d'arguments expérimentaux pour soutenir l'existence de tels phénomènes [15]. D'autre part, l'interaction de CSH transplantées avec les cellules endothéliales et stromales médullaires de l'hôte

peut subir des variations rythmées par le parcours du cycle cellulaire. Nous présentons ci-après des arguments en faveur de cette dernière hypothèse.

la lumière des sinusoides médullaires pour circuler lentement à la surface des cellules endothéliales. Ce processus dépend des sélectines E et P, exprimées par les cellules endothéliales, lesquelles fixent les récepteurs ESL (*E-selectin ligand*) et PSGL (*P-selectin glycoprotein ligand*) -1 [16]. L'activation des CSH, dépendant entre autres de la chimiokine *stromal-derived factor-1* (SDF-1), aboutit à leur adhérence ferme et à leur immobilisation à la face luminale des cellules endothéliales, via les récepteurs VLA (*very late antigen*) -4 et LFA (*lymphocyte function-associated antigen*) -1 se fixant respectivement aux molécules d'adhérence VCAM (*vascular cell adhesion molecule*) -1 et ICAM (*intercellular cell adhesion molecule*) -1. La transmigration des CSH au travers de l'endothélium peut alors se

## RÉFÉRENCES

21. Papayannopoulou T, Nakamoto B. Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA4 integrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9374-8.
22. Levesque JP, Simmons PJ. Cytoskeleton and integrin-mediated adhesion signaling in human CD34<sup>+</sup> hemopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 1999; 27: 579-86.
23. Levesque JP, Leavesley DI, Niutta S, Vadas M, Simmons PJ. Cytokines increase human hematopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins. *J Exp Med* 1995; 181: 1805-15.
24. Giet O, Huygen S, Beguin Y, Gothot A. Cell cycle activation of hematopoietic progenitor cells increases very late antigen-5-mediated adhesion to fibronectin. *Exp Hematol* 2001; 29: 515-24.
25. Yamaguchi M, Ikebuchi K, Hirayama F, Sato N, Mogi Y, Ohkawara J, Yoshikawa Y, Sawada K, Koike T, Sekiguchi S. Different adhesive characteristics and VLA-4 expression of CD34<sup>+</sup> progenitors in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> versus S+G<sub>2</sub>/M phases of the cell cycle. *Blood* 1998; 92: 842-8.
26. DiMilla PA, Stone JA, Quinn JA, Albelda SM, Lauffenburger DA. Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength. *J Cell Biol* 1993; 122: 729-37.
27. Giet O, Van Bockstaele DR, Di Stefano I, Huygen S, Greimers R, Beguin Y, Gothot A. Increased binding and defective migration across fibronectin of cycling hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2002; 99: 2023-31.
28. Huygen S, Giet O, Artisien V, Di Stefano I, Beguin Y, Gothot A. Adhesion of synchronized human hematopoietic progenitor cells to fibronectin and vascular cell adhesion molecule-1 fluctuates reversibly during cell cycle transit in ex vivo culture. *Blood* 2002; 100: 2744-52.
29. Ramirez M, Segovia JC, Benet I, Arbona C, Guenechea G, Blaya C, Garcia-Conde J, Bueren JA, Prosper F. Ex vivo expansion of umbilical cord blood (UCB) CD34<sup>+</sup> cells alters the expression and function of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrins. *Br J Haematol* 2001; 115: 213-21.

Comme décrit initialement pour l'émigration tissulaire des leucocytes, l'implantation des CSH dans la moelle de l'hôte après transplantation se déroule en plusieurs étapes, chacune faisant intervenir des récepteurs spécifiques présentés à la surface des CSH et interagissant avec des ligands tissulaires, en l'occurrence ici médullaires (figure 3). Lors d'une première phase de margination, les CSH quittent

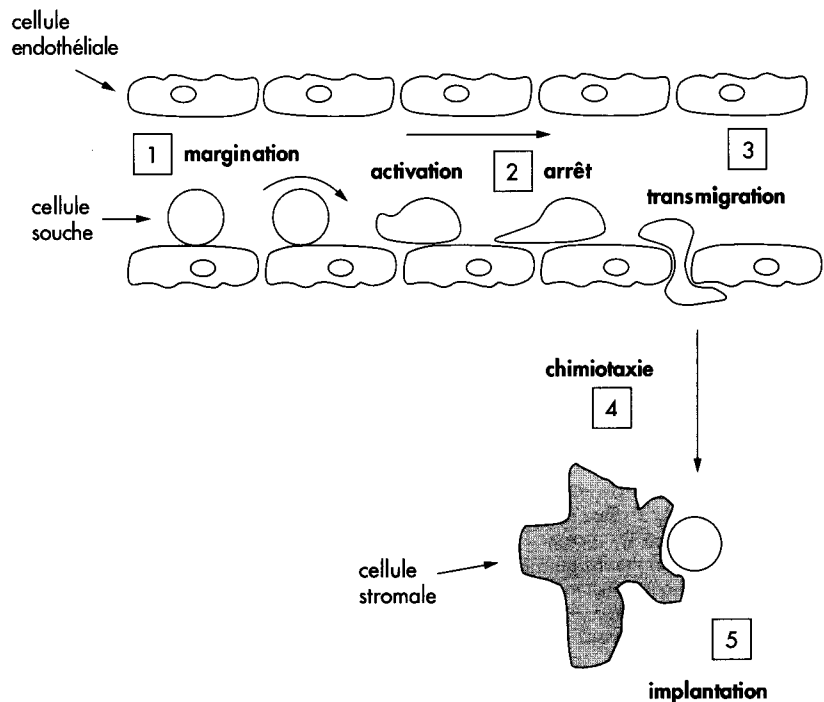


Figure 3. **Modèle d'implantation médullaire de cellules souches.** L'implantation de CSH dans la moelle de l'hôte peut être décomposée en plusieurs étapes :  
 1. les CSH sont marginées par interaction avec les sélectines E et P exprimées par les cellules endothéliales ;  
 2. le SDF-1, présent à la surface des cellules endothéliales, active LFA-1 et VLA-4 ce qui détermine leur adhérence complète à ICAM-1 et VCAM-1, respectivement ;  
 3. les cellules souches adhérentes, en réponse à l'activité chimiotactique du SDF-1 produit par les cellules stromales médullaires, migrent à travers de la membrane basale de l'endothélium vasculaire, via l'interaction de VLA-4 et de VLA-5 avec la Fn ;  
 4. la motilité intramédullaire des CSH est assurée par chimiotaxie en direction des cellules stromales productrices de SDF-1 ;  
 5. les cellules souches atteignent les niches intramédullaires formées de cellules stromales présentant des ligands adéquats (VCAM-1 et Fn notamment) et sécrétant diverses cytokines et chimiokines nécessaires à leur survie, à leur prolifération et à leur différenciation.

## RÉFÉRENCES

30. Jiang Y, Prosper F, Verfaillie CM. Opposing effects of engagement of integrins and stimulation of cytokine receptors on cell cycle progression of normal human hematopoietic progenitors. *Blood* 2000; 95: 846-54.
31. Levesque JP, Zannettino AC, Pudney M, Niutta S, Haylock DN, Snapp KR, Kansas GS, Berndt MC, Simmons PJ. PSGL-1-mediated adhesion of human hematopoietic progenitors to P-selectin results in suppression of hematopoiesis. *Immunity* 1999; 11: 369-78.
32. Huygen S, Greimers R, Kato I, Beguin Y, Gothot A. Alterations in integrin functional state modulate the response to adhesion-mediated growth inhibitory signals in *ex vivo* generated long-term culture-initiating cells. *Exp Hematol* 2002; 30: 75a.
33. Jetmore A, Plett PA, Tong X, Wolber FM, Breese R, Abonour R, Orschell-Traycoff CM, Srour EF. Homing efficiency, cell cycle kinetics, and survival of quiescent and cycling human CD34<sup>+</sup> cells transplanted into conditioned NOD/SCID recipients. *Blood* 2002; 99: 1585-93.
34. Glimm H, Eaves CJ. Direct evidence for multiple self-renewal divisions of human *in vivo* repopulating hematopoietic cells in short-term culture. *Blood* 1999; 94: 2161-8.
35. Cashman J, Dykstra B, Clark-Lewis I, Eaves A, Eaves C. Changes in the proliferative activity of human hematopoietic stem cells in NOD/SCID mice and enhancement of their transplantability after *in vivo* treatment with cell cycle inhibitors. *J Exp Med* 2002; 196: 1141-50.
- produire via les interactions VLA-4/VCAM-1 et LFA-1/ICAM-1. La membrane basale endothéliale est franchie notamment grâce à l'adhérence des CSH à la fibronectine (Fn) via deux récepteurs: VLA-4 et VLA-5 [17]. La motilité des CSH est stimulée de façon directionnelle vers les espaces extravasculaires médullaires. La motilité directionnelle ou chimiotaxie est opposée à la motilité aléatoire, ou chimiokinèse. La chimiotaxie des CSH se produit en direction d'un gradient de SDF-1 produit par les fibroblastes et autres cellules stromales médullaires [18]. Le SDF-1 a pour effet de stimuler la formation d'extensions cytoplasmiques, protéopodes ou filipodes, qui orientent la cellule en direction des concentrations élevées de SDF-1. En se mouvant au travers de protéines de matrice extracellulaire comme la Fn [19], les CSH atteignent finalement des logettes, ou « niches » au contact de cellules stromales spécialisées exprimant VCAM-1 et sécrétant une combinaison de facteurs activateurs et inhibiteurs nécessaires à l'homéostasie de l'hématopoïèse [20]. Le rôle primordial de VLA-4 dans le maintien des CSH au sein de la moelle osseuse a été montré par Papayannopoulou *et al.* [21]. Les CSH expriment donc à leur surface une série de récepteurs d'adhérence leur permettant de se fixer séquentiellement aux cellules endothéliales et aux cellules stromales du microenvironnement médullaire. L'état d'activité de ces récepteurs a un rôle essentiel pour diriger les mouvements de CSH, via la réorganisation du cytosquelette. Dans des cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par des cytokines activatrices et adhérant à la Fn, on observe la formation de filaments d'actine dans le cytosol cortical. Ceux-ci sont associés dans des plaques d'adhérence focale au domaine cytoplasmique de la sous-unité  $\beta 1$  commune aux intégrines VLA-4 et VLA-5, ainsi qu'à des molécules adaptatrices, telles que taline, vinculine,  $\alpha$ -actinine et paxilline. La kinase de tyrosine PYK2 que l'on retrouve dans les plaques focales serait impliquée dans l'activation de signaux intracellulaires contrôlant non seulement l'affinité des intégrines (voies *inside-out*) mais également la survie et la prolifération des cellules souches et progéniteurs (voies *outside-in*) [22]. La nature exacte de ces signaux de transduction reste encore largement indéterminée à ce jour.
- Un certain nombre de données expérimentales ont permis de mettre en évidence une modulation des propriétés d'adhérence ou de motilité des CSH en fonction de leur position dans le cycle cellulaire. La Fn est reconnue par deux récepteurs différents exprimés par les CSH. Ces récepteurs appartiennent à la famille des  $\beta 1$  intégrines, récepteurs hétérodimériques composés d'une même chaîne  $\beta 1$  et d'une chaîne  $\alpha 4$  ( $\alpha 4\beta 1$  ou VLA-4) ou  $\alpha 5$  ( $\alpha 5\beta 1$  ou VLA-5). Les interactions des CSH avec la Fn ne sont pas constitutives mais hautement inductibles. L'adhérence à la Fn est modulée par des changements d'affinité des récepteurs VLA-4 et VLA-5, causés notamment par la stimulation de récepteurs de cytokines ou l'engagement d'autres récepteurs d'adhérence. En particulier, Levesque *et al.* ont montré qu'après stimulation *ex vivo* par des facteurs de croissance comme le *stem cell factor* (SCF) ou l'interleukine IL-3, l'adhérence de progéniteurs humains à la Fn augmentait rapidement et de façon transitoire pour atteindre un maximum en 30 minutes en raison d'un accroissement d'affinité de VLA-4 et de VLA-5. Ce phénomène était réversible et l'adhérence à la Fn revenait à un niveau basal après 2 h [23]. Dans cette étude, il n'était établi aucun lien entre adhérence et cycle cellulaire. Par ailleurs, il est peu probable qu'une stimulation de courte durée ait pu induire la progression des cellules testées dans le cycle cellulaire. Néanmoins, ces premières observations mettent en lumière une association entre adhérence et stimulation mitogénique. Ces observations nous ont amené à examiner l'adhérence des CSH à la Fn lors du parcours du cycle cellulaire [24]. Notre modèle consistait à stimuler des CSH et progéniteurs humains pendant deux jours *ex vivo* de façon à obtenir une population cellulaire proliférant de façon asynchrone et se répartissant dans les différentes phases du cycle. Nous avons pu démontrer que l'adhérence à la Fn augmentait globalement après stimulation mitogénique *ex vivo* mais plus spécifiquement, en raison de l'apparition d'une population cellulaire fortement adhérente à la Fn et parcourant les phases S/G2+M du cycle cellulaire. En revanche, les cel-

lules cultivées résidant à ce moment en  $G_0/G_1$  ne présentaient pas de fixation plus intense à la Fn que les cellules initialement mises en culture. Nous avons pu établir que le passage depuis la phase de quiescence  $G_0$  vers la phase  $G_1$  stimulait aussi les capacités d'adhérence à la Fn. Ces données concordent avec les observations de Yamaguchi *et al.* montrant l'adhérence préférentielle des cellules CD34<sup>+</sup> en S/ $G_2$ +M aux cellules stromales médullaires [25]. Les interrelations entre adhérence à la Fn et cycle cellulaire ont été établies non seulement pour des progéniteurs différenciés mais également pour des progéniteurs primitifs, biologiquement voisins de CSH, les *long-term culture-initiating cells* (LTC-IC). Nous avons ensuite évalué le rôle de VLA-4 et de VLA-5 dans la stimulation de l'adhérence à la Fn observée en phases S/ $G_2$ +M. Les cellules progénitrices cultivées *ex vivo* ont été incubées avec des anticorps neutralisant spécifiquement VLA-4 ou VLA-5 avant de mesurer leur adhérence. Ces expériences ont indiqué que l'adhérence stimulée en phases actives du cycle cellulaire était principalement médiée par VLA-5, VLA-4 étant plus impliqué dans l'adhérence de cellules mitotiquement inactives. Enfin, nous avons pu montrer que les capacités d'adhérence à la Fn de cellules progénitrices maintenues en culture et proliférant de façon asynchrone, fluctuent constamment en fonction du parcours du cycle cellulaire. En conclusion, après une stimulation mitogénique de deux jours *ex vivo*, dans des conditions favorisant la prolifération des CSH, nous observons que les cellules induites à se diviser se fixent également plus fermement à la Fn *via* VLA-5. Dans d'autres types cellulaires, il est bien établi qu'il existe une relation inverse entre adhérence et motilité. À force d'adhérence intermédiaire, la cellule peut se mouvoir grâce à des interactions labiles de fixation et de détachement avec son substrat. En revanche, lorsque l'adhérence au substrat est maximale, la cellule est immobilisée et incapable de répondre aux stimulations chimiotactiques [26]. On peut donc émettre l'hypothèse que l'adhérence à la Fn, médiée par VLA-5 et stimulée lors de la réplication cellulaire, limite la motilité intramédullaire et par conséquent la capacité des CSH

à s'implanter dans leur microenvironnement spécifique.

Dès lors, nous avons examiné les propriétés de motilité des CSH et progéniteurs, toujours après une stimulation mitogénique de 2j [27]. Nous avons constaté une capacité de migration plus importante des cellules résidant en phase  $G_0/G_1$  du cycle cellulaire, ou inversement, une motilité déficitaire des progéniteurs se situant en phase S/ $G_2$ +M. L'association entre motilité et cycle cellulaire était observée tant pour les progéniteurs engagés que pour les progéniteurs primitifs (LTC-IC). La motilité plus faible des cellules en S/ $G_2$ +M dépendait de leur interaction avec la Fn : en effet, en présence d'un substrat non adhérent comme l'albumine sérique, la migration des progéniteurs en cycle ou hors cycle était identique.

En étudiant l'activité de VLA-4 et de VLA-5 dans l'adhérence et la motilité des progéniteurs hématopoïétiques, nous avons pu constater que la fonction des deux récepteurs était modulée différemment en fonction de la phase du cycle cellulaire. En particulier, VLA-5 jouait un rôle primordial dans l'adhérence des cellules en  $G_2$ /M mais n'intervenait pas dans la motilité des cellules progressant dans cette même phase du cycle. À l'inverse, VLA-4 était impliqué dans la migration des cellules progénitrices en  $G_2$ /M mais pas dans leur adhérence. On retrouve donc, aussi bien pour VLA-4 que pour VLA-5, une relation inverse entre adhérence et motilité : un récepteur impliqué dans la fixation statique à un substrat ne pourra pas médier la motilité cellulaire sur ce même substrat, et *vice versa*. Un niveau supplémentaire de complexité existe ici dans la mesure où la fonction des deux intégrines, qu'elle soit statique (adhérence) ou dynamique (migration), est modulée en fonction du cycle cellulaire. Ce phénomène pourrait induire des voies divergentes d'implantation médullaire des CSH selon leur position dans le cycle et favoriser la rétention et/ou la survie de cellules quiescentes au détriment de cellules activées.

Dans une étude ultérieure, les interactions de progéniteurs avec Fn, VCAM-1 et ICAM-1 ont été évaluées dans le parcours d'un cycle cellulaire synchronisé [28]. Les cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon ombilical se répartissent entre les phases  $G_0$  et  $G_1$  du cycle cellulaire sui-

vant leur niveau hiérarchique (voir précédemment). Mises en culture en présence de cytokines activatrices et d'aphidicoline, agent pharmacologique inhibiteur de l'ADN polymérase, elles progressent en phase  $G_1$  et s'accumulent au début de la phase S de synthèse de l'ADN. Le retrait de l'aphidicoline du milieu de culture permet le passage simultané de la majorité des cellules, que ce soit des progéniteurs différenciés ou plus primitifs (LTC-IC), au travers de la phase S. De cette façon, l'adhérence et la motilité cellulaire peuvent être examinées à trois stades distincts du cycle cellulaire : en  $G_0/G_1$ , à la transition  $G_1/S$  et en phase S du premier cycle exécuté *ex vivo*. Dans ces conditions, nous avons observé une augmentation réversible d'adhérence à la Fn durant la phase S du cycle, ce qui corrobore les résultats obtenus sur cellules non synchronisées. L'adhérence à VCAM-1, quant à elle, diminuait de 50 % lors de la phase S avant de retourner à son niveau initial lorsque les cellules avaient accompli leur premier cycle complet. Il est peu probable que les modulations observées dépendent simplement de l'exposition des progéniteurs à des cytokines activatrices ou de leur retrait de leur microenvironnement naturel. En effet, les cellules bloquées à la transition  $G_1/S$  en présence de concentrations élevées de facteurs de croissance voyaient leurs capacités d'adhérence radicalement et réversiblement modifiées une fois autorisées à poursuivre leur cycle. Par ailleurs, on n'observait pas de modulations fonctionnelles des intégrines  $\beta 1$  lorsque les cellules progénitrices étaient maintenues en  $G_0/G_1$  en culture. Par conséquent, il semble bien que ce soit le parcours du cycle cellulaire qui soit à l'origine des changements d'adhérence identifiés, et ceci *via* des mécanismes non encore élucidés. Si l'on prend en compte que l'adhérence à VCAM-1 est préalable à la migration transendothéliale des CSH et indispensable à leur rétention au contact de cellules stromales dans le microenvironnement médullaire, ces observations peuvent en partie expliquer la transplantabilité inefficace des CSH induites à proliférer. L'augmentation transitoire de la fixation à la Fn, protéine ubiquitaire de la membrane basale et du stroma médullaire, pourrait également

ralentir les mouvements cellulaires en direction de cellules stromales médullaires spécialisées (figure 4). Une observation intéressante à cet égard est le fait que l'activation des intégrines  $\beta 1$  par l'anticorps activateur TS2/16 abroge les capacités reconstitutives de cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon tout en stimulant leur adhérence à la Fn [29].

La survie, la prolifération et la différenciation des CSH et progéniteurs sont contrôlées par une grande variété de cytokines activatrices et inhibitrices. Les récepteurs aux molécules d'adhérence sont non seulement nécessaires pour guider les mouvements des CSH mais participent également à la régulation de l'hématopoïèse. En particulier, l'engagement des intégrines  $\beta 1$  [30] et des récepteurs des sélectines ESL et surtout PSGL-1 [31] inhibe la prolifération des cellules progénitrices. Par conséquent, le contrôle de l'hématopoïèse s'effectue en partie via le maintien de la quiescence mitotique des cellules adhérant aux protéines de la matrice extracellulaire médullaire. Si les modulations fonctionnelles des intégrines sont susceptibles d'interférer avec la transplantabilité des CSH activées ex vivo, elles peuvent de même perturber le

Tableau				
Résumé des modifications fonctionnelles observées sur les progéniteurs primitifs LTC-IC générés ex vivo				
Récepteur	Ligand	Adhérence	Motilité	Effet anti-prolifératif
VLA-4	Fn, VCAM-1	↓↓	↓↓	↓↓
VLA-5	Fn	↑↑	↓↓	↑↑
LFA-1	ICAM-1	=	↓	=
ESL	Sélectine E	=	=	=
PSGL-1	Sélectine P	=	=	↓

Sont représentées les modifications dans la capacité des récepteurs indiqués à médier l'adhérence et la motilité des progéniteurs primitifs LTC-IC après expansion ex vivo. Les modulations de l'effet anti-prolifératif de VLA-4, VLA-5 et PSGL-1 sur les LTC-1 produites en culture sont également indiquées.

contrôle normal de leur prolifération une fois implantées chez le receveur. Nous avons étudié cette question en évaluant l'effet de différents ligands du stroma médullaire sur des LTC-IC non stimulées ou produites par expansion ex vivo [32]. Nous n'avons pas observé d'effet d'ICAM-1 ou de la sélectine E sur les LTC-IC natives ou amplifiées ex vivo. Un effet inhibiteur de la Fn, de la sélectine P et de VCAM-1 a été mis en évidence sur le développement de progéniteurs secondaires à partir de LTC-IC « natives ». La sélectine P et VCAM-1 ne montraient plus d'effet sur des LTC-IC obtenues par divisions d'auto-renouvellement exécutées ex vivo. Seule la Fn conservait un effet inhibiteur sur les LTC-IC reproduites par culture. De façon concordante avec la régulation de l'adhérence à la Fn en fonction du cycle cellulaire, l'effet inhibiteur de la Fn sur les LTC-IC natives s'exerçait via

VLA-4 tandis que l'inhibition des LTC-IC produites ex vivo était médiée par VLA-5. Nous avons pu également établir que l'inactivation de VLA-4 et l'activation de VLA-5 se produisaient spécifiquement lorsque les progéniteurs étaient stimulés par des cytokines à des concentrations supra-physiologiques tandis que des concentrations physiologiques des mêmes facteurs de croissance maintenaient l'activité fonctionnelle de VLA-4 et VLA-5 à leur niveau initial. Ces observations sont à rapprocher de l'étude récente publiée par Jetmore *et al.* [33]. Ces auteurs ont observé que les cellules parvenant dans la moelle de l'hôte subissent transitoirement un arrêt de leur progression mitotique. Lorsque celui-ci se produit en phase S/G<sub>2</sub>+M, les cellules entrent en apoptose tandis que la viabilité des cellules en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> est préservée. Par conséquent, seules les CSH transplantées en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> pourront coloniser la moelle du receveur et y ré-établir une prolifération de cellules hématopoïétiques. Des études ultérieures devraient déterminer si l'inactivation de VLA-4 et l'activation de VLA-5 en phase S/G<sub>2</sub>+M participent au déclenchement de l'apoptose décrite par Jetmore et au déficit de transplantabilité des progéniteurs et CSH activées ex vivo. En conclusion, les progéniteurs primitifs LTC-IC stimulés à se reproduire ex vivo par des cytokines activatrices à haute concentration subissent des modifications importantes non seulement dans leur capacité à interagir avec les molécules d'adhérence responsables de leur transplantabilité, mais également à répondre aux signaux inhibiteurs transmis par les protéines matricielles médullaires (tableau).

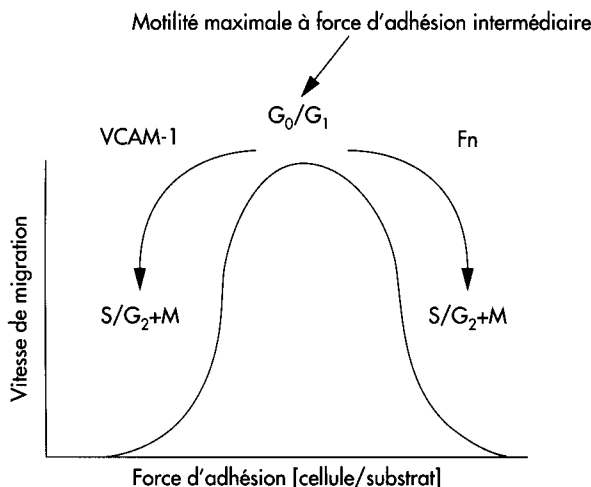


Figure 4. **Relation entre force d'adhérence et vitesse de migration.** Selon le modèle de Lauffenburger *et al.* [23], la vitesse de migration cellulaire varie de manière biphasique en fonction de la force d'adhérence au substrat. La transplantabilité optimale des CSH en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> permet de supposer que leur motilité est maximale à cette phase du cycle cellulaire. Dans ce cas, lors du transit en S/G<sub>2</sub>+M, tant une augmentation d'adhérence sur Fn qu'une diminution d'adhérence sur VCAM-1 aboutiront à une réduction de la motilité cellulaire.

## Summary

Modulation of cell cycle progression and cell homing by cell cycle progression in vivo

Une prolifération importante (jusqu'à 100 fois) de progéniteurs peut être obtenue dans des conditions de culture précisément définies. Cette expansion s'accompagne de divisions d'auto-renouvellement de CSH transplantables [34]. Pour autant, il n'a pas été possible jusqu'à présent d'obtenir une expansion significative de CSH primitives, lorsque celles-ci sont mises en évidence par injection à la souris immuno-déficiente. L'implantation inefficace des cellules en prolifération active semble donc être un obstacle majeur à l'utilisation en transplantation clinique de CSH produites *ex vivo*. Les travaux visant à analyser les modulations de transplantabilité associées au cycle cellulaire doivent nous permettre de définir ultérieurement les conditions permettant d'assurer la réversibilité de ce déficit. Des données encourageantes utilisant des facteurs arrêtant le cycle des CSH ont été publiées récemment [35]. D'un point de vue général, les travaux impliquant la détection, chez l'animal d'expérience, de CSH obtenues après amplification *ex vivo* devraient spécifiquement évaluer par marquage rétroviral la descendance clonale de CSH ayant parcouru un ou plusieurs cycles en culture.

Les observations rapportées ici peuvent aussi avoir une signification clinique importante relative aux CSH leucémiques, la plupart en prolifération active. Si celles-ci présentent le même déficit de transplantabilité que les CSH normales, cela peut impliquer que les purges de cellules leucémiques aient une utilité plus limitée qu'estimée antérieurement

In steady state, the majority of haematopoietic stem cells (HSC) reside in the  $G_0$  phase of the cell cycle. Cell cycle progression may be induced *in vitro* by stimulatory cytokines in order to multiply HSC or as a preparative step in retroviral gene transfer procedures. As compared to quiescent HSC, activated HSC have a reduced capacity to support haematopoietic regeneration after transplantation into conditioned hosts. This is not caused by irreversible differentiation but is rather modulated by cell cycle progression. Indeed, transplantability of activated HSC returns to normal levels after cell cycle completion or withdrawal of mitogenic stimuli. We present experimental evidence suggesting that mitotic activation of HSC and progenitor cells induces defective homing into host bone marrow. First, adhesion of progenitor cells to the bone marrow stroma increases during cell cycle progression. Specifically, fibronectin (Fn) binding of *ex vivo* activated progenitors is stimulated in  $S/G_2+M$  phases. This stimulation is reversible after termination of the cycle. Cell-Fn interactions are mediated by two main receptors, VLA (very late antigen) -4 and VLA-5 integrins. Mitogenic stimuli induce a functional inactivation of VLA-4 and increase the affinity of VLA-5 for Fn. Stimulated Fn binding is associated with a reduction in progenitor cell motility. Contrarily to Fn, adhesion to VCAM (vascular cell adhesion molecule) -1, another important ligand within the bone marrow stroma, is reversibly reduced during cell cycle progression. Finally, it is observed that activated progenitor cells lose their ability to respond to inhibitory signals triggered by engagement of adhesion receptors VLA-4 and PSGL (P-selectin glycoprotein ligand) -1. Further studies will be necessary to assess the role of such modifications in the ineffective homing of activated HSC and to define means to overcome what may be a major drawback to clinical transplantation of *ex vivo* generated HSC.

---

André Gothot et Yves Beguin sont respectivement, chercheur qualifié et directeur de recherche du Fonds national de la recherche scientifique (Belgique).

---

### TIRÉS À PART

A. Gothot.  
<agothot@ulg.ac.be>